

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**ACÚMULO DE TRANSCRITOS EM CÉLULAS DO
CUMULUS CULTIVADAS NA PRESENÇA DO
PRECURSOR DO PEPTÍDEO NATRIURÉTICO TIPO C E
SEUS EFEITOS SOBRE A MATURAÇÃO E AQUISIÇÃO
DA COMPETÊNCIA DO OÓCITO NA ESPÉCIE BOVINA**

Giovana Barros Nunes

Médica Veterinária

2018

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**ACÚMULO DE TRANSCRITOS EM CÉLULAS DO CUMULUS
CULTIVADAS NA PRESENÇA DO PRECURSOR DO PEPTÍDEO
NATRIURÉTICO TIPO C E SEUS EFEITOS SOBRE A
MATURAÇÃO E AQUISIÇÃO DA COMPETÊNCIA DO OÓCITO
NA ESPÉCIE BOVINA**

Giovana Barros Nunes
Médica Veterinária

2018

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**ACÚMULO DE TRANSCRITOS EM CÉLULAS DO CUMULUS
CULTIVADAS NA PRESENÇA DO PRECURSOR DO PEPTÍDEO
NATRIURÉTICO TIPO C E SEUS EFEITOS SOBRE A
MATURAÇÃO E AQUISIÇÃO DA COMPETÊNCIA DO OÓCITO
NA ESPÉCIE BOVINA**

Giovana Barros Nunes

Orientadora: Profa. Adj. Gisele Zoccal Mingoti

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, área de Reprodução Animal

M972a Nunes, Giovana Barros
Acúmulo de transcritos em células do cumulus cultivadas na presença do precursor do peptídeo natriurético tipo C e seus efeitos sobre a maturação e aquisição da competência na espécie bovina / Giovana Barros Nunes. -- Jaboticabal, 2018
iv, 51 p: il.; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018
Orientadora: Gisele Zoccal Mingoti
Banca examinadora: Cláudia Lima Verde Leal, Lindsay Unno Gimenes.

1. Maturação *in vitro*. 2. Cultivo de pré-maturação 3. Bloqueio meiótico. 4. Oócito. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:591.16:636.2



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ACÚMULO DE TRANSCRITOS EM CÉLULAS DO CUMULUS CULTIVADAS NA PRESENÇA DO PRECURSOR DO PEPTÍDEO NATRIURÉTICO TIPO C E SEUS EFEITOS SOBRE A MATURAÇÃO E AQUISIÇÃO DA COMPETÊNCIA DO OÓCITO NA ESPÉCIE BOVINA

AUTORA: GIOVANA BARROS NUNES

ORIENTADORA: GISELE ZOCCAL MINGOTI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em MEDICINA VETERINÁRIA, área: REPRODUÇÃO ANIMAL pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / FMV/UNESP - Araçatuba

Profa. Dra. LINDSAY UNNO GIMENES

Depto. de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Profa. Dra. CLAUDIA LIMA VERDE LEAL

Departamento de Medicina Veterinária / Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP / Pirassununga/SP

Jaboticabal, 28 de fevereiro de 2018

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Giovana Barros Nunes – nascida em Presidente Prudente-SP, aos 30 dias do mês de Novembro de 1992. Concluiu o ensino médio no Colégio Criativo/Objetivo, na cidade de Rancharia-SP, em Dezembro de 2010. Ingressou no curso de Graduação em Medicina Veterinária, na Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Câmpus de Araçatuba-SP, em Março de 2011. Concluiu o ensino superior em Medicina Veterinária em Dezembro de 2015. Ingressou no curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, nível de Mestrado e área de concentração de Reprodução Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP Câmpus de Jaboticabal-SP, em Março de 2016, sob orientação da Profa. Adj. Gisele Zoccal Mingoti, com bolsa de mestrado CAPES. Aprovada no Exame de Seleção para o curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária e área de concentração de Reprodução Animal, Nível de Doutorado nesta mesma instituição em outubro de 2017, com início previsto para março de 2018.

EPÍGRAFE

“A persistência é o caminho do êxito.”

Charles Chaplin

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, José Adalberto e Elza, por todo apoio e amor incondicional. Ao meu irmão, Felipe, que trilha junto a mim o sonho da carreira acadêmica. Ao meu noivo Márcio, pelo apoio, amor e paciência.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora, por me ampararem sempre no amor.

À Profa. Dra. Gisele Zoccal Mingoti, pela orientação, confiança e ensinamentos.

As minhas amigas de profissão e laboratório Priscila Chediek Dall'Acqua, Beatriz C. S. Leão, Nathália S. S. Rocha-Frigoni e Luana Teixeira Rodrigues por todo o apoio e ensinamentos compartilhados.

Ao professor Marcelo Nogueira e a pós-graduanda Patrícia Kubo Fontes, pelos ensinamentos e colaborações para que este trabalho pudesse ser realizado.

Ao técnico do laboratório, Alexandre Teixeira, pelo companheirismo, além do auxílio necessário para a realização do experimento e funcionamento do laboratório.

Ao funcionário Adão Custódio por providenciar o material necessário para a realização do experimento.

Às estagiárias que acompanharam e ajudaram na execução do experimento: Cíntia Rodrigues e Maria Isabela Azeredo.

As professoras componentes da banca examinadora, Profa. Dra. Claudia Lima Verde Leal e Profa. Dra. Lindsay Unno Gimenes, pelos ensinamentos e contribuições na defesa.

Aos meus pais, irmão e demais familiares por todo o apoio e amor a mim oferecido, e pela felicidade compartilhada em me verem realizando mais um sonho.

Ao meu noivo Márcio Martins, pela amizade, amor e apoio incondicional. Além de paciência para entender minha rotina um tanto quanto diferente.

A minha amiga Bruna Bittar, pela amizade de longa data e por me apoiar incondicionalmente.

As minhas amigas Laís Tubone e Raphaela Araújo, pela amizade iniciada na faculdade e que se perdura até hoje.

As minhas amigas Vivian Senteio e Jaqueline Senteio, por serem minhas gêmeas preferidas e me apoiarem mesmo de longe.

A minha amiga Fernanda Werneck, por me apoiar na jornada de pós-graduação e se sentir tão feliz quanto eu pelas minhas conquistas.

À CAPES pela bolsa de estudos.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal da Universidade Estadual Paulista e ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal pela oportunidade de realizar o mestrado.

À Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista por ter permitido a minha formação profissional. E por permitir o uso das instalações do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal para a realização do experimento.

À toda equipe do nosso tão querido Laboratório de Fisiologia da Reprodução (#labfisiorep), por terem contribuído de alguma forma com esse trabalho.

APOIO FINANCEIRO

Este projeto teve bolsa de estudos concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1	MATURAÇÃO OOCITÁRIA	4
2.1.1	Maturação nuclear	4
2.1.2	Maturação citoplasmática	7
2.2	INIBIDORES DA MEIOSE	7
3	MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1	SELEÇÃO E CULTIVO DE OÓCITOS	11
3.2	AVALIAÇÃO DO REMODELAMENTO DA CROMATINA E PROGRESSÃO MEIÓTICA	11
3.3	AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS MICROFILAMENTOS DE ACTINA	13
3.4	EXTRAÇÃO DO RNA	14
3.5	TRANSCRIÇÃO REVERSA E EXPRESSÃO GÊNICA	14
3.6	PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES BOVINOS	20
3.7	Terminal Deoxynucleotyl Transferase Uracil Nick and Labeling – TUNEL	21
3.8	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	22
3.8.1	<i>Experimento I: Acúmulo de transcritos nas células do cumulus e sua relação com a configuração da cromatina e dinâmica dos microfilamentos de oócitos bovinos pré-maturados por 8h na presença de NPPC</i>	22
3.8.2	<i>Experimento II: Acúmulo de transcritos nas células do cumulus e sua relação com a configuração da cromatina e dinâmica dos microfilamentos ao término do cultivo de maturação de oócitos bovinos pré-maturados na presença de NPPC</i>	23
3.8.3	<i>Experimento III: Aquisição da competência para o desenvolvimento embrionário em oócitos bovinos pré-maturados in vitro por 8h na presença de NPPC</i>	23
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	23
4	RESULTADOS	24
4.1	Experimento I	24
4.2	Experimento II	31
4.3	Experimento III	34
5	DISCUSSÃO	36
6	CONCLUSÃO	42
7	REFERÊNCIAS	44



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



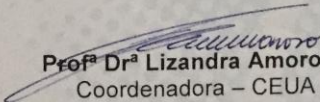
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado **"Efeitos da pré-maturação e maturação *in vitro* suplementadas com exossomos sobre a competência de oócitos bovinos derivados de folículos de diferentes diâmetros"**, protocolo nº 9.533/16, sob a responsabilidade da Profª Drª Gisele Zoccal Mingoti, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 06 de julho de 2016.

Vigência do Projeto	15/12/2016 a 20/12/2017
Espécie / Linhagem	Bovinos (ovários)
Nº de animais	
Peso / Idade	
Sexo	Fêmeas
Origem	Frigoríficos

Jaboticabal, 06 de julho de 2016.


Profª Drª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

ACÚMULO DE TRANSCRITOS EM CÉLULAS DO CUMULUS CULTIVADAS NA PRESENÇA DO PRECURSOR DO PEPTÍDEO NATRIURÉTICO TIPO C E SEUS EFEITOS SOBRE A MATURAÇÃO E AQUISIÇÃO DA COMPETÊNCIA DO OÓCITO NA ESPÉCIE BOVINA

RESUMO – Este estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o efeito do precursor do peptídeo natriurético tipo C (NPPC) durante o cultivo de pré-maturação *in vitro* (pré-MIV) de oócitos bovinos sobre: 1) a progressão da maturação nuclear; 2) a expressão gênica das células do cumulus e 3) a aquisição da competência do oócito para o desenvolvimento embrionário *in vitro*. Os complexos cumulus-oócito (CCOs) foram pré-MIV com 100 nM NPPC por 8 horas (grupo NPPC) e, ao final do período, foram lavados para completa remoção do NPPC e submetidos à MIV por 22h. Após 8h de pré-MIV e após 8h de pré-MIV seguidas de 22h de MIV (duração total do cultivo = 30h) foram avaliadas a progressão da maturação nuclear e a expressão relativa de mRNA nas células do cumulus. O grupo controle (C) foi maturado na ausência de NPPC por até 30h, e as mesmas avaliações anteriores foram realizadas imediatamente após a remoção do ambiente folicular (C0), após 8h de cultivo (C8), após 22h de cultivo (C22) e após 30h de cultivo (C30). Em outro experimento, cujos tratamentos foram idênticos aos supramencionados, os oócitos foram fecundados ao término da MIV e foi avaliado o desenvolvimento embrionário até a fase de blastocistos. Após 8h de cultivo de pré-MIV, a análise da progressão da meiose demonstrou que o grupo C0 apresentou 58,9% de estruturas com configuração de GV1, enquanto que o grupo C8 apresentou apenas 13,9% de estruturas nesta configuração ($P < 0,05$). A proporção de GV1 no grupo NPPC foi semelhante a ambos estes grupos (22,8%; $P > 0,05$). Por outro lado, o grupo C8 apresentou maior taxa de GV3 em relação ao C0 (53,1% vs. 3,62%; $P < 0,05$), sem diferenças com o grupo NPPC (38,7%; $P > 0,05$). Ao final do cultivo de MIV, não foi observada diferença entre os grupos (C22 vs. NPPC vs. C30) com relação à maturação nuclear, todavia, houve maior taxa de oócitos degenerados no C30 em comparação com C22 (11,4% vs. 2,8%; $P < 0,05$). A análise da expressão relativa de genes das células do cumulus após 8h de pré-MIV com NPPC evidenciou aumento ($P < 0,05$) na expressão de genes relacionados à expansão destas células (*GREM1*, *PTGS2/COX2*, *PTX3*, *TNFAIP6* e *VCAM*), à maturação oocitária (*BDNF*, *EGFR*, *NOS3*, *PDE5A*, *PRKCD* e *STAT3*) e ao desenvolvimento embrionário (*IGF1R*, *KRT8* e *LUM*). Ao final do cultivo de MIV, observou-se no grupo NPPC que o gene *PTX3*, relacionado à expansão das células do cumulus, além dos genes *AREG* e *BDNF*, relacionados à maturação oocitária, e o gene *LUM*, relacionado ao desenvolvimento embrionário estavam mais expressos em comparação com o grupo C30 ($P < 0,05$). Com relação ao desenvolvimento embrionário, os grupos experimentais não apresentaram diferença ($P > 0,05$) quanto à taxa de clivagem (média de 73,22%). Embora o grupo NPPC não tenha diferido ($P > 0,05$) de C22 e C30 quanto à taxa de blastocistos, houve diferença entre C22 e C30 (69,3 vs. 37,4; $P < 0,05$). Todavia, não houve diferença entre os grupos com relação ao número de células totais (blastômeros) e apoptóticas ($P > 0,05$). Em conclusão, o cultivo de pré-MIV de oócitos bovinos por 8h com 100nM NPPC não bloqueou a retomada da meiose,

mas a progressão da meiose ocorreu de forma mais lenta e impediu o envelhecimento e degeneração dos oócitos. O cultivo de oócitos por tempo prolongado (30h) na ausência de NPPC foi prejudicial para o desenvolvimento embrionário, mas o tratamento com NPPC (8h pré-MIV+22h MIV = duração total de 30h) reverteu parcialmente este índice.

Palavras-chave: maturação *in vitro*, cultivo de pré-maturação, bloqueio meiótico, oócito.

