

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 04/03/2018.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**Efeitos da superestimulação ovariana sobre a  
competência oocitária e embrionária em bovinos:  
possível participação dos exossomos presentes no fluido  
folicular**

**FERNANDA FAGALI FRANCHI**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós  
Graduação do Instituto de Biociências de  
Botucatu, Universidade Estadual Paulista –  
UNESP, para a obtenção do título de Mestre  
em Ciências Biológicas, Farmacologia**

**Orientador: Anthony César de Souza Castilho**

**Botucatu – SP  
2016**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Franchi, Fernanda Fagali.

Efeitos da superestimulação ovariana sobre a competência oocitária e embrionária em bovinos : possível participação dos exossomos presentes no fluido folicular / Fernanda Fagali Franchi. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Anthony César de Souza Castilho  
Capes: 21001006

1. Exossomos. 2. Hormônio folículo-estimulante. 3. Gonadotrofinas. 4. Oócitos. 5. Reprodução animal.

Palavras-chave: Exossomos; FSH; Superestimulação Ovariana; eCG.

**Nome da Autora:** Fernanda Fagali Franchi

**Título:** Efeitos da superestimulação ovariana sobre a competência oocitária e embrionária em bovinos: possível participação dos exossomos presentes no fluido folicular

**Banca Examinadora**

Prof. Dr. Anthony César de Souza Castilho

Presidente e Orientador

Departamento de Pós-graduação em Ciência Animal

Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE – Presidente Prudente – SP

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gisele Zoccal Mingoti

Membro Titular

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal – DAPSA

Faculdade de Medicina Veterinária – FMV – UNESP – Araçatuba - SP

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ester Siqueira Caixeta

Membro Titular

Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento

Universidade Federal Alfenas – UNIFAL – Alfenas – MG

**Data da Defesa:** 04/03/2016

**Local da Defesa:** Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, Botucatu – SP

*Dedico este trabalho aos meus pais, Mario e Eliana, e aos meus tios, Augusto e Regina, os quais contribuíram da maneira que puderam para que eu chegasse até aqui...*

# AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Anthony César de Souza Castilho, por esses dois anos de aprendizado e crescimento tanto profissional quanto pessoal. Obrigada por me auxiliar nesse início de carreira e por estar sempre disposto a me atender quando precisei. Agradeço pela confiança, por acreditar no meu trabalho e por poder fazer parte da sua equipe. Obrigada, principalmente, pela sua humanidade, qualidade que faz de você mais do que um simples orientador, faz de você um amigo.

Aos membros da banca pela disponibilidade e tempo dedicados para o enriquecimento deste trabalho e da minha formação acadêmica.

Ao Prof. Dr. Luiz Cláudio Di Stasi, Prof. Dr. Marcelo Fábio Gouveia Nogueira e Prof. Dr. Ciro Moraes Barros por permitirem que toda execução desse projeto tenha sido realizada nas dependências do Laboratório Multiusuários Fitomedicamentos, Farmacologia e Biotecnologia.

A Dr<sup>a</sup> Raquel Zaneti Puelker por todo auxílio durante os experimentos, pelas dicas, pela disponibilidade e pelo tempo empregado nesse trabalho. Obrigada por dividir toda sua experiência conosco.

Ao Dr. Juliano Coelho da Silveira pela ajuda e esclarecimentos sobre as vesículas extracelulares, que eram algo novíssimo para nós! Obrigada pelo tempo e paciência disponibilizados para realização desse trabalho

Ao pessoal do Laboratório de Fitomedicamentos, Farmacologia e Biotecnologia pelos cafés da manhã sempre muito animados, regados a muitas conversas e risadas. Obrigada pela receptividade e pela ajuda oferecida quando precisei.

Aos meus companheiros de trabalho Eduardo, Mariana, Patrícia, Priscila e Ramon por fazerem do ambiente de trabalho um local agradável e prazeroso de se trabalhar. Obrigada por me auxiliarem durante os experimentos e por estarem sempre dispostos a me ajudar no que fosse preciso. Obrigada por me aconselharem e por fazerem de mim uma pessoa melhor.

Aos meus vizinhos de laboratório, Carol, Lorena e Rodrigo, pelos empréstimos e “socorros” prestados durante esse período! Obrigada pelo companheirismo e confiança.

Ao meu namorado, Francisco, por me apoiar incondicionalmente no que diz respeito a minha carreira. Obrigada por ser meu amigo, companheiro e sempre estar ao meu lado. Obrigada pelos momentos agradáveis e pelo incentivo nos momentos de fraqueza.

As minhas amigas Carol, Debora, Patrícia e Priscila por essa relação de amizade ter saído das paredes do laboratório e ter alcançado um lugar especial em minha vida. Obrigada pela força, pela dedicação, por me ouvirem, por estarem sempre ao meu lado, enfim, pela parceria sincera e desinteressada.

Aos meus pais, Mario e Eliana, e aos meus irmãos, Renata e Raul, por me darem o apoio familiar necessário para suportar as situações mais adversas possíveis para que eu alcançasse meus objetivos. Obrigada por me incentivarem a nunca desistir dos meus sonhos.

Aos meus tios, Augusto e Regina, por acreditarem no meu potencial e por me incentivarem a seguir a carreira acadêmica. Obrigada por me darem a oportunidade de estar onde estou e o suporte necessário para eu chegar até aqui.

A seção de pós-graduação do Instituto de Biociências de Botucatu.

Aos professores do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu pelo tempo dedicado as disciplinas e por toda atenção disponibilizada.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia Janete, Cristina, Luis, Paulo e Hélio por toda dedicação e atenção.

A CAPES e a FAPESP pela concessão de bolsa de mestrado e a pelo suporte financeiro para realização deste trabalho.