TRANSCRIPTS ACCUMULATION IN CUMULUS CELLS CULTURED WITH C-TYPE NATRIURETIC PEPTIDE PRECURSOR AND ITS EFFECTS ON BOVINE OOCYTE MATURATION AND ACQUISITION OF COMPETENCE

ABSTRACT - The aim of this study was to evaluate the effect of the C-type natriuretic peptide precursor (NPPC) during pre *in vitro* maturation culture (pre-IVM) of bovine oocytes on: 1) nuclear maturation progress; 2) gene expression in cumulus cells and 3) acquisition of competence for *in vitro* embryo development. Cumulus oocyte complexes (COCs) were pre-IVM with 100 nM NPPC for 8 hours (NPPC group) and then were washed for the complete removal of NPPC and submitted to IVM for 22h. After 8h pre-IVM followed by 22h IVM (total culture time = 30h) oocytes were evaluated for nuclear maturation progress and cumulus cells for relative mRNA expression. Control group (C) was IVM in the absence of NPPC for up to 30h and the same evaluations were made immediately after follicle removal (C0) and after 8h (C8), 22h (C22) and after 30h of culture (C30). In another experiment with the same treatment, the oocytes were fertilized at the end of IVM and embryo development to the blastocyst stage was evaluated. After 8 hours of pre-IVM culture, meiosis progression analysis showed 58.9% of oocytes in GV1 configuration in C0, while C8 had only 13.9% ($P<0.05$). The GV1 rates in NPPC did not differ from any group (22.8%; $P>0.05$). On the other hand, C8 showed higher rates of GV3 in comparison with C0 (53.1% vs. 3.62%; $p<0.05$) and no differences compared to NPPC (38.7%; $P<0.05$). At the end of IVM culture, no differences between groups (C22 vs. NPPC vs. C30) were observed in nuclear maturation, however, higher rates of degenerated oocytes were observed in C30 in comparison with C22 (11.4% vs. 2.8%; $P<0.05$). The relative gene expression analysis in cumulus cells after 8h pre-IVM with NPPC showed an up-regulation in genes related to cumulus cells expansion (*GREM1*, *PTGS2/COX2*, *PTX3*, *TNFAIP6* and *VCAM*), oocyte maturation (*BDNF*, *EGFR*, *NOS3*, *PDE5A*, *PRKCD* e *STAT3*) and embryo development (*IGF1R*, *KRT8* and *LUM*). At the end of IVM culture, the cumulus cells expansion related gene, *PTX3*, the oocyte maturation genes, *AREG* and *BDNF*, and the embryo development gene, *LUM*, were up-regulated in NPPC in comparison with C30 ($p<0.05$). Regarding embryo development, the cleavage rates did not differ in experimental groups (mean around 73,22%). Besides, blastocyst rates did not differ between NPPC ($P>0.05$) and the other groups, but there was a difference between C22 and C30 (69.3 vs. 37.4%; $P<0.05$). There was no difference between the groups in total cell number (blastomeres) and apoptotic cells ($P<0.05$). In conclusion, the pre-IVM culture of bovine oocytes for 8h with 100nM NPPC did not block meiosis resumption, but meiosis progression occurred more slowly and prevented aging and degeneration of the oocytes. The prolonged time of oocyte culture (30h) in the absence of NPPC was detrimental to embryo development, but NPPC treatment (8h pre-IVM + 22h IVM = total duration of 30h) partially reversed this effect.

Keywords: *in vitro* maturation, pre *in vitro* maturation culture, meiotic block, oocyte

1 INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos consiste em uma biotecnologia da reprodução assistida que vem sendo amplamente empregada em programas comerciais com o intuito de otimizar o potencial reprodutivo das fêmeas. Em 2015, a produção mundial *in vitro* de embriões bovinos ultrapassou a casa dos 600 mil, igualando-se à produção de embriões *in vivo* (dados da Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões - IETS 2016). No entanto, a PIVE em bovinos ainda apresenta índices insatisfatórios quanto às taxas de desenvolvimento embrionário, prenhez e nascimentos saudáveis, se comparadas às taxas obtidas *in vivo* (MOORE; HASLER, 2017). Os resultados insatisfatórios devem-se, em grande parte, às condições dos sistemas de maturação *in vitro* (MIV) que não atendem às necessidades da população heterogênea de oócitos submetidas à esta etapa e, conseqüentemente, proporcionam uma aquisição sub-ótima da competência oocitária (SMITZ et al., 2011).

In vivo, a cada ciclo estral nas fêmeas bovinas, há o recrutamento de um “pool” de folículos ovarianos. No entanto, apenas um destes folículos cresce até o estágio pré-ovulatório, enquanto os demais folículos recrutados entram em processo de atresia (revisado por STEVENSON; BRITT, 2017). Durante o crescimento e desenvolvimento do “pool” de folículos, os oócitos permanecem com a meiose bloqueada no estágio de diplóteno da prófase I (PI), caracterizado pela presença do envelope nuclear (vesícula germinativa – GV, do termo em inglês “germinal vesicle”) e cromatina fracamente condensada (van den HURK; ZHAO, 2005). Nesta fase, a cromatina do oócito apresenta um padrão de compactação progressiva, classificada em quatro discretos e progressivos estágios de condensação [(GV0 a GV3, conforme descrito por LUCIANO et al., 2014)], os quais são correlacionados com a aquisição da competência meiótica (LODDE et al., 2007). Conforme progride a compactação da cromatina, ocorre um progressivo silenciamento transcricional (LODDE et al., 2008). A fase de atividade transcricional do oócito é muito importante, pois é quando ocorre o acúmulo de moléculas, principalmente RNA, que sustentam o

desenvolvimento embrionário inicial até a fase da ativação do genoma embrionário.

O pico pré-ovulatório do hormônio luteinizante (LH) é o estímulo, *in vivo*, para que a divisão meiótica seja retomada e progrida até a fase de metáfase (MII), quando há a conclusão da maturação nuclear. O LH promove o fechamento das junções "gap" (JG), que consistem em um mecanismo de comunicação bidirecional entre as células do cumulus (CCs) e o oócito. Como consequência, o fluxo de moléculas que mantém a meiose bloqueada para o interior do oócito é interrompido, dentre as quais o monofosfato de adenosina cíclica (AMPc) e monofosfato de guanosina cíclica (GMPc). A quebra da comunicação celular entre cumulus e oócito, bem como a expansão das células do cumulus, marca o início de uma série de modificações precisamente coordenadas por fatores de sinalização maternos, não apenas a nível de remodelamento da cromatina (maturação nuclear), mas também a nível de reorganização dos componentes citoplasmáticos e do maquinário molecular. Ao término de todas estas modificações, o oócito adquire capacidade para ser fertilizado e sustentar o desenvolvimento embrionário inicial (BLONDIN; SIRARD, 1995; SIRARD, 2000; EDRY et al., 2006; LOODE et al., 2007; SÁNCHEZ; SMITZ, 2012).

No entanto, este processo de aquisição de competência oocitária é interrompido quando os oócitos são removidos mecanicamente do ambiente folicular inibitório para finalidades de PIVE, o que induz, de forma espontânea, a condensação da cromatina e progressão da meiose até a fase de MII. A progressão meiótica precoce interrompe a síntese de transcritos, prejudicando o acúmulo de moléculas necessárias para as etapas subsequentes do desenvolvimento, além de acarretar alterações nos padrões de reorganização dos componentes citoplasmáticos (SIRARD, 2000; FERREIRA et al., 2009). Por estes motivos, os oócitos submetidos à MIV constituem uma população heterogênea com relação à competência, pois os procedimentos empregados para a recuperação oocitária diferem do que ocorre fisiologicamente *in vivo* e ocasionam assincronia entre os eventos de maturação nuclear, citoplasmática e molecular.

A utilização de drogas que bloqueiam a meiose temporariamente confere tempo e ambiente favoráveis para aquisição de competência oocitária *in vitro*,

pois impedem a condensação precoce da cromatina, favorecendo o acúmulo de transcritos e a reorganização citoplasmática (ALBUZ et al., 2010). O precursor do peptídeo natriurético tipo C (NPPC), um membro da família dos peptídeos natriuréticos, tem sido recentemente utilizado com a finalidade de evitar a retomada espontânea da meiose em oócitos cultivados *in vitro*. Este peptídeo, presente fisiologicamente no organismo, atua em diferentes tipos celulares mediante o receptor para o peptídeo natriurético tipo 2 (NPR2), localizado na superfície celular, e que está diretamente relacionado à guanilato ciclase intracelular (NPR2/GC) (MISSONO et al., 2012). Os oócitos e, principalmente, as células do cumulus possuem NPR2 pelo qual o NPPC apresenta alta afinidade (CESARO et al., 2015). A estimulação deste receptor pela ligação com o NPPC induz ao aumento na síntese de GMPc pelas células do cumulus e impede a ativação de enzimas da família das fosfodiesterases (PDE), tanto nas células do cumulus (PDE5A) quanto no oócito (PDE3A), além de manter as junções “gap” abertas (FRANCIOSI et al., 2014; LIMA et al., 2016). Consequentemente, a concentração intraocitária de AMPc se mantém elevada e a meiose permanece bloqueada.

Desta forma, sugere-se que a utilização do NPPC durante cultivo de pré-MIV pode aumentar a homogeneidade dos complexos cumulus-oócitos (CCOs) ao final da maturação pois, ao manter o bloqueio da meiose e reprimir a progressão da compactação da cromatina, permite tempo adicional para o acúmulo de transcritos naqueles oócitos que ainda exibam atividade sintética, ao mesmo tempo em que previne o envelhecimento daqueles oócitos que se encontram em estágios mais adiantados do desenvolvimento. Adicionalmente, a manutenção do bloqueio meiótico, com consequente manutenção da abertura das JG, pode permitir a continuidade do fluxo bidirecional de sinais regulatórios entre o oócito e células foliculares, que são essenciais para o desenvolvimento e aquisição da competência do oócito (GILCHRIST et al., 2008). Por estas razões, as células do cumulus tem sido alvo de avaliação da transcriptômica, pois alguns genes expressos por elas são considerados marcadores de qualidade e competência oocitária, permitindo a adequação dos sistemas de cultivo desses gametas (FRAGOULI et al., 2014).

O objetivo deste estudo foi avaliar a transcrição gênica de células do cumulus derivadas de complexos cumulus-oócitos bovinos submetidos à pré-

maturação *in vitro* com NPPC e investigar seus efeitos sobre a maturação e aquisição da competência do oócito.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MATURAÇÃO OOCITÁRIA

O crescimento e desenvolvimento oocitário nos mamíferos é longo e inicia-se ainda na vida fetal da fêmea, durante a fase de foliculogênese. Assim, desde os folículos primordiais, até os estágios de dominância folicular os oócitos encontram-se em estágio de diplóteno da profase da primeira divisão meiótica ou também conhecida como fase de vesícula germinativa (primeiro bloqueio meiótico). Durante todo esse período o oócito cresce e armazena proteínas e RNAm (intensa atividade transcricional), importantes para a maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário inicial (FERREIRA et al., 2009). *In vivo*, o pico pré-ovulatório do hormônio luteinizante é o estímulo desencadeador para o reinício da meiose, este hormônio induz diversas alterações que resultam na quebra da vesícula germinativa (GVBD – do termo em inglês “germinal vesicle breakdown”) (condensação da cromatina e a atividade transcricional do oócito cessa) e progressão até metáfase II (HURK; ZHAO, 2005). Entre o período em que surge a onda pré-ovulatória de LH e o momento propriamente dito da ovulação, ocorre a maturação oocitária, ou seja, alterações bioquímicas e estruturais no núcleo e citoplasma, de forma sincronizada que duram em média 24 horas (MACHATKOVA et al., 2004).

2.1.1 Maturação nuclear

A maturação nuclear dura em média 24 horas nas fêmeas bovinas e tem como resultado o oócito em MII, estágio em que permanece até o momento da fertilização, na qual a penetração espermática é o estímulo para que novamente a meiose seja retomada e finalizada, iniciando o desenvolvimento embrionário (HURK; ZHAO, 2005).

Em 1974, Cho e colaboradores observaram que o bloqueio da meiose oocitária em estágio de diplóteno nos mamíferos apresentava relação com o nucleotídeo cíclico, AMPc, uma molécula sinalizadora que atua como segundo mensageiro. Posteriormente, Tsafiri e Dekel (1994) realizaram cultivo *in vitro* de oócitos de camundongos com análogos de AMPc, com agentes que estimulavam a produção desse segundo mensageiro e com inibidores da enzima responsável pela degradação do AMPc e concluíram que os altos níveis de AMPc no interior do oócito bloqueavam a retomada da meiose, ao passo que a diminuição destes níveis coincidia com a quebra da vesícula germinativa e progressão da meiose, indicando maturação oocitária. Dessa forma, a origem do AMPc intra-oocitário foi estudada e identificou-se produção do mesmo nas células do cumulus e nos próprios oócitos, sendo esta produção realizada pela enzima adelinato ciclase (receptores e proteínas G modulam a atividade da mesma) e degradação pelas enzimas fosfodiesterase 3A (PDE3A - oócito) e 5A (PDE5A – células do cumulus) (ANDERSON; ALBERTINI, 1976; CONTI et al., 1998; MEHLMANN et al., 2002).

Estudos posteriores evidenciaram a participação de inúmeras moléculas relacionadas ao controle da progressão meiótica, não apenas a ação isolada do AMPc, dentre as quais o precursor do peptídeo natriurético tipo C (RICHARDS et al.; 2002). Este peptídeo, secretado por diversas células dos animais, teve sua produção detectada nas células murais da granulosa. O NPPC, uma vez produzido por estas células, se difunde via fluido folicular e atua nas células do cumulus através de um receptor de membrana acoplado a enzima guanilato ciclase, o NPR2/GC (MISONO et al., 2011; CESARO et al., 2015). Este peptídeo ao se ligar ao seu receptor ativa a enzima guanilato ciclase (GC) nas células do cumulus, sendo esta enzima responsável pela síntese do GMPc, um segundo mensageiro que em concentrações elevadas impede a ativação das PDE (SÁNCHEZ; SMITZ, 2012).

Tanto o AMPc, quanto o GMPc, produzidos nas células do cumulus chegam ao ambiente intra-oocitário através de um sistema de comunicação bidirecional entre as células, denominado de junções “gap”. As JG permitem a comunicação entre células vizinhas e fornecem um meio de transporte rápido para íons (cálcio) e segundos mensageiros (inositol fosfato e nucleotídeos

cíclicos) (GOLDBERG et al., 2004; GERSHON et al., 2008). Portanto, o GMPc produzido nas CCs impede a ativação da enzima PDE5A, responsável pela degradação do AMPc nestas células, e assim favorece a manutenção do fluxo de AMPc para o ambiente oocitário. Adicionalmente, uma vez no citoplasma do oócito, o GMPc impede a ativação da PDE3A, favorecendo a manutenção dos níveis de AMPc (CONTI et al., 2002). Assim, os elevados níveis de AMPc ativam a proteína cinase A (PKA), a qual fosforila a subunidade catalítica (CDK1) do fator promotor da maturação (MPF), inativando-o e mantendo o bloqueio meiótico (TRIPATHI et al., 2010).

Fisiologicamente, a meiose é retomada a partir do momento em que ocorre o pico pré-ovulatório de LH, logo, quando liberado, este hormônio atuará nas células da granulosa/cumulus de folículos dominantes/pré-ovulatórios através do seu receptor, induzindo a uma série de eventos, como a dessensibilização ao NPPC e ativação da PKA, que induz a produção do fator de crescimento epidermal (EGF), bem como dos fatores semelhantes ao EGF, como ampirregulina (AREG), epirregulina (EREG) e betacelulina (BTC). Estes fatores estimulam a atividade da proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK) nas células do cumulus e não no oócito, resultando em interrupção na comunicação entre cumulus e oócito, através da fosforilação da proteína conexina 43, presente nas junções "gap". Como resultado, o transporte de AMPc e GMPc das células do cumulus para os oócitos é interrompido, havendo diminuição dos níveis intra-oocitários destes compostos, ativação da enzima PDE3A, defosforilação da CDK1 e ativação do MPF nos oócitos, com consequente quebra da vesícula germinativa, caracterizando a retomada da meiose (FORTUNE, 2003; PARK et al., 2004; EDRY et al., 2006). Associado a estes eventos, os fatores semelhantes ao EGF, juntamente com os fatores secretados pelo oócito (BMP15 e GDF9), participam da ativação de proteínas relacionadas à expansão das células do cumulus, ou seja, ocorre produção de ácido hialurônico e a expansão destas células.

2.1.2 Maturação citoplasmática

A maturação citoplasmática é importante para que ocorra a redistribuição das organelas, além da transcrição, armazenamento e processamento de RNAm expressos pelos cromossomos (van der HURK et al., 1999).

A redistribuição das organelas ocorre através dos microfilamentos e microtúbulos, sempre de acordo com a necessidade da célula. Os microfilamentos consistem de unidades de actina globulares e filamentosas (MAO et al., 2014) e compõem a maior parte do citoesqueleto, sendo responsáveis por promover a divisão celular (KIM et al., 2000). Como exemplo clássico há a redistribuição das mitocôndrias, organelas responsáveis pelo fornecimento de energia à célula durante a maturação, por isso estas organelas migram para os locais que requerem maior quantidade de energia. Durante a fase imatura do oócito, ou seja, estágio de prófase I, as mitocôndrias encontram-se na periferia do oócito, por outro lado, quando o oócito progride para metáfase II, tornando-se maturado, estas organelas dispõem-se no centro da célula, próximas ao fuso meiótico (JESETA et al., 2014; SOMFAI et al., 2015). Os retículos endoplasmáticos distribuem-se de forma uniforme e os grânulos corticais dispersos em “clusters” em oócitos na prófase I. Com a progressão da meiose para metáfase II (maturação oocitária), os grânulos corticais dispõem-se na periferia do oócito, evitando a ocorrência da poliespermia no momento da fertilização (FERREIRA et al., 2009).

2.2 INIBIDORES DA MEIOSE

Oócitos submetidos à MIV são provenientes de folículos com diâmetros entre 3 a 8 mm e assim, obtém-se uma população oocitária heterogênea, abrangendo tanto oócitos competentes, quanto não competentes. Além do mais, a retirada mecânica dos oócitos do ambiente folicular, cessa o efeito

inibitório que mantém a meiose bloqueada em prófase I, fazendo com que a sincronia entre maturações nuclear e citoplasmática, seja perdida. Com o intuito de homogeneizar a população oocitária submetida à MIV e obter melhores taxas de blastocisto, diversos estudos com drogas (análogos do cAMP, inibidores da PDE, ativadores da adenilato ciclase, ativadores adenilato ciclase) que impedem a retomada da progressão meiótica espontânea em oócitos cultivados *in vitro*, através da manutenção ou até mesmo aumento dos níveis intra-oocitários de cAMP, têm sido exploradas. (SIRARD, 2001).

Eppig e Downs (1884), afim de provarem o efeito do bloqueio da meiose pelo AMPc e sabendo que oócitos provenientes de folículos antrais, uma vez removidos mecanicamente destes, retomavam a meiose de forma espontânea, maturaram complexos cumulus oócitos de camundongos *in vitro* com drogas análogas do AMPc (dibutilil AMPc - dbcAMP) e inibidoras da PDE3A (IBMX). Como resultado, observaram que os CCOs submetidos ao tratamento com as drogas não retomaram a meiose (prófase I), contudo, ao serem retirados do tratamento e submetidos à MIV com gonadotrofinas, a meiose era retomada.

Sanbuissho et al. (1992), submeteram CCOs bovinos à maturação *in vitro* com dbcAMP ou forskolina (inibidor de PDE3A) por 24 horas, afim de observarem o efeito dessas drogas sobre a progressão da meiose. Ao fim da maturação, os autores notaram aumento de AMPc nas células do cumulus e quase que 100% dos oócitos encontravam-se em prófase I. Adicionalmente, alguns oócitos, foram submetidos à MIV com as drogas por 18 horas e posteriormente transferidos para um meio controle até completar 24 horas de maturação, sendo que nesses grupos observou-se que 80% dos CCOs retomaram a meiose até a fase de MII. Concluindo, os autores, portanto, que essas drogas mantem a meiose bloqueada, contudo ao serem removidas, permitem a progressão da meiose, sugerindo um oócito com maior competência.

Com a finalidade de avaliar a influência da manutenção do bloqueio da meiose sobre a taxa de desenvolvimento embrionário bovino, Guixue et al. (2001), realizaram um pré-tratamento (15 minutos) seguido de MIV, sendo que o primeiro continha drogas como dbcAMP, IBMX, ciclohexamida (CHX), adenilato ciclase invasiva (iAC - microinjeções no oócito) e o próprio fluido

folicular. O pré-tratamento com fluido folicular e iAC, não alterou a taxa de clivagem e desenvolvimento embrionário, por outro lado, os demais pré-tratamentos resultaram em aumento nas taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário, quando comparados ao grupo controle. Assim conclui-se que, apesar dos oócitos estarem em diferentes estágios de desenvolvimento, o pré-tratamento possivelmente permitiu que esses gametas adquirissem competência, melhorando as taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário.

Dessa forma, com os avanços relacionados à maturação oocitária, Albu e colaboradores, propuseram em 2010 um sistema de maturação *in vitro* intitulado “Simulação Fisiológica da Maturação Oocitária” (SPOM), na tentativa de recapitular *in vitro*, alguns dos eventos bioquímicos e celulares que ocorrem naturalmente na maturação *in vivo*, visando melhorar a competência oocitária e desenvolvimento embrionário. Nesse sistema, os autores propõem uma etapa anterior à MIV propriamente dita, chamada de pré-MIV, impedindo dessa forma a retomada espontânea da meiose no momento da retirada dos oócitos dos folículos ovarianos. CCOs bovinos imaturos recuperados de folículos entre 3-8mm eram submetidos à fase de pré-MIV, que consiste em impedir a retomada da meiose através do uso de ativadores da adenilato ciclase (forskolina) e inibidores da enzima fosfodiesterase 3A (IBMX e cilostamida), promovendo aumento dos níveis intra-oocitários de AMPc. Ao final dessa etapa, os CCOs eram transferidos para a MIV e posteriormente submetidos à FIV e CIV (fertilização e cultivo *in vitro*, respectivamente). Os autores mostraram resultados promissores, atingindo taxas de maturação *in vitro* superiores a 80%, bem como taxas de clivagem e blastocisto satisfatórias. Estes autores, concluíram que a pré-MIV impede o fechamento precoce das junções “gap”, o que acontece no momento da remoção dos oócitos dos folículos ovarianos e, desse modo, há fluxo de moléculas essenciais para a competência oocitária, refletindo no desenvolvimento embrionário inicial, como por exemplo a glutathiona (GSH), um importante antioxidante intracelular, além de proteínas e RNA. Contudo, Rose et al. (2013) e Li et al. (2016), utilizando-se da técnica de pré-MIV com forskolina e IBMX, não observaram aumento na taxa de

blastocistos bovinos, deixando claro que mais estudos são necessários para aprimoramento da técnica.

Franciosi et al. (2014), submetem oócitos bovinos ao cultivo de pré-maturação *in vitro* com o precursor do peptídeo natriurético tipo C, por 6 e 8 horas. Como resultado, estes autores observaram que com 6 horas 87% dos oócitos encontravam-se bloqueados em GV, ao passo que no grupo controle submetido à MIV convencional, 61% dos oócitos encontravam-se em GV ($P<0,05$). Da mesma forma, quando avaliaram os oócitos após 8 horas de cultivo de pré-maturação, o NPPC ainda manteve o efeito bloqueador no grupo tratado em relação ao controle, 74% e 69% ($P<0,05$), respectivamente. Em associação aos dados de maturação nuclear, estes autores também avaliaram o comportamento das junções “gap” e observaram que com 6 e 8 horas o grupo tratado com NPPC apresentou 68% e 60% das junções “gap” abertas, já os grupos controles, apresentaram 32% e 30% ($P<0,05$). Quando os oócitos tratados com NPPC foram submetidos à PIVE, não se evidenciou aumento na taxa de desenvolvimento embrionário, no entanto, houve aumento na qualidade embrionária, refletida no aumento do número de blastômeros.

Por outro lado, Zhang et al (2017), ao submeterem oócitos bovinos ao cultivo de maturação *in vitro* com NPPC por 6 horas, previamente as etapas de MIV, FIV e CIV, observaram aumento na taxa de desenvolvimento embrionário, comparado ao grupo controle (51,6% vs. 32,2% $P<0,05$), além de aumento no número de blastômeros (156,2 vs, 116,3).

Pelo exposto, fica evidente que, mesmo com população heterogênea de oócitos submetidos à MIV, é possível ao fim da PIVE ter boa taxa de blastocisto, através do cultivo de pré-maturação, a qual provou melhorar a competência dos oócitos maturados *in vitro*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A menos que seja especificado, os reagentes foram adquiridos da Sigma – Aldrich Corporation (St. Louis, MO, USA). Materiais plásticos foram obtidos da empresa Corning Inc. (Acton, MA, USA).

3.1 SELEÇÃO E CULTIVO DE OÓCITOS

Ovários de bovinos abatidos na região de Araçatuba-SP foram transportados para o laboratório em solução salina (0,9% NaCl) à 30-35°C. Complexos cumulus-oócitos (CCOs, n=742) foram aspirados de folículos com diâmetro entre 3 a 8 mm, com auxílio de seringa de 10 mL acoplada a uma agulha calibre 18G. Todo o material aspirado foi transferido para tubos plásticos de 50 mL. Após a sedimentação, o fluido folicular sobrenadante foi centrifugado a 12.500 g por 4 minutos para remoção dos debris celulares e suplementado com 75 µg/mL penicilina/estreptomicina, sendo então utilizado como meio para seleção dos CCOs, visando evitar a progressão espontânea da meiose; o sedimento foi utilizado para recuperação dos CCOs. Apenas CCOs com no mínimo 4 camadas compactas de células do cumulus e citoplasma homogêneo foram selecionados para o estudo.

Os CCOs selecionados foram lavados duas vezes em meio de Pré-MIV [TCM-199 suplementado com 0.2 mM piruvato, 25mM bicarbonato de sódio, 75 µg/mL amicacina, 0,3% (w:v) BSA e 100 nM NPPC]. Na sequência, 25 CCOs foram transferidos para gotas de 100 µL de meio de Pré-MIV recobertas com óleo mineral. Os CCOs foram então cultivados por 8 horas em incubadora a 38,5°C, com máxima umidade e atmosfera de 5% CO₂ em ar.

Ao final do cultivo de pré-MIV, os oócitos foram lavados três vezes em meio de Pré-MIV sem NPPC para completa remoção do agente bloqueador, e posteriormente duas vezes em meio de MIV [TCM199 suplementado com 0,2 mM piruvato de sódio, 25 mM bicarbonato de sódio, 50 µg/mL amicacina, 0,5 µg/mL FSH (Folltropin-V; Bioniche Animal Health, Ontario, Canada) e 100 IU/mL hCG (Vetecor; Hertape Calier)]. Posteriormente, foram transferidos para gotas de 100 µL de meio MIV recobertas com óleo mineral, sendo então cultivados por 22h sob as mesmas condições descritas para a Pré-MIV.

3.2 AVALIAÇÃO DO REMODELAMENTO DA CROMATINA E PROGRESSÃO MEIÓTICA

Os oócitos foram desnudados em *vortex* com solução de hialuronidase 0,2% em PBS, acrescida de 1% de PVA (PBS-PVA) para remoção das células do cumulus. Em seguida, foram fixados em paraformaldeído 4% por 15 minutos, permeabilizados em solução de 0,5% Triton X-100 em citrato de sódio 0,1% por 5 minutos. Foram então corados com Hoechst 33342 (1 µg/mL) por 15 minutos em temperatura ambiente. Os oócitos foram montados entre lâmina e lamínula e imediatamente analisados em microscópio invertido equipado com epifluorescência (Olympus, IX51; excitação 404 nm e emissão 526 nm). Oócitos que apresentaram a configuração nuclear de vesícula germinativa (VG) foram classificados como imaturos, ao passo que presença da placa metafásica e do primeiro corpúsculo polar (MII) caracteriza os oócitos como maduros. Os oócitos em VG foram classificados de acordo com o grau de compactação da cromatina no envelope nuclear (LODDE et al., 2007): GV0 – caracterizado por um padrão filamentoso difuso em toda a área nuclear; GV1 – representa um estágio inicial de remodelamento de cromatina com o aparecimento de alguns focos de condensação; GV2 – representa o estágio intermediário de remodelamento da cromatina, com a formação de grupos de cromatina condensada; GV3 – nível máximo de condensação da cromatina, organizada em um único ponto. Os oócitos que apresentaram as fases entre quebra da vesícula germinativa até a metáfase I foram classificados como intermediários; oócitos em fases de anáfase I até metáfase II, como maduros; e oócitos em nenhum desde estágios foram considerados degenerados (LUCIANO et al., 2015). Imagens representativas das diversas configurações podem ser visualizadas na Figura 1.

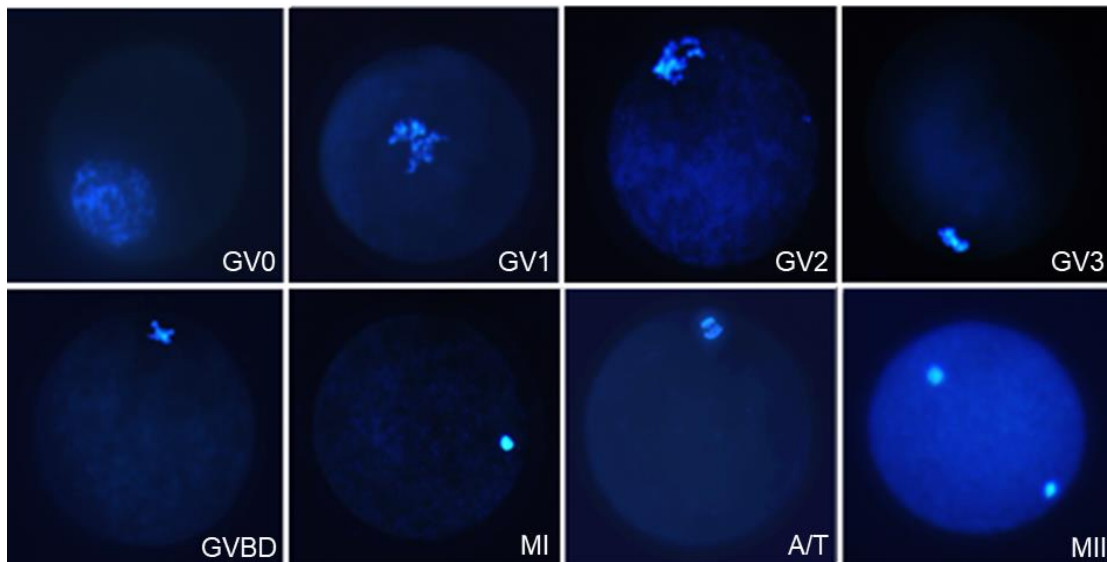


FIGURA 1. Imagem ilustrativa de oócitos bovinos corados com sonda fluorescente Hoechst 33342 para identificação da configuração da cromatina (núcleo em azul). Os oócitos foram avaliados em microscopia de epifluorescência (excitação 404 nm e emissão 526 nm; aumento 20 vezes). Classificação de acordo com a configuração nuclear em: vesícula germinativa 0 (GV0), vesícula germinativa 1 (GV1), vesícula germinativa 2 (GV2), vesícula germinativa 3 (GV3), quebra da vesícula germinativa (GVBD), metáfase da meiose I (MI), anáfase ou telófase da meiose I (A/T) e metáfase da meiose II (MII).