*"O único lugar onde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário."*

Albert Einstein



# RESUMO

A superestimulação ovariana é uma das biotecnologias utilizadas com objetivo de aumentar o potencial reprodutivo de fêmeas com alto valor econômico através da obtenção de múltiplas ovulações e tem sido amplamente empregada na espécie bovina. O conhecimento da dinâmica folicular permitiu o desenvolvimento de diversos protocolos hormonais capazes de regular o desenvolvimento folicular, o momento e o número de ovulações produzidas. As duas gonadotrofinas mais utilizadas para induzir o crescimento de múltiplos folículos durante esses protocolos são o hormônio folículo-estimulante (FSH) e a gonadotrofina coriônica equina (eCG); e ambos têm se mostrado eficazes. Sabe-se que a utilização da superestimulação ovariana utilizando FSH provoca mudanças positivas nos complexos *cumulus*-oócito (CCOs) e que a utilização do eCG no final do tratamento superestimulatório aumenta a resposta ovulatória, a ocorrência de estro, as concentrações de progesterona e as taxas de prenhes em programas de inseminação artificial (IA). Deste modo, o uso desses protocolos parece alterar o microambiente folicular e conseqüentemente a competência dos CCOs que se desenvolvem nele. Dentre os vários fatores presentes nesse microambiente estão as vesículas extracelulares (VEs; incluindo os exossomos), que carregam diversas moléculas como mRNA e microRNAs (miRNAs). Diante disso, o presente estudo visou avaliar o efeito da superestimulação ovariana com FSH ou FSH combinado a eCG, sobre a expressão gênica de embriões produzidos a partir de CCOs recuperados de vacas superestimuladas. Adicionalmente, verificou-se se os exossomos presentes no fluido folicular dessas vacas, quando adicionadas durante a maturação *in vitro* (MIV) de CCOs, provenientes de folículos antrais (3-8mm), são capazes de alterar aspectos celulares e moleculares dos CCOs, bem como a produção de blastocistos *in vitro*. Em

suma, os resultados demonstraram que a superestimulação ovariana altera a abundância de mRNAs, relacionados à competência embrionária, em blastocistos produzidos à partir dos CCOs recuperados das vacas superestimuladas. Adicionalmente, também parece modular o conteúdo das exossomos, uma vez que genes relacionados à competência oocitária foram positivamente regulados nos CCOs cultivados na presença dos exossomos, no entanto, sem alterar a competência do CCOs em produzir blastocistos.

# ABSTRACT

Ovarian superstimulation is a biotechnology used to increase the reproductive potential of females with high economic value by obtaining multiple ovulations and has been widely used in cattle. The follicular dynamics knowledge allows the development of numerous hormonal protocols able to regulate follicular development, the moment and the number of ovulations produced. Two most used gonadotrophins to induce the growth of multiple follicles during these protocols are follicle stimulating hormone (FSH) and chorionic gonadotropin equine (eCG) and both have proven effective. It is known that the ovarian superstimulation using FSH causes positive changes in cumulus-oocyte complexes (COCs) and the use of eCG at the end of superstimulatory treatment increases the ovulatory response, the oestrus occurrence, progesterone concentrations and pregnancy rates in artificial insemination (AI). Thus, these protocols seem to alter the follicular microenvironment and therefore the competence of COCs that develop it. Among the several factors present in this microenvironment are the extracellular vesicles (EVs; including the exosomes), that carry different molecules such as mRNA and microRNA (miRNAs). Therefore, this study aimed to assess the effects of ovarian superstimulation with FSH or FSH combined with eCG on embryo gene expression produced from COCs recovered from superstimulated cows. Additionally, it was checked if the exosomes present in follicular fluid from these cows, when added during *in vitro* maturation (IVM) of COCs from antral follicles (3-8mm), are able to alter COCs cellular and molecular aspects and the *in vitro* blastocyst production. Briefly, the results showed that ovarian superstimulation changes the mRNA abundance related to embryo competence in blastocysts produced from COCs recovered from superstimulated cows. Furthermore, it also seems to modulate the

exosome content, since the genes related to the oocyte competence are upregulated in COCs cultured in exosomes presence, however, without changing the COCs competence to produce blastocysts.

# LISTA DE FIGURAS

## CAPÍTULO 2

**Figure 1.** Ovarian superstimulatory protocols in Nelore cows. Panel (A): control group, no superstimulated cows. Panel (B): P-36 protocol. Panel (C): P-36+eCG protocol. EB: Estradiol benzoate, D: day; PGF2 $\alpha$ : prostaglandin F2 alpha..... **45**

**Figure. 2:** Morphological characterization of exosomes pool isolated from bovine follicular fluid using ultracentrifugation by transmission electron microscopy.....**57**

**Figure 3:** Exosomes addition from superstimulated (FSH or FSH+eCG) cows or not during IVM on meiosis progression (A) and DNA fragmentation (B). The effects were testes by ANOVA. Differences were considered significant when  $P \leq 0.05$ . The results were obtained from 5 replicates to meiosis progression and to TUNEL assays analysis.....**58**

**Figure. 4:** Effects of addition of exosome from superstimulated (FSH or FSH+eCG) cows or not on the abundance of *H2AFZ*, *PDE3*, *GDF9* and *BMP15* mRNA on oocyte (A) and abundance of *AREG*, *GREM1*, *COX2*, *EGFR*, *GDF9* and *BMP15* mRNA on *cumulus* cells (B). The relative mRNA concentrations (target gene/PPIA by Pfaffl's equation) were analyzed by ANOVA and the means were compared with an orthogonal contrast. The differences (a,b) were considered significant when  $P \leq 0.05$ . The results were obtained from 5 replicates.....**59**

# LISTA DE TABELAS

## CAPÍTULO 2

**Table 1.** Names and functions for embryonic quality of candidate genes.....**49**

**Table 2.** Information of specific primers used for amplification in real-time PCR. F:  
Forward primer; R: Reverse primer.....**54**

**Table 3.** Gene expression of *in vitro*-produced blastocysts pools (5 embryos/pool) from cows submitted (FSH and FSH+eCG) or not (small follicles) to ovarian superstimulation. Number of pools analyzed were described in parenthesis. Data are presented by mean  $\pm$  SEM. ND: undetectable expression.....**56**

# SUMÁRIO

<b>PRÓLOGO</b> .....	15
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	21
1. ESTADO DA ARTE.....	22
<i>1.1 Aspectos gerais da foliculogênese e o papel do microambiente folicular ovariano na competência oocitária</i> .....	22
<i>1.2 Vesículas extracelulares: exossomos</i> .....	24
<i>1.3 Superestimulação ovariana na espécie bovina</i> .....	28
2. HIPÓTESE.....	31
3. OBJETIVOS.....	31
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>40</b>
ABSTRACT .....	41
INTRODUCTION .....	42
MATERIAL AND METHODS.....	44
<i>Experiment 1: Effects of superstimulated treatment on embryo gene expression</i> ... 44	
<i>Experiment 2: Effects of exosomes from bovine follicular fluid on oocyte competence and embryo production</i> .....	50
RESULTS .....	55
DISCUSSION.....	60
REFERENCES .....	65
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>76</b>

# PRÓLOGO

## Participação em eventos

2015 - XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões; Agosto/2015, Gramado – SP.