3.3 AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS MICROFILAMENTOS DE ACTINA

Para avaliação dos microfilamentos, os oócitos foram desnudados e fixados em 4% de paraformaldeído por 10 minutos, permeabilizados em Triton X-100 0,5% em citrato de sódio 0,1% por 5 minutos e corados com 1 µg/mL de faloidina conjugada com FITC (Molecular Probes), no escuro, em temperatura ambiente. Posteriormente, foram colocados entre lâmina e lamínula e avaliados em microscópio invertido equipado com epifluorescência (Olympus IX51; excitação 495 nm e emissão 517 nm). A determinação da distribuição citoplasmática dos microfilamentos de actina (Figura 2) foi realizada como descrito por Albarracín et al. (2005), de acordo com as seguintes categorias: normal (N), descontínua (DC), difusa (DF) e ausente (A).

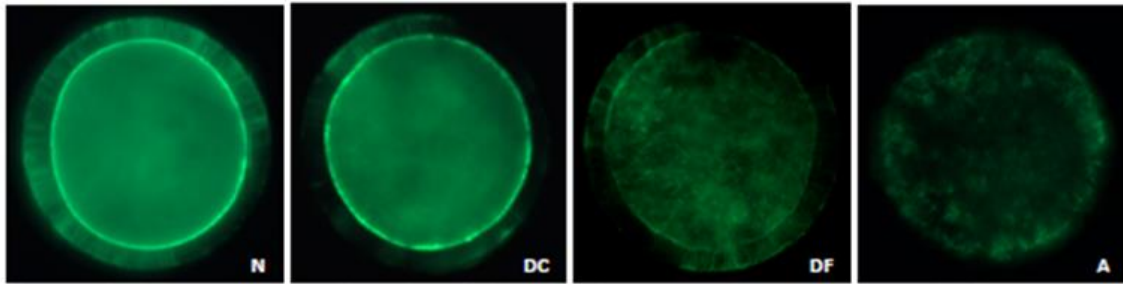


Figura 2. Imagem ilustrativa de oócitos bovinos corados com a sonda fluorescente faloidina conjugada com FITC e avaliados em microscopia de epifluorescência (excitação de 495 nm e emissão 517 nm; aumento 20 vezes). Classificação de acordo com a predominância da distribuição citoplasmática dos microfilamentos de actina em Normal (N), descontínua (DC), difusa (DF) e ausente (A).

3.4 EXTRAÇÃO DO RNA

Ao final da Pré-MIV e da MIV, os oócitos foram desnudados e as células do cumulus foram centrifugadas. O pellet obtido foi lavado com PBS (livre de cálcio e magnésio), centrifugado novamente, submetido ao procedimento de congelamento rápido (“snap freezing”) e armazenado em freezer -80°C . O RNA total foi extraído a partir das células do cumulus obtidas de 20 CCOs, através do kit RNeasy Micro Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) e de acordo com as instruções do fabricante, incluindo tratamento com DNase. A eluição foi feita com 20 μL de água ultrapura tratada com dietil pirocarboanato (água DEPC). A concentração total de RNA foi avaliada através do NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) e a integridade do RNA foi analisada usando o sistema 2100-Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) com o kit 6000 Pico Kit (Agilent Technologies).

3.5 TRANSCRIÇÃO REVERSA E EXPRESSÃO GÊNICA

O RNA extraído foi submetido à reação de transcrição reversa (RT) através do kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, com inibidor de

RNase (Thermo Fisher Scientific) para obtenção do cDNA. Resumidamente, para cada 10 μL de RNA foram adicionadas as seguintes quantidades e soluções: 2 μL de 10X Reverse Transcription Buffer, 0,8 μL de 25X dNTPs, 2 μL de 10X random primers, 1 μL de MultScribe Reverse Transcriptase, 1 μL inibidor de RNase e 3,2 μL água livre de nuclease. A reação foi conduzida no sistema PRC200 DNA Engine Thermal Cycler (MJ Research, CA, EUA) por 10 min a 25°C, 120 min à 37°C, 5 min à 85°C e por fim mantida a 4°C até as próximas etapas. As amostras de cDNA foram estocadas à -20°C até a análise de expressão gênica.

A análise de expressão gênica das células do cumulus foi feita através do sistema de micro-fluídica Biomark HD (Fluidigm®, South San Francisco, CA, USA). Para avaliação da abundância de RNAm dos genes selecionados, foi utilizado o ensaio Applied Biosystems™ TaqMan® Assays, específico para *Bos taurus*, incluindo os genes controles endógenos (Tabela 1).

Cada amostra de RNA foi submetida ao processo de pré-amplificação específico para as sequências gênicas com 1,25 μL de mix (Taqman® Assay com concentração final de 0,2X para cada um dos 96 ensaios), 2,5 μL TaqMan PreAmp Master Mix (Applied Biosystems, #4391128) e 1,25 μL cDNA (5 ng/ μL). As reações foram ativadas à 95°C por 10 min, seguidas da etapa de desnaturação à 95°C por 15 s, o anelamento e a amplificação ocorreram à 60°C por 4 min em 14 ciclos. Os produtos pré-amplificados foram diluídos 7 vezes antes das análises de RT-qPCR.

Para as amostras analisadas no Biomark HD, foram preparadas soluções contendo 2,25 μL cDNA (produtos pré-amplificados), 2,5 μL TaqMan Universal PCR Master Mix (2X, Applied Biosystems) e 0,25 μL 20X GE Sample Loading Reagent (Fluidigm); e a solução do ensaio continha 2,5 μL 20X TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems) e 2,5 μL 2X Assay Loading Reagent (Fluidigm). Para a coleta dos dados foi utilizado o chip 96.96 Dynamic Array™ Integrated Fluidic Circuits (Fluidigm). Os espaçamentos referentes ao ensaio no chip foram preenchidos com 5 μL de cada solução do ensaio e 5 μL de cada solução das amostras. Os ciclos de qPCR foram realizados no sistema Biomark HD System (Fluidigm) de acordo com o protocolo TaqMan GE 96x96 Standard, que consiste em um primeiro estágio chamado “Thermal Mix” (50°C por 2 min, 70° por 20 min e 25° por 10 min),

seguido do estágio “Hot Start” (50°C por 2 min e 95°C por 10 min). Na sequência, foi seguido de 40 ciclos de desnaturação (95° por 15 s) e, por fim, o anelamento e extensão (60° por 60 s).

As análises foram realizadas a partir de 4 replicatas biológicas e independentes, e os valores de Ct foram calculados pelo software do sistema Biomark Real Time PCR (Fluidigm).

Os genes referência foram avaliados através da análise de variância (ANOVA) e do algoritmo GeNorm (VANDESOMPELE et al., 2002) para verificar a estabilidade da abundância de transcrição dos controles endógenos utilizados neste estudo, para todas as amostras. Considerou-se mais estável o gene que teve valor de $M < 1.5$. O cycle threshold (Ct) de cada gene de interesse foi normalizado pela média geométrica dos controles endógenos (*PPIA* e *RPL15*) para gerar os valores de delta Ct (ΔCt), que foram utilizados nas análises estatísticas. Posteriormente, o valor de ΔCt das amostras tratadas foi normalizado pela amostra do grupo controle (que foi o grupo C0 no Experimento I e o grupo C22 no Experimento II) para calcular o delta-delta Ct ($\Delta\Delta Ct$); o fold change foi calculado como $2^{-\Delta\Delta Ct}$ relativo às amostras do grupo controle e os respectivos valores resultantes foram utilizados nas representações gráficas.

Tabela 1. Genes selecionados para avaliação por RT-qPCR nas células do cumulus de oócitos bovinos

Símbolo	Identidade*	Nome	Função**
<i>GREM1</i>	Bt03255355_m1	Gremlin 1	Expansão das células do cumulus
<i>HAS2</i>	Bt03212695_g1	Hyaluronan synthase 2	Expansão das células do cumulus
<i>PTGS2/COX2</i>	Bt03214489_m1	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	Expansão das células do cumulus
<i>PTX3</i>	Bt03249011_m1	Pentraxin 3, long	Expansão das células do cumulus
<i>TNFAIP6</i>	Bt03210223_m1	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6	Expansão das células do cumulus
<i>VCAN</i>	Bt03217633_m1	Versican	Expansão das células do cumulus
<i>CLIC3</i>	Bt03263038_m1	Chloride intracellular channel 3	Desenvolvimento embrionário
<i>IGFR1R</i>	Bt03649217_m1	Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor	Desenvolvimento embrionário
<i>IGFBP2</i>	Bt01040719_m1	Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 2	Desenvolvimento embrionário
<i>KRT8</i>	Bt03225178_g1	Keratin 8	Desenvolvimento embrionário
<i>LUM</i>	Bt03211920_m1	Lumican	Desenvolvimento embrionário
<i>NDUFA1</i>	Bt03216720_g1	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit A1	Desenvolvimento embrionário
<i>POU5F1</i>	Bt03223846_g1	POU class 5 homeobox 1 (OCT4)	Desenvolvimento embrionário
<i>PRDX1</i>	Bt03223684_m1	Peroxiredoxin-1	Desenvolvimento embrionário
<i>PRDX3</i>	Bt03214402_m1	Peroxiredoxin 3	Desenvolvimento embrionário

<i>S100A10</i>	Bt03215645_m1	S100 calcium binding protein A10	Desenvolvimento embrionário
<i>S100A14</i>	Bt03230771_g1	S100 calcium binding protein A14	Desenvolvimento embrionário
<i>MAPK1</i>	Bt03216718_g1	Mitogen-Activated Protein Kinase	Maturação oocitária
<i>NOS2</i>	Bt03249597_m1	Nitric oxide synthase 2, inducible	Maturação oocitária
<i>NOS3</i>	Bt03217679_m1	Nitric oxide synthase 3	Maturação oocitária
<i>NPPC</i>	Bt03212844_m1	Natriuretic peptide C (CNP)	Maturação oocitária
<i>NPR1</i>	Bt04297034_g1	Natriuretic peptide receptor 1	Maturação oocitária
<i>NPR2</i>	Bt04316732_m1	Natriuretic peptide receptor 2	Maturação oocitária
<i>NPR3</i>	Bt03212867_m1	Natriuretic peptide receptor 3	Maturação oocitária
<i>OOSP1</i>	Bt03233533_g1	Oocyte-secreted protein 1	Maturação oocitária
<i>PDE5A</i>	Bt03214261_m1	Phosphodiesterase 5A, cgmp-specific	Maturação oocitária
<i>PRKCD</i>	Bt03224587_g1	Protein kinase C delta	Maturação oocitária
<i>RGS2</i>	Bt03246656_g1	Regulator of G-protein signaling 2	Maturação oocitária
<i>STAT3</i>	Bt03259871_g1	Signal Transducer And Activator Of Transcription 3	Maturação oocitária
<i>ACTB</i>	Bt03279174_g1	Actin, beta	Housekeeping
<i>GAPDH</i>	Bt03210912_g1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Housekeeping

<i>PPIA</i>	Bt03224617_g1	Peptidylprolyl Isomerase A	Housekeeping
<i>RPL16</i>	Bt03288449_g1	Ribosomal protein L15	Housekeeping

* Thermo Fisher Scientific

**

GeneCard.org

3.6 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

Foi utilizado sêmen congelado de um único touro da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) e da mesma partida (adquirido da empresa CRV Lagoa Ltda. Sertãozinho, SP, Brasil). No dia da FIV, 2 palhetas de sêmen foram descongeladas em banho maria a 36°C por 40 segundos e submetidas ao processo de centrifugação em gradiente de densidade descontínua (45% e 90%) de Percoll® (GE, Healthcare, Uppsala, Sweden), por 7 minutos a 2.500 g em temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e o sedimento foi ressuspenso em 500 µL de meio TL-Sêmen e submetido a uma nova centrifugação por 5 minutos a 5000 g. O sedimento recuperado foi analisado quanto à motilidade e concentração espermática, sendo esta última ajustada para 25x10⁶ espermatozoides/mL de meio de fecundação (suplementado com 0,2 mM de piruvato de sódio, 6 mg/mL de BSA-livre de ácido graxo, 25 mM de bicarbonato de sódio, 13 mM de lactato de sódio, 50 µg/mL de amicacina, 20 µM penicilamina, 10 µM hipotaurina, 2 µM epinefrina e 10 µg/mL heparina). CCOs e espermatozoides foram co-incubados por 18-22 horas em gotas de 100 µl de meio de fertilização recobertas por óleo mineral, sob as mesmas condições das etapas anteriores.

Ao final da etapa de fertilização, as células do cumulus foram removidas mecanicamente, por pipetagem, e os prováveis zigotos foram lavados uma vez em meio FIV e duas vezes em meio CIV [*Synthetic Oviductal Fluid (SOF)* suplementado com 0,2 mM L-glutamina, 0,3 mM citrato de sódio, 2,8 mM myo-inositol, 2% MEM solução de aminoácidos essenciais, 1% MEM solução de aminoácidos não essenciais, 0,2 mM piruvato de sódio, 50 µg/mL amicacina, 5 mg/mL BSA-livre de ácidos graxos e 2,5% SFB]. Em seguida, foram transferidos para gotas de 90 µl de meio de CIV recobertas com óleo mineral. O cultivo *in vitro* teve duração de 7 dias [o dia da FIV foi considerado o dia 0 (D0)], sendo que nos dias 3 e 7 [72 horas pós-inseminação (hpi) e 168 hpi] as taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário foram avaliadas, respectivamente.