2015 - 1º Encontro de Epigenética e Reprogramação Nuclear, Abril, 2015 – USP – Pirassununga – SP.

2015 - XIV Workshop da Pós Graduação; Junho – UNESP – Botucatu-SP.

2015 - XV Workshop de genética; Abril, 2015 – UNESP – Botucatu-SP.

2014 - XIII Workshop da Pós Graduação; Junho, 2014 – Unesp – Botucatu-SP.

2014 - Análise Genômica- Presente e Futuro; Instituto de Biociências, UNESP – Botucatu – SP

## Resumos em congressos

2015 - **FERNANDA FAGALI FRANCHI**, PATRÍCIA KUBO FONTES, PRISCILA HELENA DOS SANTOS, JULIANO COELHO DA SILVEIRA, MARCELO FÁBIO GOUVEIA NOGUEIRA, CIRO MORAES BARROS, ANTHONY CÉSAR DE SOUZA CASTILHO. Efeitos moleculares e celulares de exossomos do fluido folicular de vacas Nelore submetidas à superestimulação ovariana. Em: XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Agosto 2015, Gramado – RS.

2015 - RODRIGO GARCIA BARROS, DEBORA JARDINA SARTOR, PAULA FERNANDA DE LIMA, LORENA SANCHES, ANA CAROLINE SILVA SOARES, CAMILA PAULA FREITAS-DELL ‘AQUA, **FERNANDA FAGALI FRANCHI**, FERNANDA CRUZ LANDIM ALVARENGA, CHRISTOPHER PRICE, JOSE BURATINI. O fator de crescimento dos fibroblastos 10 (FGF10) e a proteína morfogenética óssea 15 (BMP15) inibem a apoptose nas células do cumulus de complexos cumulus-oócito bovinos submetidos a maturação in vitro. Em: XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Agosto 2015, Gramado – RS.



- 2015 - FONTES, P. K.; **FRANCHI, F. F.**; MILANEZI, R.; SANTOS, P. H.; NOGUEIRA, M. F. G.; BARROS, C. M.; CASTILHO, A. C. S. Effects of ovarian superstimulation on luteinizing hormone receptor (LHR) mRNA-binding protein (LRBP) mRNA and mir-222 expression in granulosa cells from Nelore cows. In: 48th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction; Junho 2015, San Juan, Puerto Rico, USA.
- 2014 - JARDINA SARTOR, D.T.; **FRANCHI, F. F.**; LIMA, P. F.; PRICE, C.; BURATINI JUNIOR, J. Bone morphogenetic protein 15 and fibroblast growth factor 10 cooperate to inhibit apoptosis in bovine cumulus-oocyte complexes submitted to in vitro maturation. In: 9th Symposium of ruminants, Agosto 2014, Obihiro, Hokkaido, Japão.

### **Atividades didáticas**

2015 - Aula prática ministrada aos alunos de Biomedicina da UNIP de Bauru durante a visita Técnica ao laboratório de Fitomedicamentos, Farmacologia e Biotecnologia – UNESP, Botucatu-SP

Tema: “Noções de produção *in vitro* de embriões bovino”

2015 - Palestra ministrada aos alunos de Pós-graduação em Ciências animal, durante a disciplina de Endocrinologia Molecular da Reprodução - UNOESTE, Presidente Prudente-SP

Tema: “Vesículas extracelulares: Importância e perspectivas na comunicação intracelular ovariana”

### **Participação em outros projetos**

2015 - Expressão de miRNAs reguladores do LHR ao redor do desvio folicular e durante a diferenciação de células da granulosa de fêmeas Nelore cultivadas *in vitro*.

2015 - Efeito da adição de vesículas extracelulares intrafoliculares de vacas holandesas submetidas ao estresse térmico em meio de maturação oocitária *in vitro*

2015 - Efeitos da adição da proteína sérica A associada à prenhez (PAPPA) sobre aspectos celulares e moleculares da maturação *in vitro* de oócitos bovinos.

2015 - Efeito da adição da proteína sérica A associada à prenhez (PAPPA) durante a maturação *in vitro* sobre a produção de embriões bovinos.

# INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos tem crescido significativamente nos últimos anos. Em 2011, foram produzidos 350.762 embriões no Brasil, dos quais 90,7% foram produzidos *in vitro*. O aumento da utilização da fecundação *in vitro* (FIV) ocorreu devido aos seus efeitos positivos na redução de custos e na criação de novas possibilidades de aplicação na produção animal (Viana 2012) Na pecuária brasileira, há a predominância da sub-espécie *Bos taurus indicus*, cujas fêmeas apresentam em seus ovários maior abundância de folículos antrais passíveis de utilização na PIVE, o que determinou forte expansão comercial desta biotecnologia (Pontes *et al.* 2009).

A maturação *in vitro* (MIV) é uma das etapas determinantes para o sucesso da técnica de PIVE e resultados insatisfatórios nesta fase alteram drasticamente o desenvolvimento, sobrevivência e implantação embrionária (Eppig 2001; Rizos *et al.* 2002; Gilchrist *et al.* 2004; McNatty *et al.* 2004; Gilchrist 2011). Apesar dos avanços no processo de PIVE em bovinos, os resultados da MIV são inferiores quando comparados à maturação *in vivo* (Rizos *et al.* 2002), sugerindo que a baixa competência de oócitos maturados *in vitro* seja decorrente, principalmente, da remoção do CCOs do ambiente intrafolicular. Isto porque, tal procedimento compromete a comunicação entre o oócito e as células somáticas (células do *cumulus*), além de impossibilitar a ação de diversos fatores reguladores da maturação nuclear e citoplasmática, presentes no microambiente folicular (Lonergan *et al.* 1994; Coticchio *et al.* 2004; Krisher 2004)