3.7 Terminal Deoxynucleotyl Transferase Uracil Nick and Labeling – TUNEL

No dia 7 do CIV, blastocistos e blastocistos expandidos foram submetidos à reação de TUNEL (*In Situ* Cell Death Detection Kit with Fluorescein, Roche® Applied Science, IN, USA), que permite a identificação de células apoptóticas (fragmentação do DNA). A técnica utilizada foi adaptada do protocolo descrito por Paula-Lopes e Hansen (2002). Os embriões foram fixados em solução de paraformaldeído a 4% em temperatura ambiente por 40-60 minutos, permeabilizados em solução de Triton X-100 (0,5% v/v) em citrato de sódio (0,1%) por 30 minutos, também em temperatura ambiente. Na sequência, foram incubados em câmara úmida, no escuro à 37°C por 1 hora com 15 µL da mistura de enzima e tampão (1:9) para coloração de TUNEL. Posteriormente, os embriões foram contra-corados com Hoechst 33342 (1 µg/mL) por 30 minutos no escuro, lavados em PBS-PVA e montados entre lâmina e lamínula. As lâminas foram imediatamente avaliadas em microscópio invertido equipado com epifluorescência (Olympus, IX51; excitação 510-550nm e emissão 590nm), sendo quantificado o número de células com fragmentação de DNA (TUNEL positivas = fluorescência verde) em relação ao número de células vivas (fluorescência azul), como representado na Figura 3.

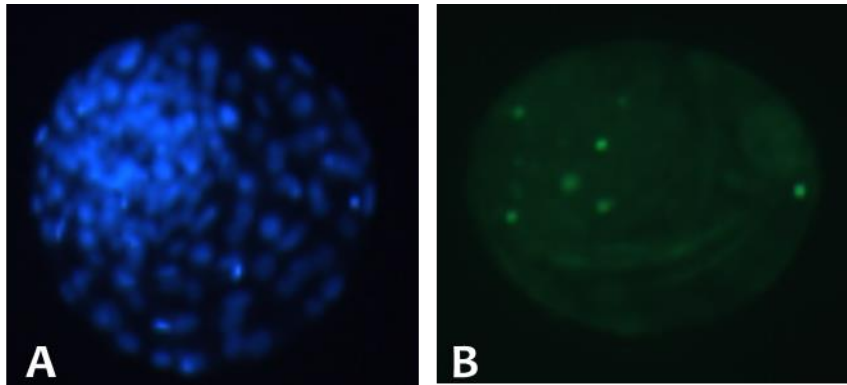


Figura 3. Imagem ilustrativa de embrião bovino expandido no D7 do cultivo embrionário corado com a sonda fluorescente Hoechst 33342 para determinação do número total de blastômeros (em azul, A) e TUNEL para determinação da fragmentação nuclear (em verde, B) e avaliados em microscopia de epifluorescência (excitação 510-550 nm e emissão 590 nm; aumento de 20 vezes).

3.8 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O experimento foi realizado em três etapas distintas, em que foram avaliados a progressão da meiose e o acúmulo de transcritos em células do cumulus após a Pre-MIV e após a Pre-MIV+MIV, bem como a competência oocitária para o desenvolvimento embrionário inicial.

3.8.1 *Experimento I: Acúmulo de transcritos nas células do cumulus e sua relação com a configuração da cromatina e dinâmica dos microfilamentos de oócitos bovinos pré-maturados por 8h na presença de NPPC*

Neste experimento foram avaliados os seguintes grupos: (i) oócitos pré-maturados durante 8h na presença de NPPC (grupo NPPC; n = 75); e dois grupos controle: (ii) controle 0h (grupo C0; n = 70): oócitos avaliados imediatamente após remoção do folículo e (iii) controle 8h (grupo C8; n = 78): MIV padrão por 8h sob as mesmas condições do cultivo de pré-MIV, porém na ausência de NPPC. O tempo escolhido para a etapa de cultivo de pré-

maturação *in vitro* foi baseado na literatura existente (FRANCIOSI et al., 2014). Os oócitos foram avaliados quanto à configuração da cromatina e microfilamentos de actina, e as células do cumulus foram armazenadas em freezer -80°C até o momento da análise de transcriptômica. Os grupos experimentais estão ilustrados na Figura 4A.

3.8.2 Experimento II: Acúmulo de transcritos nas células do cumulus e sua relação com a configuração da cromatina e dinâmica dos microfilamentos ao término do cultivo de maturação de oócitos bovinos pré-maturados na presença de NPPC

Oócitos foram pré-maturados com NPPC durante 8h tal como descrito no Experimento I e, a seguir, foram lavados para remoção completa do inibidor e transferidos para o cultivo de maturação por 22h (grupo NPPC; n = 84). Dois grupos controles foram criados para esta etapa: (i) controle 22h (grupo C22; n = 83): MIV padrão por 22h e (ii) controle 30h (grupo C30; n = 73): MIV padrão por 30h. Oócitos e células do cumulus foram colhidos da mesma forma como descrito anteriormente e as mesmas análises foram realizadas. Os grupos experimentais estão ilustrados na Figura 8A.

3.8.3 Experimento III: Aquisição da competência para o desenvolvimento embrionário em oócitos bovinos pré-maturados in vitro por 8h na presença de NPPC

Neste experimento, os oócitos foram pré-maturados e maturados como descrito para o Experimento II e então foram fecundados ao término da MIV (grupo NPPC: n = 75; grupo C22: n = 73; e grupo C30: n = 73). Foi avaliado o desenvolvimento embrionário até a fase de blastocisto e os blastocistos e blastocistos expandidos foram avaliados quanto ao número de blastômeros e taxas de apoptose.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Cada experimento foi repetido no mínimo 3 vezes para cada avaliação proposta, em replicatas independentes. Em cada replicata, uma microgota contendo 25 CCOs ou embriões foi considerado a unidade experimental para as variáveis estado da meiose e desenvolvimento embrionário. Os dados de taxas de maturação foram analisados pela fração de oócitos cultivados atingindo os estágios determinados de desenvolvimento, reportada em termos de porcentagem. Os dados de taxas de desenvolvimento embrionário foram analisados pela fração de oócitos clivados atingindo os estágios determinados de desenvolvimento. As porcentagens foram transformadas em arco seno e as comparações entre as médias dos grupos foi feita utilizando-se a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey.

Os dados de expressão gênica estão apresentados nos gráficos como fold change relativo ao grupo controle (que foi o grupo C0 no Experimento I e o grupo C22 no Experimento II); todavia as diferenças foram obtidas pela comparação do ΔCt relativo aos genes endógenos (dados apresentados nos Anexos 1 e 2). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. A análise de variância (ANOVA) foi utilizada nas variáveis contínuas para comparações entre grupos e, quando um efeito estatisticamente significativo foi encontrado, as comparações múltiplas das médias foram determinadas pelo teste de Tukey. Dados não paramétricos foram transformados em log e submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn's para comparação das médias.

As análises foram realizadas pelo programa GraphPad Prism (versão 6.01). Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Experimento I

Como mostrado na Figura 4B, a maioria dos oócitos imaturos (grupo C0) apresentou configuração da cromatina no estágio de GV1 (59%), sendo observadas menores taxas de GV0 (20,3%), GV2 (17,1%) e GV3 (3,6%), mas

nenhuma MI foi observada. Após 8h do cultivo de maturação (grupo C8), a porcentagem de oócitos que progrediu de GV1 (14,0%) para GV3 (53,1%) foi significativamente maior ($P < 0,05$) do que o observado no grupo C0. Ainda no grupo C8, poucos oócitos apresentaram configuração em GV0 (6,2%) e GV2 (5,9%), mas observou-se progressão da meiose até o estágio de MI em 20,9% dos oócitos; todavia estas configurações não diferiram do grupo C0 ($P > 0,05$). Com relação aos oócitos pré-maturados por 8h na presença de NPPC e ausência de hormônios (grupo NPPC), não houve diferença entre as configurações de cromatina (15,4% GV0, 22,8% GV1, 19,4% GV2, 38,7% GV3 e 3,8% MI) em comparação aos grupos C0 e C8 ($P > 0,05$). Os resultados deste experimento indicam que não houve um bloqueio completo da meiose em oócitos pré-maturados com NPPC por 8h, porém, analisando-se conjuntamente os 3 grupos, nota-se que a progressão da meiose do grupo NPPC parece estar mais atrasada em relação àqueles oócitos cultivados na presença de hormônios e sem o bloqueador (grupo C8). Para melhor visualização dos efeitos do NPPC sobre a progressão meiótica, foi avaliado o padrão de expressão gênica das células do cumulus recolhidas dos oócitos ao término do cultivo de Pré-MIV nos diferentes tratamentos.

O padrão de distribuição dos microfilamentos citoplasmáticos de actina pode ser visualizado na Figura 4C. Não foi observada nenhuma alteração na disposição dos microfilamentos nos diferentes tratamentos ($P > 0,05$), sendo que a maioria dos oócitos apresentou disposição normal destas estruturas.

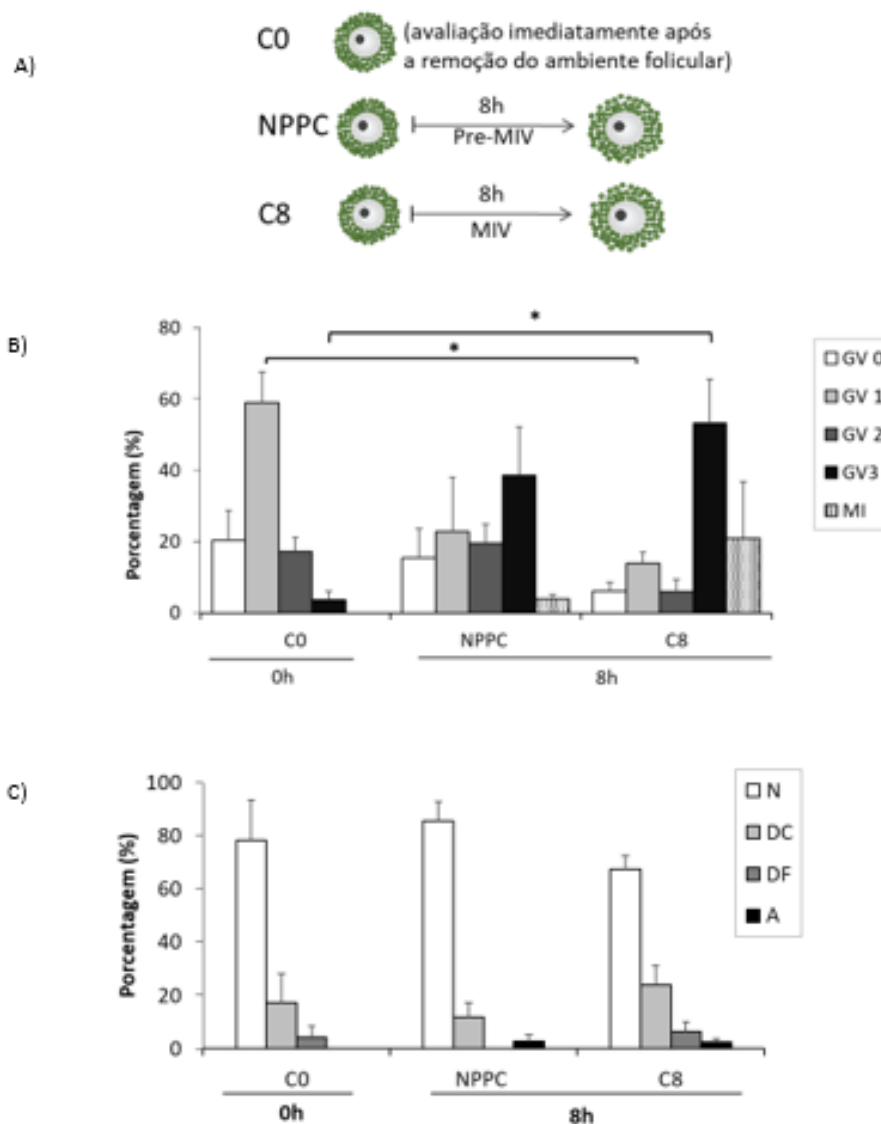


Figura 4. Modelo de cultivo *in vitro* de oócitos (A) mostrando a metodologia de cultivo de pré-maturação, de acordo com os tratamentos: C0 – avaliação imediatamente após a remoção do folículo ovariano (n = 70); NPPC – avaliação após 8h de pré-MIV com 100nM NPPC (n = 78); C8 – avaliação após 8h de MIV convencional, na ausência de NPPC (n = 75). Efeitos dos tratamentos sobre (B) a configuração da cromatina e (C) a distribuição dos microfilamentos citoplasmáticos de actina. Os dados estão apresentados na forma de média \pm erro padrão da média (EPM). Abreviaturas: vesícula germinativa (GV), metáfase I (MI), normal (N), descontínua (DC), difusa (DF) e ausente (A). *Grupos conectados por asterisco diferem estatisticamente ($P < 0,05$).

Ao final do cultivo de Pré-MIV, a expressão relativa dos genes relacionados à expansão das células do cumulus (*GREM1*, *HAS2*, *PTGS2/COX2*, *PTX3*, *TNFAIP6* e *VCAM*) foi semelhante ($P>0,05$) entre os grupos NPPC e C8, e ambos os grupos diferiram ($P<0,05$) do grupo C0 (Figura 5). A única exceção foi o gene *HAS2*, cuja expressão no grupo NPPC foi semelhante tanto em relação ao C0 como em relação ao C8 ($P>0,05$).

O cultivo de Pré-MIV por 8h alterou a expressão relativa de 14 genes relacionados à maturação, de um total de 23 genes avaliados (Figura 6). Os genes *ADCY6*, *ACDY9*, *GUCY1B3*, *IMPDH2*, *MAPK1*, *NPPC*, *NPR1*, *NPR2* e *OOSP1* não diferiram ($P>0,05$) entre os tratamentos, portanto não foram apresentados graficamente (Anexo 1). A comparação entre os grupos controle evidenciou menor expressão dos genes *BMP15*, *FSHR*, *IMPDH1*, *NOS2*, *NPR3* e *ADCY3* no grupo C8 em relação ao grupo C0 ($P<0,05$), enquanto os genes *AREG*, *BDNF*, *EGFR*, *NOS3*, *PDE5A*, *PRKCD*, *RGS2* e *STAT3* foram mais expressos em C8 ($P<0,05$). Observou-se maior expressão dos genes *BDNF*, *EGFR*, *NOS3*, *PDE5A*, *PRKCD* e *STAT3* no grupo NPPC em relação ao grupo C0 ($P<0,05$); em contrapartida, os genes *FSHR*, *NOS2* e *NPR3* foram menos expressos no grupo NPPC ($P<0,05$). Em comparação ao grupo C8, o grupo NPPC exibiu maior expressão dos genes *FSHR*, *NOS2* e *NPR3* ($P<0,05$), enquanto os genes *AREG* e *RGS2* foram menos expressos no grupo NPPC ($P<0,05$).