Dentre os vários fatores presentes no microambiente folicular, encontram-se as vesículas extracelulares (VEs: exossomos e microvesículas). Sua presença tem sido observada em diversos tipos celulares, tais como, reticulócitos, plaquetas, linfócitos T

citotóxicos, linfócitos B, células dendríticas, células epiteliais de glândulas salivares, células acinares do pâncreas e células tumorais (Beaudoin *et al.* 1987; Escola *et al.* 1998; Théry *et al.* 2001; Kapsogeorgou *et al.* 2005; Bhatnagar *et al.* 2007; Iero *et al.* 2008). Adicionalmente, estudos mostraram a presença de exossomos e microvesículas em diversos fluidos biológicos como saliva, plasma, urina (Pisitkun *et al.* 2004; Caby *et al.* 2005; Gonzalez-Begne *et al.* 2009; Berckmans *et al.* 2011), bem como no líquido folicular de éguas (da Silveira *et al.* 2012) e fêmeas bovinas (Sohel *et al.* 2013). Uma característica importante nessas vesículas é que seus componentes e conteúdos podem ser modificados pelas condições de cultivo (Parolini *et al.* 2009; de Jong *et al.* 2012; Kucharzewska and Belting 2013) e essa capacidade de modificação, pode ser o mecanismo pelo qual as células controlam diversos processos fisiológicos.

Recentes estudos demonstraram que a superestimulação ovariana afeta positivamente a abundância relativa de genes correlacionados com a capacidade ovulatória e competência de CCOs recuperados de vacas da raça Nelore submetidas à superestimulação ovariana (Barros *et al.* 2013), bem como regula a composição de fosfolípidios presentes no fluido folicular (dados não publicados). Logo, o uso da superestimulação ovariana, visando otimizar a produção de embriões através da produção de múltiplas ovulações de fêmeas com alto potencial genético (Barros and Nogueira 2001; Gouveia Nogueira *et al.* 2002; Baruselli *et al.* 2006; Barros *et al.* 2010), parece alterar o microambiente folicular no ovário bovino, e porque não, o perfil e conteúdo dos exossomos presentes no fluido folicular de fêmeas bovinas.

Sabe-se que o microambiente folicular fornece ao oócito as condições propícias para o desenvolvimento da competência oocitária, definida como o potencial de um oócito em maturar, ser fecundado, desenvolver-se até o estágio de blastocisto e conseqüentemente manter a gestação (Sirard *et al.* 2006). Assim, o presente estudo

visou maximizar o entendimento das modificações causadas pela superestimulação ovariana com FSH ou FSH combinado com eCG, sobre a produção e perfil gênico relacionado à competência embrionária em vacas da raça Nelore. Adicionalmente, sabendo-se da presença dos exossomos no fluido folicular, pretende-se explorar possíveis efeitos da comunicação celular desempenhada por essas vesículas, sobre importantes processos, como a MIV e a PIVE em bovinos, em resposta às gonadotrofinas.

## REFERENCES

- Acampora, D., Di Giovannantonio, L.G., and Simeone, A. (2013) Otx2 is an intrinsic determinant of the embryonic stem cell state and is required for transition to a stable epiblast stem cell condition. *Development* **140**(1), 43-55
- Adams, G.P., Matteri, R.L., Kastelic, J.P., Ko, J.C., and Ginther, O.J. (1992) Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J Reprod Fertil* **94**(1), 177-88
- Adams, G.P., Nasser, L.F., Bo, G.A., Garcia, A., Del Campo, M.R., and Mapletoft, R.J. (1994) Superovulatory response of ovarian follicles of Wave 1 versus Wave 2 in heifers. *Theriogenology* **42**(7), 1103-13
- Al-Gubory, K.H., Arianmanesh, M., Garrel, C., and Fowler, P.A. (2015) The conceptus regulates tryptophanyl-tRNA synthetase and superoxide dismutase 2 in the sheep caruncular endometrium during early pregnancy. *Int J Biochem Cell Biol* **60**, 112-8
- Al-Gubory, K.H., and Garrel, C. (2012) Antioxidative signalling pathways regulate the level of reactive oxygen species at the endometrial-extraembryonic membranes interface during early pregnancy. *Int J Biochem Cell Biol* **44**(9), 1511-8
- Barcelos, A.C.Z., Gouvêa, L.M., Meneghel, M., Barcelos, D.S., Barcelos, L.N., Trinca, L.A., and Barros, C.M. (2007) Efeito benéfico da substituição das duas últimas doses de pFSH por eCG no protocolo superestimulatório P-36 em vacas Nelore. *Acta Scientiae Veterinariae* **35**(3), 1260 [Abstract]
- Barcelos, A.C.Z., Satrapa, R.A., Nogueira, M.F.G., Barros, and C.M (2006) Protocolo superestimulatório P-36 na raça Bonsmara: uso de eCG e atraso na indução da ovulação com LH. *Acta Scientiae Veterinariae* **34**(Suppl. 1), 514 [Abstract]
- Barile, L., Lionetti, V., Cervio, E., Matteucci, M., Gherghiceanu, M., Popescu, L.M., Torre, T., Siclari, F., Moccetti, T., and Vassalli, G. (2014) Extracellular vesicles from human cardiac progenitor cells inhibit cardiomyocyte apoptosis and improve cardiac function after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* **103**(4), 530-41
- Barros, C.M., Ereno, R.L., Simões, R.A., Fernandes, P., Buratini, J., and Nogueira, M.F. (2010) Use of knowledge regarding LH receptors to improve superstimulatory treatments in cattle. *Reprod Fertil Dev* **22**(1), 132-7

Barros, C.M., and Nogueira, M.F. (2001) Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology* **56**(9), 1483-96

Barros, C.M., and Nogueira, M.F.G. (2005) Superovulation in Zebu cattle: Protocol P-36 *Embryo Transfer Newsletter* **23**

Barros, C.M., Satrapa, R.A., Castilho, A.C., Fontes, P.K., Razza, E.M., Ereno, R.L., and Nogueira, M.F. (2013) Effect of superstimulatory treatments on the expression of genes related to ovulatory capacity, oocyte competence and embryo development in cattle. *Reprod Fertil Dev* **25**(1), 17-25

Baruselli, P.S., de Sá Filho, M.F., Martins, C.M., Nasser, L.F., Nogueira, M.F., Barros, C.M., and Bó, G.A. (2006) Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology* **65**(1), 77-88

Beaudoin, A.R., Piotte, M., Jolicoeur, C., Grenier, G., Grondin, G., Routhier, N., Gaudreau, J., and St-Jean, P. (1987) Lipid analysis of a novel type of cell secretion in the exocrine pancreas: the pancreasomes. *Biochim Biophys Acta* **922**(1), 62-6

Bellow, R.A., B., S.R., M., W.J., A., P.D., and Darling, A. (1991) Use of bovine FSH for superovulation and embryo production in beef heifers. *Theriogenology* **35**(6)

Berckmans, R.J., Sturk, A., van Tienen, L.M., Schaap, M.C., and Nieuwland, R. (2011) Cell-derived vesicles exposing coagulant tissue factor in saliva. *Blood* **117**(11), 3172-80

Berfelt, D.R., Lightfoot, K.C., and Adams, G.P. (1994) Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. *Theriogenology* **42**(6), 895-907

Bhatnagar, S., Shinagawa, K., Castellino, F.J., and Schorey, J.S. (2007) Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. *Blood* **110**(9), 3234-44

Bodensteiner, K.J., Wiltbank, M.C., Bergfelt, D.R., and Ginther, O.J. (1996) Alterations in follicular estradiol and gonadotropin receptors during development of bovine antral follicles. *Theriogenology* **45**(2), 499-512

Bousfield, G.R., Butnev, V.Y., Gotschall, R.R., Baker, V.L., and Moore, W.T. (1996) Structural features of mammalian gonadotropins. *Mol Cell Endocrinol* **125**(1-2), 3-19

Bó, G.A., Adams, G.P., Caccia, M., M., M., Pierson, R.A., and Mapletoft, R.J. (1995) Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Animal Reproduction Science* **34**(3)

Bó, G.A., Baruselli, P.S., Chesta, P.M., and Martins, C.M. (2006) The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. *Theriogenology* **65**(1), 89-101

- Bó, G.A., Baruselli, P.S., and Martínez, M.F. (2003) Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Anim Reprod Sci* **78**(3-4), 307-26
- Caby, M.P., Lankar, D., Vincendeau-Scherrer, C., Raposo, G., and Bonnerot, C. (2005) Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol* **17**(7), 879-87
- Campos, E., Moura, T.F., Oliva, A., Leandro, P., and Soveral, G. (2011) Lack of Aquaporin 3 in bovine erythrocyte membranes correlates with low glycerol permeation. *Biochem Biophys Res Commun* **408**(3), 477-81
- Castilho, C., Garcia, J.M., Renesto, A., Nogueira, G.P., and Brito, L.F. (2007) Follicular dynamics and plasma FSH and progesterone concentrations during follicular deviation in the first post-ovulatory wave in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Anim Reprod Sci* **98**(3-4), 189-96
- Chivet, M., Javalet, C., Laulagnier, K., Blot, B., Hemming, F.J., and Sadoul, R. (2014) Exosomes secreted by cortical neurons upon glutamatergic synapse activation specifically interact with neurons. *J Extracell Vesicles* **3**, 24722
- Cicero, A.L., Delevoeye, C., Gilles-Marsens, F., Loew, D., Dingli, F., Guéré, C., André, N., Vié, K., van Niel, G., and Raposo, G. (2015) Exosomes released by keratinocytes modulate melanocyte pigmentation. *Nat Commun* **6**, 7506
- Coleman, R.A., Lewin, T.M., Van Horn, C.G., and Gonzalez-Baró, M.R. (2002) Do long-chain acyl-CoA synthetases regulate fatty acid entry into synthetic versus degradative pathways? *J Nutr* **132**(8), 2123-6
- Coticchio, G., Sereni, E., Serrao, L., Mazzone, S., Iadarola, I., and Borini, A. (2004) What criteria for the definition of oocyte quality? *Ann N Y Acad Sci* **1034**, 132-44
- da Silveira, J.C., Veeramachaneni, D.N., Winger, Q.A., Carnevale, E.M., and 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. *Biol Reprod* **86**(3), 71
- de Jong, O.G., Verhaar, M.C., Chen, Y., Vader, P., Gremmels, H., Posthuma, G., Schiffelers, R.M., Gucek, M., and van Balkom, B.W. (2012) Cellular stress conditions are reflected in the protein and RNA content of endothelial cell-derived exosomes. *J Extracell Vesicles* **1**
- Dias, F.C., Costa, E., Adams, G.P., Mapletoft, R.J., Kastelic, J., Dochi, O., and Singh, J. (2013) Effect of duration of the growing phase of ovulatory follicles on oocyte competence in superstimulated cattle. *Reprod Fertil Dev* **25**(3), 523-30
- Donalson, L.E. (1989) Porcine, equine and ovine FSH in the superovulation of cattle. *Theriogenology* **31**(1), 183



Dorneles Tortorella, R., Ferreira, R., Tonello Dos Santos, J., Silveira de Andrade Neto, O., Barreta, M.H., Oliveira, J.F., Gonçalves, P.B., and Pereira Neves, J. (2013) The effect of equine chorionic gonadotropin on follicular size, luteal volume, circulating progesterone concentrations, and pregnancy rates in anestrous beef cows treated with a novel fixed-time artificial insemination protocol. *Theriogenology* **79**(8), 1204-9

Duffy, P., Crowe, M.A., Austin, E.J., Mihm, M., Boland, M.P., and Roche, J.F. (2004) The effect of eCG or estradiol at or after norgestomet removal on follicular dynamics, estrus and ovulation in early post-partum beef cows nursing calves. *Theriogenology* **61**(4), 725-34

Dutta-Roy, A.K. (2000) Cellular uptake of long-chain fatty acids: role of membrane-associated fatty-acid-binding/transport proteins. *Cell Mol Life Sci* **57**(10), 1360-72

Edashige, K., Ohta, S., Tanaka, M., Kuwano, T., Valdez, D.M., Hara, T., Jin, B., Takahashi, S., Seki, S., Koshimoto, C., and Kasai, M. (2007) The role of aquaporin 3 in the movement of water and cryoprotectants in mouse morulae. *Biol Reprod* **77**(2), 365-75

El-Sayed, A., Hoelker, M., Rings, F., Salilew, D., Jennen, D., Tholen, E., Sirard, M.A., Schellander, K., and Tesfaye, D. (2006) Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. *Physiol Genomics* **28**(1), 84-96

Eppig, J.J. (2001) Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* **122**(6), 829-38

Eppig, J.J., Wigglesworth, K., Pendola, F., and Hirao, Y. (1997) Murine oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells. *Biol Reprod* **56**(4), 976-84