Foram ainda avaliados 11 genes relacionados ao desenvolvimento embrionário, sendo que o cultivo de Pré-MIV por 8h alterou a expressão relativa de 7 destes (Figura 7). Todavia, os genes *IGFBP2*, *NDUFA1*, *POU5F1* e *PRDX1* não foram afetados pelos tratamentos (dados não demonstrados graficamente; Anexo 1). Quando comparado ao grupo C0, os genes *IGF1R*, *KRT8* e *LUM* foram mais expressos no grupo NPPC ($P<0,05$), ao passo que os genes *CLIC3*, *PRDX3* e *S100A14* foram menos expressos em NPPC ($P<0,05$). Observou-se maior expressão do gene *KRT8* e menor expressão dos genes *LUM* e *S100A14* no grupo NPPC quando comparado a C8 ($P<0,05$). A comparação entre os grupos controle demonstrou menor expressão dos genes *CLIC3*, *PRDX3* e *S100A10* e maior expressão dos genes *IGF1R* e *LUM* no grupo C8 em relação ao C0 ($P<0,05$).

Expansão Células do Cumulus

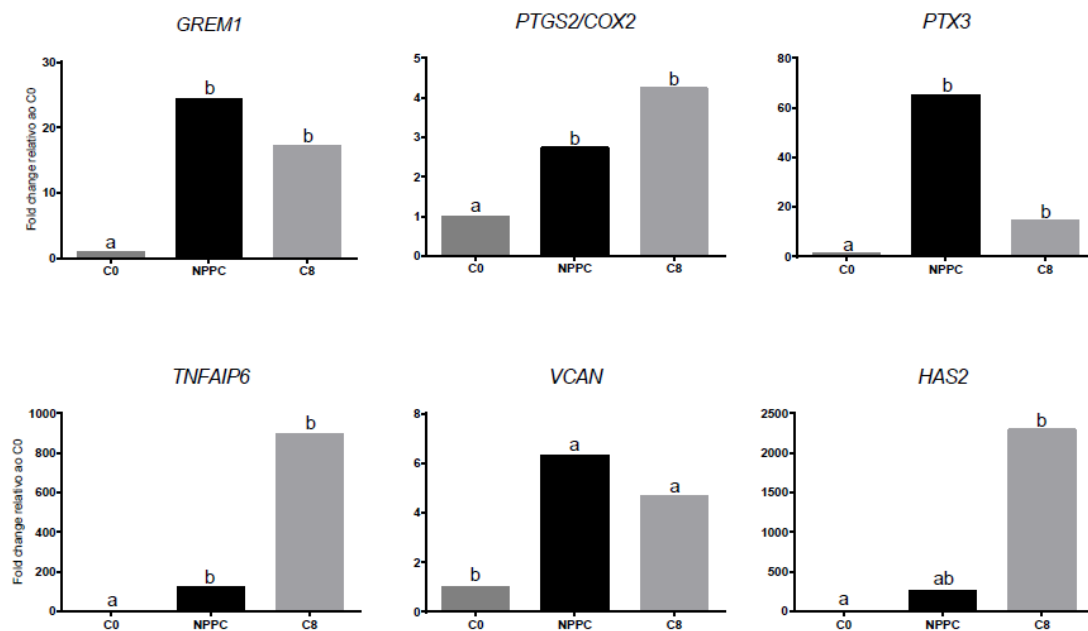


Figura 5. Abundância relativa de mRNA de genes relacionados à expansão das células do cumulus, de acordo com os tratamentos e ao término do cultivo de pré-maturação. Os dados estão apresentados como fold change relativo ao grupo controle C0 e foram calculados a partir da média de ΔCt . ^{abc} Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

Maturação oocitária

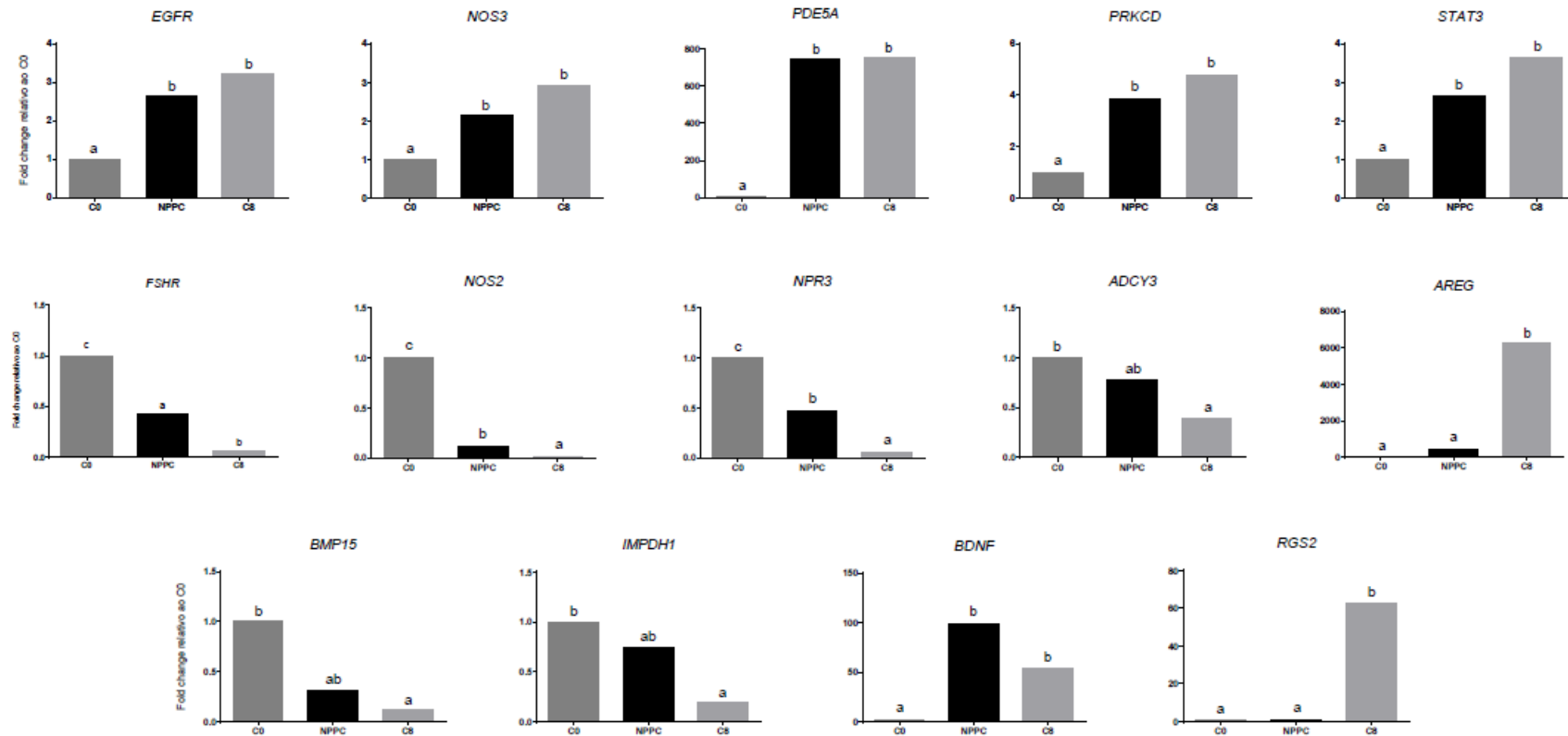


Figura 6. Abundância relativa de mRNA de genes relacionados à maturação oocitária, de acordo com os tratamentos e ao término do cultivo de pré-maturação. Os dados estão apresentados como fold change relativo ao grupo controle C0 e foram calculados a partir da média de ΔCt . ^{abc}Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

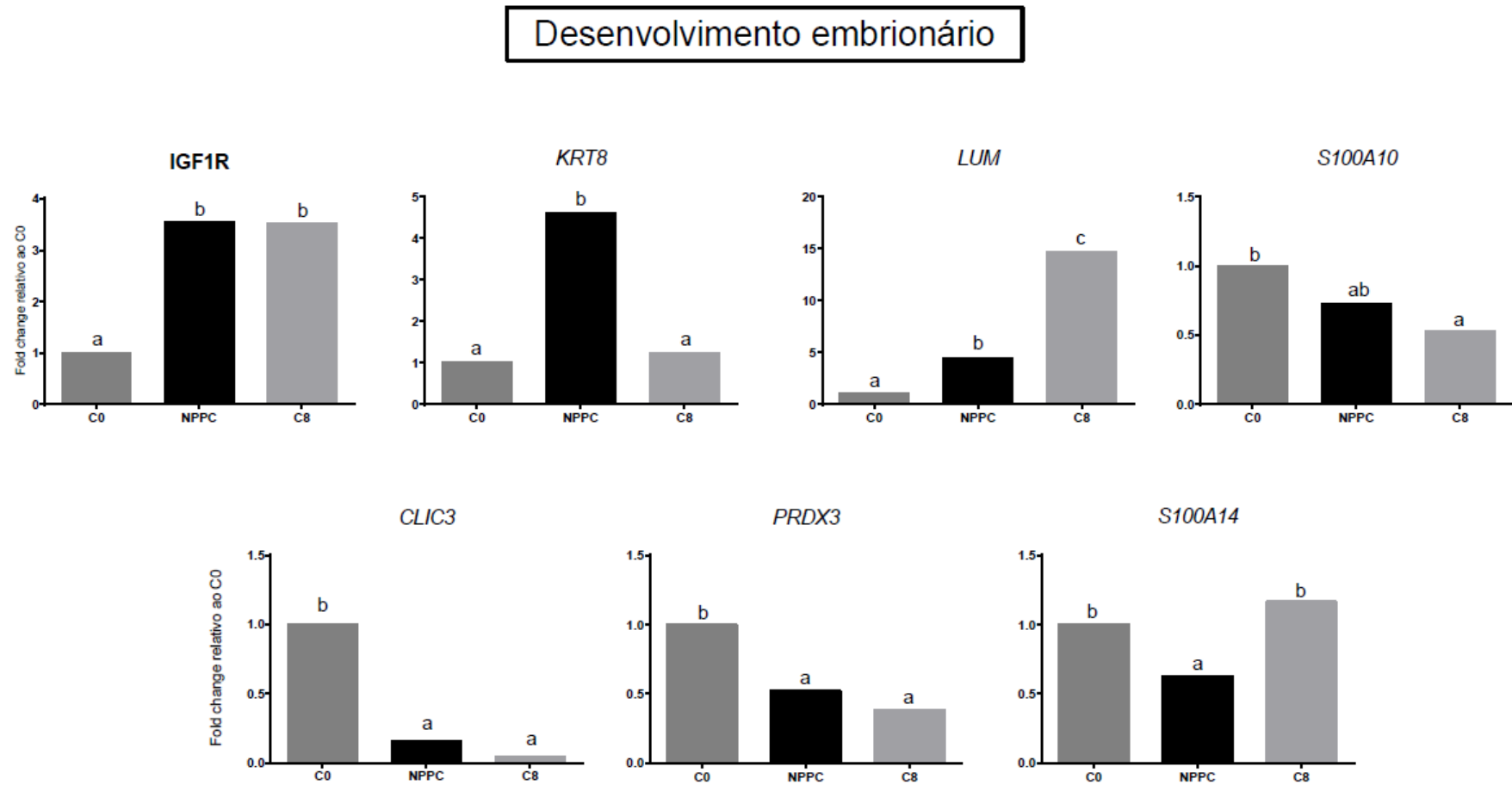


Figura 7. Abundância relativa de mRNA de genes relacionados ao desenvolvimento embrionário, de acordo com os tratamentos e ao término do cultivo de pré-maturação. Os dados estão apresentados como fold change relativo ao grupo controle C0 e foram calculados a partir da média de ΔCt . ^{abc}Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

4.2 Experimento II

A configuração da cromatina dos oócitos pode ser visualizada na Figura 8B. Independentemente do tratamento, a maioria dos oócitos atingiu o estágio de MII ao término do cultivo de maturação *in vitro* (83,23% em média para os grupos controle e bloqueado, sem diferença entre grupos; $P>0,05$). No entanto, o grupo C30 apresentou maior taxa ($P<0,05$) de oócitos degenerados (11,6%) em comparação aos grupos NPPC (2,5%) e C22 (3,6%).

A Figura 8C demonstra o padrão de distribuição dos microfilamentos citoplasmáticos de actina. Não foram observadas alterações na disposição dos microfilamentos nos diferentes tratamentos ($P>0,05$), sendo que a maioria dos oócitos apresentou configuração normal destas estruturas (82,65%, em média).

Observou-se alteração ($P<0,05$) na expressão relativa de 2 genes-alvo relacionados à expansão das células do cumulus (de um total de 6 genes avaliados) quando se comparou os grupos C22 e C30, sendo que C30 exibiu maiores níveis de expressão de *PTGS2/COX2* e *PTX3* (Figura 9). Os genes *PTGS2/COX2* e *PTX3* tiveram maior expressão no grupo NPPC em relação ao C22 ($P<0,05$). Já em comparação ao grupo C30, o grupo NPPC apresentou maior expressão ($P<0,05$) do gene *PTX3*, ao passo que o gene *PTGS2/COX2* não diferiu entre esses grupos ($P>0,05$).

A expressão relativa dos genes relacionados à maturação oocitária foi alterada ($P<0,05$) em 6 genes ao se comparar os grupos controle C22 e C30 (Figura 9): os genes *ADCY6* e *NOS3* foram mais expressos em C30, porém o gene *PDE5A* foi menos expresso nesse grupo. O gene *BMP15* teve maior expressão no grupo NPPC em relação ao grupo C22 ($P<0,05$), ao passo que os genes *AREG*, *ADCY6*, *BDNF*, *NOS3* e *PDE5A* não diferiram entre esses dois tratamentos ($P>0,05$). Porém, quando comparado ao grupo C30, observou-se maior expressão dos genes *AREG* e *BDNF* no grupo NPPC ($P<0,05$).