Escola, J.M., Kleijmeer, M.J., Stoorvogel, W., Griffith, J.M., Yoshie, O., and Geuze, H.J. (1998) Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J Biol Chem* **273**(32), 20121-7

Feuerstein, P., Cadoret, V., Dalbies-Tran, R., Guerif, F., Bidault, R., and Royere, D. (2007) Gene expression in human cumulus cells: one approach to oocyte competence. *Hum Reprod* **22**(12), 3069-77

Feuerstein, P., Cadoret, V., Dalbies-Tran, R., Guérif, F., and Royère, D. (2006) [Oocyte-cumulus dialog]. *Gynecol Obstet Fertil* **34**(9), 793-800

Figueiredo, R.A., Barros, C.M., Pinheiro, O.L., and Soler, J.M. (1997) Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology* **47**(8), 1489-505

Fortune, J.E. (1994) Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod* **50**(2), 225-32

- Fortune, J.E., Cushman, R.A., Wahl, C.M., and Kito, S. (2000) The primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol* **163**(1-2), 53-60
- Friand, V., David, G., and Zimmermann, P. (2015) Syntenin and syndecan in the biogenesis of exosomes. *Biol Cell*
- Gilchrist, R.B. (2011) Recent insights into oocyte-follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to in vitro maturation. *Reprod Fertil Dev* **23**(1), 23-31
- Gilchrist, R.B., Ritter, L.J., and Armstrong, D.T. (2004) Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim Reprod Sci* **82-83**, 431-46
- Gimenes, L.U., Sá Filho, M.F., Carvalho, N.A., Torres-Júnior, J.R., Souza, A.H., Madureira, E.H., Trinca, L.A., Sartorelli, E.S., Barros, C.M., Carvalho, J.B., Mapletoft, R.J., and Baruselli, P.S. (2008) Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. *Theriogenology* **69**(7), 852-8
- Ginther, O.J., Beg, M.A., Donadeu, F.X., and Bergfelt, D.R. (2003) Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Anim Reprod Sci* **78**(3-4), 239-57
- Ginther, O.J., Knopf, L., and Kastelic, J.P. (1989) Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *J Reprod Fertil* **87**(1), 223-30
- Gonzalez-Begne, M., Lu, B., Han, X., Hagen, F.K., Hand, A.R., Melvin, J.E., and Yates, J.R. (2009) Proteomic analysis of human parotid gland exosomes by multidimensional protein identification technology (MudPIT). *J Proteome Res* **8**(3), 1304-14
- Goulding, D., Williams, D.H., Duffy, P., Boland, M.P., and Roche, J.F. (1990) Superovulation in heifers given FSH initiated either at day 2 or day 10 of the estrous cycle. *Theriogenology* **34**(4), 767-78
- Gouveia Nogueira, M.F., Barros, B.J., Teixeira, A.B., Trinca, L.A., D'Occhio, M.J., and Barros, C.M. (2002) Embryo recovery and pregnancy rates after the delay of ovulation and fixed time insemination in superstimulated beef cows. *Theriogenology* **57**(6), 1625-34
- Guilbault, L.A., Grasso, F., Lussier, J.G., Rouillier, P., and Matton, P. (1991) Decreased superovulatory responses in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle. *J Reprod Fertil* **91**(1), 81-9
- Harding, C., Heuser, J., and Stahl, P. (1983) Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol* **97**(2), 329-39

- Hung, W.T., Hong, X., Christenson, L.K., and McGinnis, L.K. (2015) Extracellular Vesicles from Bovine Follicular Fluid Support Cumulus Expansion. *Biol Reprod* **93**(5), 117
- Iero, M., Valenti, R., Huber, V., Filipazzi, P., Parmiani, G., Fais, S., and Rivoltini, L. (2008) Tumour-released exosomes and their implications in cancer immunity. *Cell Death Differ* **15**(1), 80-8
- Jin, B., Kawai, Y., Hara, T., Takeda, S., Seki, S., Nakata, Y., Matsukawa, K., Koshimoto, C., Kasai, M., and Edashige, K. (2011) Pathway for the movement of water and cryoprotectants in bovine oocytes and embryos. *Biol Reprod* **85**(4), 834-47
- Johnsen, G.M., Weedon-Fekjaer, M.S., Tobin, K.A., Staff, A.C., and Duttaroy, A.K. (2009) Long-chain polyunsaturated fatty acids stimulate cellular fatty acid uptake in human placental choriocarcinoma (BeWo) cells. *Placenta* **30**(12), 1037-44
- Johnstone, R.M., Adam, M., Hammond, J.R., Orr, L., and Turbide, C. (1987) Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem* **262**(19), 9412-20
- Joyce, I.M., Pendola, F.L., Wigglesworth, K., and Eppig, J.J. (1999) Oocyte regulation of kit ligand expression in mouse ovarian follicles. *Dev Biol* **214**(2), 342-53
- Juengel, J.L., and McNatty, K.P. (2005) The role of proteins of the transforming growth factor-beta superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. *Hum Reprod Update* **11**(2), 143-60
- Jump, D.B. (2009) Mammalian fatty acid elongases. *Methods Mol Biol* **579**, 375-89
- Kapsogeorgou, E.K., Abu-Helu, R.F., Moutsopoulos, H.M., and Manoussakis, M.N. (2005) Salivary gland epithelial cell exosomes: A source of autoantigenic ribonucleoproteins. *Arthritis Rheum* **52**(5), 1517-21
- Khan, S., Jutzy, J.M., Aspe, J.R., McGregor, D.W., Neidigh, J.W., and Wall, N.R. (2011) Survivin is released from cancer cells via exosomes. *Apoptosis* **16**(1), 1-12
- King, L.S., Kozono, D., and Agre, P. (2004) From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(9), 687-98
- Krisher, R.L. (2004) The effect of oocyte quality on development. *J Anim Sci* **82 E-Suppl**, E14-23
- Kucharzewska, P., and Belting, M. (2013) Emerging roles of extracellular vesicles in the adaptive response of tumour cells to microenvironmental stress. *J Extracell Vesicles* **2**

- Lonergan, P., Monaghan, P., Rizos, D., Boland, M.P., and Gordon, I. (1994) Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Mol Reprod Dev* **37**(1), 48-53
- Looney, C., and Bondioli, K. (1998) Bovine FSH produced by recombinant DNA technology. *Theriogenology* **29**(1)
- Loureiro, B., Oliveira, L.J., Favoreto, M.G., and Hansen, P.J. (2011) Colony-stimulating factor 2 inhibits induction of apoptosis in the bovine preimplantation embryo. *Am J Reprod Immunol* **65**(6), 578-88
- Lucy, M.C., Savio, J.D., Badinga, L., De La Sota, R.L., and Thatcher, W.W. (1992) Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J Anim Sci* **70**(11), 3615-26
- Lv, L.H., Wan, Y.L., Lin, Y., Zhang, W., Yang, M., Li, G.L., Lin, H.M., Shang, C.Z., Chen, Y.J., and Min, J. (2012) Anticancer drugs cause release of exosomes with heat shock proteins from human hepatocellular carcinoma cells that elicit effective natural killer cell antitumor responses in vitro. *J Biol Chem* **287**(19), 15874-85
- Mapletoft, R.J., Steward, K.B., and Adams, G.P. (2002) Recent advances in the superovulation in cattle. *Reprod Nutr Dev* **42**(6), 601-11
- Mattos, M.C., Bastos, M.R., Guardieiro, M.M., Carvalho, J.O., Franco, M.M., Mourão, G.B., Barros, C.M., and Sartori, R. (2011) Improvement of embryo production by the replacement of the last two doses of porcine follicle-stimulating hormone with equine chorionic gonadotropin in Sindhi donors. *Anim Reprod Sci* **125**(1-4), 119-23
- Maurel, M.C., Ban, E., Bidart, J.M., and Combarrous, Y. (1992) Immunochemical study of equine chorionic gonadotropin (eCG/PMSG): antigenic determinants on alpha- and beta-subunits. *Biochim Biophys Acta* **1159**(1), 74-80
- McNatty, K.P., Moore, L.G., Hudson, N.L., Quirke, L.D., Lawrence, S.B., Reader, K., Hanrahan, J.P., Smith, P., Groome, N.P., Laitinen, M., Ritvos, O., and Juengel, J.L. (2004) The oocyte and its role in regulating ovulation rate: a new paradigm in reproductive biology. *Reproduction* **128**(4), 379-86
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., and Yamanaka, S. (2003) The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* **113**(5), 631-42
- Moon, Y.A., Hammer, R.E., and Horton, J.D. (2009) Deletion of ELOVL5 leads to fatty liver through activation of SREBP-1c in mice. *J Lipid Res* **50**(3), 412-23
- Murphy, B.D., and Martinuk, S.D. (1991) Equine chorionic gonadotropin. *Endocr Rev* **12**(1), 27-44

Nilsson, E., and Skinner, M.K. (2001) Cellular interactions that control primordial follicle development and folliculogenesis. *J Soc Gynecol Investig* **8**(1 Suppl Proceedings), S17-20

Niwa, H., Miyazaki, J., and Smith, A.G. (2000) Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* **24**(4), 372-6

Nolte-'t Hoen, E.N., Buermans, H.P., Waasdorp, M., Stoorvogel, W., Wauben, M.H., and 't Hoen, P.A. (2012) Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Res* **40**(18), 9272-85

Orrenius, S., Gogvadze, V., and Zhivotovsky, B. (2007) Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **47**, 143-83

Parolini, I., Federici, C., Raggi, C., Lugini, L., Palleschi, S., De Milito, A., Coscia, C., Iessi, E., Logozzi, M., Molinari, A., Colone, M., Tatti, M., Sargiacomo, M., and Fais, S. (2009) Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *J Biol Chem* **284**(49), 34211-22

Pesce, M., and Schöler, H.R. (2000) Oct-4: control of totipotency and germline determination. *Mol Reprod Dev* **55**(4), 452-7

Pessoa, G.A., Martini, A.P., Carloto, G.W., Rodrigues, M.C., Claro Júnior, I., Baruselli, P.S., Brauner, C.C., Rubin, M.I., Corrêa, M.N., Leivas, F.G., and Sá Filho, M.F. (2015) Different doses of equine chorionic gonadotropin on ovarian follicular growth and pregnancy rate of suckled *Bos taurus* beef cows subjected to timed artificial insemination protocol. *Theriogenology*

Pincus, G., and Enzmann, E.V. (1935) THE COMPARATIVE BEHAVIOR OF MAMMALIAN EGGS IN VIVO AND IN VITRO : I. THE ACTIVATION OF OVARIAN EGGS. *J Exp Med* **62**(5), 665-75

Pisitkun, T., Shen, R.F., and Knepper, M.A. (2004) Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(36), 13368-73

Pontes, J.H., Nonato-Junior, I., Sanches, B.V., Ereno-Junior, J.C., Uvo, S., Barreiros, T.R., Oliveira, J.A., Hasler, J.F., and Seneda, M.M. (2009) Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology* **71**(4), 690-7

Raposo, G., Nijman, H.W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C.V., Melief, C.J., and Geuze, H.J. (1996) B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* **183**(3), 1161-72

- Richards, J.S., Jahnsen, T., Hedin, L., Lifka, J., Ratoosh, S., Durica, J.M., and Goldring, N.B. (1987) Ovarian follicular development: from physiology to molecular biology. *Recent Prog Horm Res* **43**, 231-76
- Rizos, D., Ward, F., Duffy, P., Boland, M.P., and Lonergan, P. (2002) Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev* **61**(2), 234-48
- Roberts, A.J., Grizzle, J.M., and Echterkamp, S.E. (1994) Follicular development and superovulation response in cows administered multiple FSH injections early in the estrous cycle. *Theriogenology* **42**(6), 917-29
- Sartorelli, E.S., Carvalho, L.M., Bergfelt, D.R., Ginther, O.J., and Barros, C.M. (2005) Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. *Theriogenology* **63**(9), 2382-94
- Savio, J.D., Keenan, L., Boland, M.P., and Roche, J.F. (1988) Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. *J Reprod Fertil* **83**(2), 663-71
- Simeone, A., Acampora, D., Gulisano, M., Stornaiuolo, A., and Boncinelli, E. (1992) Nested expression domains of four homeobox genes in developing rostral brain. *Nature* **358**(6388), 687-90
- Simeone, A., Puelles, E., and Acampora, D. (2002) The Otx family. *Curr Opin Genet Dev* **12**(4), 409-15
- Simeone, A., Puelles, E., Omodei, D., Acampora, D., Di Giovannantonio, L.G., Di Salvio, M., Mancuso, P., and Tomasetti, C. (2011) Otx genes in neurogenesis of mesencephalic dopaminergic neurons. *Dev Neurobiol* **71**(8), 665-79
- Simons, M., and Raposo, G. (2009) Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol* **21**(4), 575-81
- Sirard, M.A. (2001) Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology* **55**(6), 1241-54
- Sirard, M.A., Richard, F., Blondin, P., and Robert, C. (2006) Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* **65**(1), 126-36
- Sirois, J., and Fortune, J.E. (1988) Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol Reprod* **39**(2), 308-17
- Sohel, M.M., Hoelker, M., Noforesti, S.S., Salilew-Wondim, D., Tholen, E., Looft, C., Rings, F., Uddin, M.J., Spencer, T.E., Schellander, K., and Tesfaye, D. (2013) Exosomal and Non-