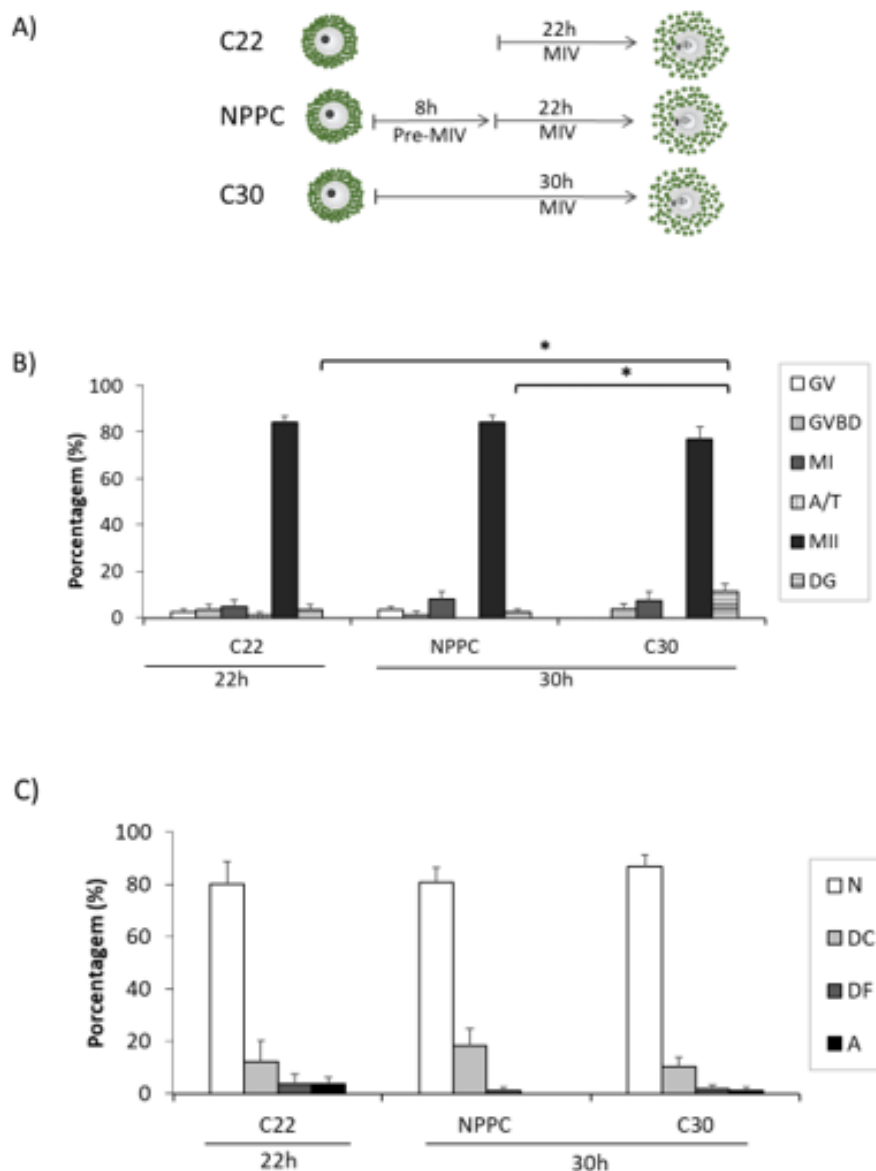


Figura 8. Modelo de cultivo *in vitro* de oócitos (A) mostrando a metodologia de cultivo de pré-maturação, de acordo com os tratamentos: C22 – avaliação após 22h de MIV (n = 83), na ausência de NPPC; NPPC: avaliação após 8h de pré-MIV com 100nM NPPC (n = 73), seguida de 22h de MIV, na ausência de NPPC; C30 – avaliação após 30h de MIV (n = 84), na ausência de NPPC. Efeitos dos tratamentos sobre (B) a configuração da cromatina e (C) a distribuição dos microfilamentos citoplasmáticos de actina. Os dados estão apresentados na forma de média \pm erro padrão da média (EPM). Abreviaturas: vesícula germinativa (GV), quebra da vesícula germinativa (GVBD), metáfase I (MI), anáfase/telófase (A/T), metáfase II (MII), DG (degenerado), normal (N), descontínua (DC), difusa (DF) e ausente (A). *Grupos conectados por asterisco diferem estatisticamente ($P < 0,05$).

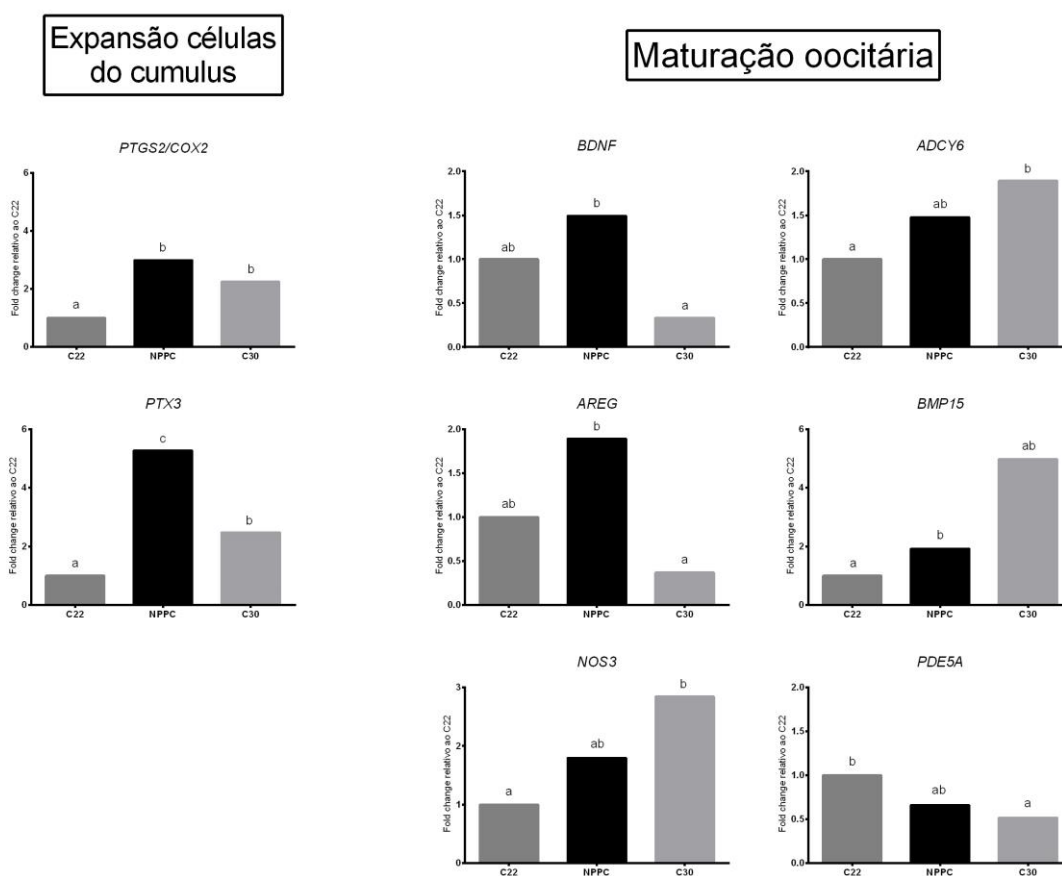


Figura 9. Abundância relativa de mRNA de genes relacionados à expansão das células do cumulus e maturação oocitária, de acordo com os tratamentos e ao término do cultivo de pré-maturação seguido do cultivo de maturação *in vitro*. Os dados estão apresentados como fold change relativo ao grupo controle C22 e foram calculados a partir da média de ΔCt . ^{abc}Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

Com relação à avaliação dos genes relacionados ao desenvolvimento embrionário (total de 11 genes; Anexo 2), foi observada diferença ($P>0,05$) apenas na expressão relativa do gene *LUM*, o qual foi mais expresso no grupo NPPC em comparação aos grupos controle C22 e C30 (Figura 10). Não foram observadas diferenças entre os grupos controle C22 e C30 ($P>0,05$).

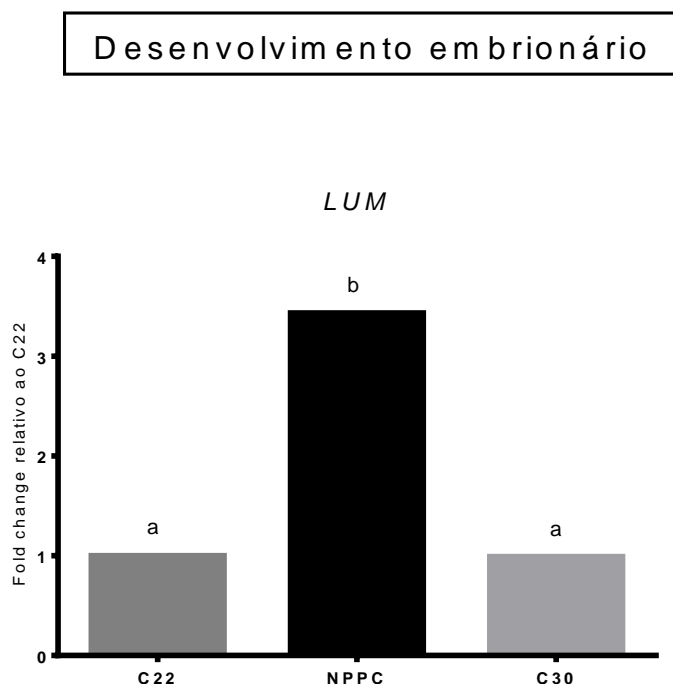


Figura 10. Abundância relativa de mRNA de genes relacionados ao desenvolvimento embrionário, de acordo com os tratamentos e ao término do cultivo de pré-maturação seguido do cultivo de maturação *in vitro*. Os dados são apresentados como fold change relativo ao grupo controle C22 e foram calculados a partir da média de ΔCt . ^{ab}Letras diferentes indicam diferença significativa ($P<0,05$).

4.3 Experimento III

Este experimento foi delineado visando avaliar a competência de desenvolvimento de oócitos submetidos a pré-MIV com NPPC, seguido de um

período de cultivo de MIV. Após a MIV, os oócitos foram fertilizados *in vitro* e a clivagem dos embriões foi avaliada no D3. A taxa média de clivagem dos grupos experimentais foi de 73,22% (Figura 11A), não sendo observadas diferenças entre os tratamentos ($P>0,05$). A taxa de desenvolvimento embrionário no D7 (Figura 11B) diferiu ($P<0,05$) entre os grupos C22 (69,3%) e C30 (37,4%), mas ambos estes tratamentos não diferiram ($P>0,05$) do grupo NPPC (44,5%).

Com relação à avaliação da qualidade embrionária, não houve diferença ($P>0,05$) entre os tratamentos quanto ao número de células totais (101,63%, em média; Figura 11C) e na proporção de células apoptóticas (4,5%, em média; Figura 11D).

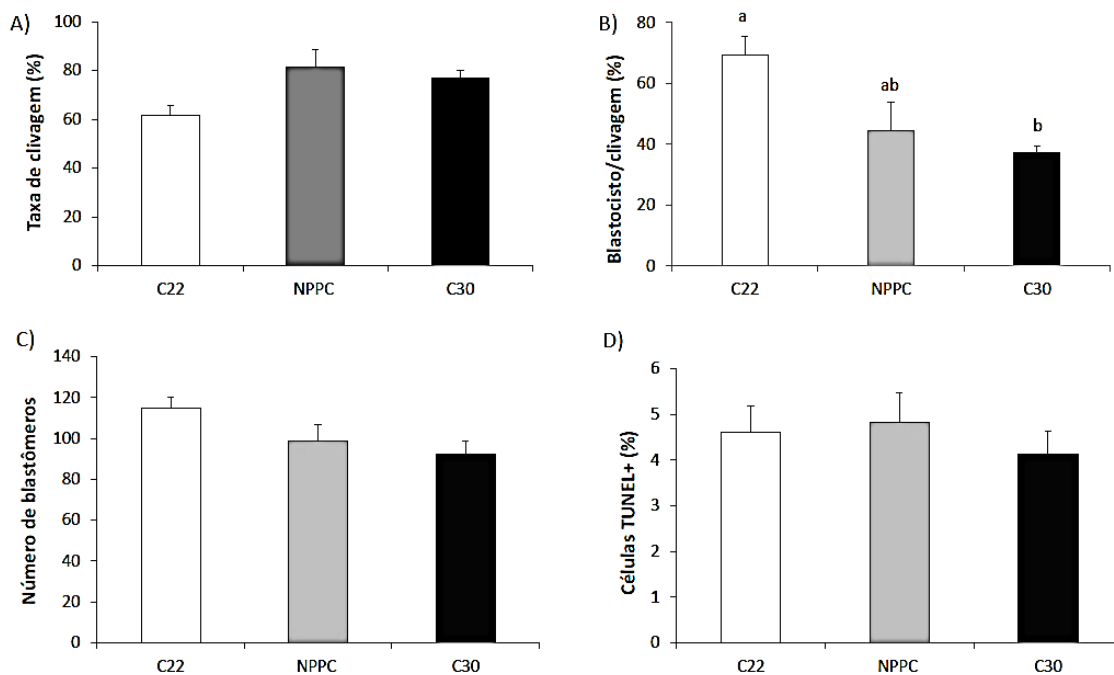


Figura 11. Efeitos do cultivo de pré-maturação com NPPC durante 8 horas seguido pelo cultivo de maturação *in vitro* durante 22 horas sobre (A) a clivagem e (B) desenvolvimento embrionário até a fase de blastocistos (calculado sobre o número de oócitos clivados), bem como sobre a qualidade embrionária avaliada pelo (C) número total de células e (D) proporção de células apoptóticas (TUNEL+). ^{ab}Letras diferentes indicam diferença significativa ($P<0,05$).

5 DISCUSSÃO

Para que o embrião pré-implantacional se desenvolva a termo, a qualidade oocitária no momento da fertilização é extremamente importante, pois os primeiros estágios do desenvolvimento do embrião dependem da herança materna adquirida durante a oogênese e foliculogênese (MOUSSA et al., 2015). Por esta razão, o oócito e seu processo de maturação são alvos constantes de estudos. Visando melhorar a aquisição de competência dos oócitos bovinos para o desenvolvimento embrionário *in vitro*, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos do NPPC durante o cultivo de pré-maturação *in vitro* sobre a progressão da condensação da cromatina do oócito e sobre os padrões de expressão gênica das células do cumulus. O sistema proposto de pré-maturação *in vitro* foi capaz de promover um atraso (ou lentificação) da progressão da maturação nuclear e alteração na expressão de genes relacionados à competência oocitária, o que foi importante para evitar o envelhecimento e degeneração do oócito durante o período prolongado de cultivo (30 horas, incluindo o cultivo de pré-maturação seguido da maturação *in vitro*). Esta prevenção do envelhecimento permitiu a manutenção da competência para o desenvolvimento embrionário, uma vez que a proporção de embriões desenvolvidos até o estágio de blastocisto foi semelhante à dos oócitos maturados em tempo convencional (24 horas).