Exosomal Transport of Extra-Cellular microRNAs in Follicular Fluid: Implications for Bovine Oocyte Developmental Competence. *PLoS One* **8**(11), e78505

Stojkovic, M., Machado, S.A., Stojkovic, P., Zakhartchenko, V., Hutzler, P., Gonçalves, P.B., and Wolf, E. (2001) Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biol Reprod* **64**(3), 904-9

Su, Y.Q., Sugiura, K., and Eppig, J.J. (2009) Mouse oocyte control of granulosa cell development and function: paracrine regulation of cumulus cell metabolism. *Semin Reprod Med* **27**(1), 32-42

Su, Y.Q., Sugiura, K., Wigglesworth, K., O'Brien, M.J., Affourtit, J.P., Pangas, S.A., Matzuk, M.M., and Eppig, J.J. (2008) Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. *Development* **135**(1), 111-21

Sudano, M.J., Paschoal, D.M., Rascado, T.a.S., Magalhães, L.C., Crocomo, L.F., de Lima-Neto, J.F., and Landim-Alvarenga, F.a.C. (2011) Lipid content and apoptosis of in vitro-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. *Theriogenology* **75**(7), 1211-20

Sugino, N. (2007) The role of oxygen radical-mediated signaling pathways in endometrial function. *Placenta* **28 Suppl A**, S133-6

Svensson, K.J., Kucharzewska, P., Christianson, H.C., Sköld, S., Löfstedt, T., Johansson, M.C., Mörgelin, M., Bengzon, J., Ruf, W., and Belting, M. (2011) Hypoxia triggers a proangiogenic pathway involving cancer cell microvesicles and PAR-2-mediated heparin-binding EGF signaling in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(32), 13147-52

Tan, C.Y., Virtue, S., Bidault, G., Dale, M., Hagen, R., Griffin, J.L., and Vidal-Puig, A. (2015) Brown Adipose Tissue Thermogenic Capacity Is Regulated by Elovl6. *Cell Rep* **13**(10), 2039-47

Taylor, D.D., and Doellgast, G.J. (1979) Quantitation of peroxidase-antibody binding to membrane fragments using column chromatography. *Anal Biochem* **98**(1), 53-9

Taylor, D.D., and Gercel-Taylor, C. (2013) The origin, function, and diagnostic potential of RNA within extracellular vesicles present in human biological fluids. *Front Genet* **4**, 142

Théry, C. (2011) Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. *F1000 Biol Rep* **3**, 15

Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., and Clayton, A. (2006) Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* **Chapter 3**, Unit 3.22

- Théry, C., Boussac, M., Véron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J., and Amigorena, S. (2001) Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol* **166**(12), 7309-18
- Théry, C., Ostrowski, M., and Segura, E. (2009) Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* **9**(8), 581-93
- Trams, E.G., Lauter, C.J., Salem, N., and Heine, U. (1981) Exfoliation of membrane ectoenzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim Biophys Acta* **645**(1), 63-70
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J., and Lötvall, J.O. (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* **9**(6), 654-9
- Viana, J.H.V. (2012) Levantamento estatístico da produção de embriões bovinos no Brasil em 2011: mudanças e tendências futuras. In 'Jornal O Embrião.' 51º edn.)
- Wang, J., Silva, M., Haas, L.A., Morsci, N.S., Nguyen, K.C., Hall, D.H., and Barr, M.M. (2014) *C. elegans* ciliated sensory neurons release extracellular vesicles that function in animal communication. *Curr Biol* **24**(5), 519-25
- Wilson, J.M., Jones, A.L., Moore, K., Looney, C.R., and Bondioli, K.R. (1993) Superovulation of cattle with a recombinant-DNA bovine follicle stimulating hormone. **33**(1-4), *Animal Reproduction Science*
- Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., and Amigorena, S. (1998) Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med* **4**(5), 594-600



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em seu conceito inicial, o presente trabalho surgiu como forma de contextualizar e maximizar os achados da modulação positiva de genes relacionados com a competência oocitária em vacas Nelore submetidas à superestimulação ovariana. Deste modo, em primeiro plano, esperávamos que os embriões produzidos a partir dos CCOs recuperados de vacas submetidas ao tratamento superestimulatório apresentassem maior expressão de marcadores envolvidos com a melhoria da sua qualidade. De fato, o perfil gênico encontrado nesses embriões, fornecem indicativos dessa melhoria e corroboram com nosso pensamento inicial.

Somando-se aos indícios de que os tratamentos superestimulatórios modificam o microambiente folicular e sabendo-se da presença de VEs no fluido folicular bovino e o seu papel na comunicação celular, resolvemos investigar se os exossomos estavam envolvidos nessa modulação gênica anteriormente reportada e se, a adição dessas vesículas na MIV, aumentaria a taxa de blastocistos produzida. No entanto, a adição desses exossomos durante a MIV não alterou a taxa de blastocistos produzidos *in vitro*.

Ainda não sabemos, se os embriões produzidos nos grupos onde houve adição dos exossomos de vacas superestimuladas são de qualidade superior. Para termos pelo menos um indicativo disso, serão realizadas análises da expressão gênica desses embriões. Além disso, prospectamos analisar o conteúdo desses exossomos, investigando a presença de mRNA e miRNAs que estejam envolvidos no controle dos genes relacionados com a competência oocitária (*BMP15* e *GDF9*), criando, assim, um rede biológica entre essas alterações e o conteúdo dos exossomos.