Os oócitos das fêmeas bovinas permanecem bloqueados na prófase da primeira redução meiótica, devido a uma série de eventos que ocorrem no ambiente folicular e que mantem os altos níveis intra-oocitários de cAMP (CONTI et al., 2012; BILODEAU-GOESEELS, 2011; DEKEL, 2005; CONTI et al., 2002). Durante este estado de bloqueio, a cromatina assume diferentes configurações de condensação e, quando atinge o estágio de GV3, o oócito torna-se transcricionalmente inativo (LUCIANO et al., 2014). No presente estudo, foi demonstrada a progressão da condensação da cromatina desde o momento da remoção do oócito imaturo do ambiente folicular (grupo C0, com maior proporção de oócitos em GV1, que exibem atividade transcricional) até o momento esperado para que ocorra a retomada da meiose *in vitro*, ou seja, até as 8 horas de cultivo de MIV, quando ocorre a GVBD *in vitro* (grupo C8, com

maior proporção de oócitos em GV3, sem atividade transcricional). Os oócitos pré-maturados pelo mesmo período, na presença de NPPC, exibiram taxas de GV, em todas as categorias, semelhantes tanto ao grupo C0 quanto ao C8, indicando que o sistema proposto de cultivo com NPPC não foi eficiente para bloquear completamente a meiose, porém, permitiu que a progressão ocorresse de forma mais lenta do que a observada no grupo C8 (sem NPPC). Esses resultados são promissores, pois oócitos com padrão de cromatina 0, 1 e 2 (GV0, GV1 e GV2) possuem atividade transcricional (síntese de RNA), ao passo que oócitos em GV3 são caracterizados por total silenciamento transcricional (LODDE et al., 2008). O período que compreende a compactação da cromatina de GV0 a GV2 é de extrema importância pois, através da atividade transcricional, ocorre o acúmulo de moléculas e transcritos, permitindo que o oócito complete a maturação e inicie o desenvolvimento embrionário até que o embrião ative seu genoma (FAIR, 2003; LODDE et al., 2008).

Com exceção dos oócitos em GV0, que apesar da alta atividade transcricional não possuem capacidade para retomar e completar a meiose *in vitro* (pois ainda estão nos estágios iniciais de acúmulo de moléculas essenciais), oócitos em GV1 e GV2 são aptos a continuar o desenvolvimento *in vitro* e podem resultar em melhor aquisição de competência para o desenvolvimento (LODDE et al., 2008, 2013; LUCIANO et al., 2011). Porém, os procedimentos empregados para a realização da MIV convencional estimulam espontaneamente a maturação nuclear, como demonstrado em trabalhos anteriores da nossa equipe (DALL'ACQUA et al., 2017; AMBROGI et al., 2016). No presente trabalho, foi observado que oócitos do grupo C8 progrediram a meiose até os estágios de GV3 e MI, havendo menor proporção de oócitos em GV1 e GV2. Desta forma, os oócitos submetidos à MIV convencional, mesmo que estejam em GV1 e GV2, podem não ter tempo suficiente para acumular a quantidade necessária de moléculas e transcritos até o final do cultivo de MIV tradicional (24 horas), e isso pode explicar porque a PIVE permanece estacionada na casa dos 40% de desenvolvimento embrionário, apesar de melhorias isoladas que são apontadas em diversos estudos. Por isso, a lentificação do processo de progressão da meiose, utilizando-se um sistema de cultivo de pré-maturação *in vitro* anterior a etapa de maturação *in vitro*, com

uso de substâncias que inibam ou lentifiquem a retomada da meiose, pode ser muito vantajosa para permitir mais tempo para o acúmulo de moléculas essenciais à aquisição da competência do oócito.

Adicionalmente, o cultivo de pré-maturação com NPPC promoveu menor taxa de oócitos com degeneração nuclear em relação ao grupo C30. Como consequência desta maior degeneração (envelhecimento), a MIV por período prolongado (grupo C30) resultou em menor número de oócitos que atingiram o estágio de blastocisto, em comparação ao grupo maturado em tempo padrão (grupo C22). Dessa forma, mesmo que a taxa de desenvolvimento embrionário não tenha sido afetada pelo uso de NPPC, o retardo da progressão meiótica evidencia a vantagem do sistema de pré-maturação em relação ao simples prolongamento do tempo da MIV convencional na ausência de inibidor, conferindo proteção ao oócito e impedindo o seu envelhecimento. Esses resultados são interessantes, pois o prolongamento do tempo de cultivo pode ser benéfico na prática da produção *in vitro* de embriões em diferentes situações, como, por exemplo, no transporte de oócitos obtidos por aspiração folicular de doadoras mantidas em fazendas localizadas a longas distâncias do laboratório e também quando há interesse do laboratório em sincronizar o momento de fecundação *in vitro* de oócitos colhidos em momentos diferentes, visando a otimização na utilização de palhetas de sêmen de elevado valor comercial.

Apesar dos resultados benéficos obtidos no presente estudo, o bloqueio da meiose não foi completo como anteriormente demonstrado em ratos e suínos (Zhang et al., 2011, 2017). De acordo com esses estudos, o completo bloqueio meiótico deveu-se em decorrência do aumento do GMPc em células da granulosa, cumulus e no próprio oócito, com consequente aumento ou manutenção dos elevados níveis de AMPc. Contudo, em bovinos, foi anteriormente demonstrado que o NPPC mantém os níveis de GMPc e AMPc elevados por, no máximo, 3 horas (CESARO et al., 2015). Contudo, outro estudo demonstrou que a associação do NPPC com concentrações fisiológicas de FSH resultou em eficiente bloqueio da meiose em oócitos bovinos por até 8 horas (Franciosi et al., 2014), provavelmente pelo fato de que o FSH favorece a manutenção de níveis elevados de AMPc (ALBERTINI, 2003; KHAN et al., 2015). Desta forma, parece que a intensidade e duração do efeito do NPPC

sobre a meiose, em bovinos, parece depender da interação com outros fatores presentes no cultivo que consigam potencializar ou prolongar a sua ação. Desta forma, a ausência de hormônios no meio de pré-maturação com NPPC, no presente estudo, pode ser a explicação para não ter sido observado o bloqueio completo após 8 horas de cultivo, e sim uma lentificação da progressão da condensação da cromatina.

Adicionalmente aos resultados de configuração da cromatina (maturação nuclear), os padrões de expressão gênica dos grupos tratado (NPPC) e não tratados com NPPC (C0 e C8), revelaram aumento na expressão de genes relacionados à expansão das células do cumulus no grupo NPPC em relação ao grupo C0. A expansão das células do cumulus e conseqüentemente a maturação oocitária em si iniciam-se após o estímulo pré-ovulatório de LH e embora a expansão das CCs possa ocorrer de forma isolada em condições *in vitro*, ela é um indicativo de maturação oocitária, evidenciando a relação entre os eventos (MAREI et al., 2012). Ao interagir com seus receptores presente nas células murais da granulosa, o LH, via ativação da proteína cinase C (PKC – codificada pelo gene *PRKCD*), ativa a via dos fatores semelhantes ao EGF (“EGF-like factors”: ampirregulina – AREG; epirregulina – EREG; betacelulina - BTC), os quais têm por finalidade, em associação com os fatores secretados pelo oócito, GDF9 e BMP15, propagar o efeito do LH para as células do cumulus e conseqüentemente para os oócitos (MA et al., 2015; HABERMAN et al., 2011), desencadeando o evento de maturação oocitária.

Proteínas pertencentes à família das MAP *kinase* (MAPK1/ERK2 e MAPK3/ERK1) são ativadas como resultado do estímulo gonadotrófico e estimulam a expressão de genes que codificam proteínas relacionadas à expansão das células do cumulus como: os genes *GREM1*, *HAS2* (codifica a enzima ácido hialurônico sintase) (GILCHRIST; ARMSTRONG 2004), *PTX3* (codifica uma proteína que confere estabilidade ao complexo por se ligar a proteína TNFAIP6) (SALUSTRI et al., 2004), *TNFAIP6* (tem a expressão induzida majoritariamente pelo gene *PTGS2/COX2* e confere estabilização ao complexo celular em expansão), *PTGS2/COX2* e *VCAN* (codifica os proteoglicanos versican que favorecem a adesão entre as células do cumulus) (Merriles et al., 2016). Como resultado destes eventos, as células do cumulus expandem, as junções “gap” são fechadas, e o GMPc nestas células, bem

como o seu fluxo para o ambiente intra-oocitário, diminui, permitindo a ativação da PDE5A e PDE3A, degradação de AMPc, ativação do fator promotor da maturação (MPF) e reinício da progressão meiótica (Lodde et al., 2013; Conti et al., 2012; Sánchez; Smitz, 2012).

A partir dos mecanismos descritos e dos resultados encontrados no presente trabalho, em que foi possível observar maior expressão dos genes relacionados à expansão das células do cumulus e de genes relacionados à maturação/competência oocitária como *BDNF*, *EGFR*, *PDE5A*, *PRKCD* e *STAT3* no grupo NPPC em relação ao grupo C0, além da semelhança de expressão gênica do grupo NPPC com o grupo submetido à MIV convencional (C8) podemos sugerir que o retardo na progressão meiótica, ao invés do bloqueio meiótico em oócitos bovinos a partir do cultivo de pré-maturação *in vitro* com 100nM de NPPC por 8 horas pode ser devido a ativação de uma via alternativa a via do NPPC-GMPc-AMPc em bovinos, como por exemplo a ativação da via do EGF, que vem ganhando foco, como possível via a ser controlada para evitar a progressão meiótica em oócitos submetidos à PIVE (VIGNERON et al., 2004; da ROSA et al., 2017).

A progressão da meiose quando o grupo NPPC foi submetido à MIV convencional por 22h (totalizando 30 horas de cultivo de MIV) não diferiu dos grupos C22 e C30, confirmando os achados na literatura de que o NPPC não é prejudicial ao processo de maturação oocitária (ZHANG et al., 2011; FRANCIOSI et al., 2014). Ao final da pré-MIV+MIV (NPPC) e ao final da MIV convencional por 22 e 30h (C22 e C30), as CCs mantiveram elevada a expressão do gene *BDNF*, e apresentaram maior expressão do gene *AREG* no grupo NPPC, em relação ao grupo C30. Este aumento acentuado do gene *AREG* no grupo NPPC ao final do cultivo de maturação, reforça a ideia da ativação da via alternativa do EGFR para retomada da meiose nesse grupo.

As células do cumulus são usualmente utilizadas para detecção de genes que atuam como potenciais marcadores de qualidade e desenvolvimento embrionário (revisado por BUNEL et al., 2015), pois sabe-se que até o momento da ativação do genoma do embrião bovino o desenvolvimento é possível devido aos estoques maternos acumulados durante o bloqueio meiótico (CARROCERA et al., 2016; MACHADO et al., 2015), sendo que em

humanos, correlações positivas entre a expressão de genes nas células do cumulus e o desenvolvimento embrionário foram descritas (MCKENZIE et al., 2004).

Dessa forma no estudo em questão elencamos alguns genes relacionados a estes eventos e foi possível avaliar maior expressão dos genes *IGF1R*, *KRT8* e *LUM* no grupo NPPC, em relação ao grupo C0. O fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e seu receptor (IG1R) relacionam-se com a aquisição de competência oocitária para o desenvolvimento embrionário, além de estarem intimamente relacionados com a implantação dos embriões; em bovinos, a adição de IGF ao meio de cultivo *in vitro* melhora a aquisição de competência, além de melhorar o desenvolvimento embrionário (NUTTINCK et al., 2004; WANG et al., 2009). Os genes *KRT8* e *LUM* apresentam elevada expressão nos embriões em estágios de 2 a 8 células e relacionam-se principalmente com os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário, favorecendo a divisão celular, bem como proteção contra apoptose (BUNEL et al., 2015). A maior expressão desses genes evidenciada neste trabalho, pode nos sugerir que o NPPC, de acordo com os resultados de maturação nuclear (% de oócitos degenerados – FIGURA 8B), pode ter prevenido o envelhecimento oocitário e conferido tempo para melhorar a aquisição de competência destes gametas. No entanto, ao avaliar a expressão gênica ao final da MIV convencional (C22), da MIV convencional estendida por 30h (C30) e pré-MIV+MIV (NPPC, totalizando 30h) notou-se apenas maior expressão do gene *LUM* no grupo NPPC em relação aos controles (C22 e C30) e ao observar os reflexos desse sistema sobre o desenvolvimento embrionário constatou-se que não houve melhora na taxa de desenvolvimento embrionário. Contudo o grupo C30 apresentou menor taxa de desenvolvimento embrionário em relação ao grupo C22 ($P < 0,05$) e numericamente menor em relação ao NPPC ($P > 0,05$), evidenciando que o simples prolongamento da maturação *in vitro* não é favorável à aquisição de competência oocitária para o desenvolvimento embrionário, ao contrário disto, favorece ao envelhecimento e morte do gameta, refletindo em menores taxas de blastocistos (LEBEDEVA et al., 2014).

A partir deste resultado e associando as condições de trabalho presentes em nosso laboratório, podemos afirmar que o cultivo de pré-maturação *in vitro* com NPPC para o sistema adotado não apresentou vantagens quanto à taxa de maturação nuclear. Contudo, preveniu o envelhecimento dos oócitos e genes relacionados à qualidade e desenvolvimento embrionário, foram mais expressos nas células do cumulus de oócitos submetidos à pré-maturação, sugerindo e concordando com a necessidade do uso de um sistema de pré-MIV, anterior à MIV, para melhorar a qualidade dos oócitos submetidos à PIVE. Por fim, a partir da literatura pesquisada para a realização desse trabalho, não foram encontrados estudos semelhantes, o que faz com o nosso trabalho que este seja o primeiro a correlacionar os dados de maturação nuclear com os dados de expressão gênica de CCOs bovinos pré-maturados *in vitro* com a presença de 100nM de NPPC.

6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que o cultivo de pré-maturação de oócitos bovinos com NPPC durante 8h não promoveu o bloqueio completo da meiose, todavia, a dinâmica do remodelamento da cromatina dos oócitos imaturos tratados com NPPC foi mais lenta do que a de oócitos não tratados. A progressão mais gradual da meiose permitiu a manutenção dos oócitos em cultivo por período mais prolongado (até 30h) sem aumentar as taxas de envelhecimento e degeneração. Como consequência, a capacidade de desenvolvimento embrionário dos oócitos tratados com NPPC não foi alterada pelo cultivo prolongado.

Agradecimentos

O presente estudo foi apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil. G.B.N foi apoiada por uma bolsa de estudos fornecida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Brasil.

Os autores agradecem o Brasfigo pelas doações de material biológico para o presente estudo e aos técnicos, Adão A. Custódio e Alexandre J. Teixeira por toda cooperação.

Os autores agradecem o Professor Dr. Marcelo Nogueira e a Doutoranda Patrícia Kubo Fontes, pela importante contribuição para a realização do presente trabalho.

7 REFERÊNCIAS

ALBUZ, F. K.; SASSEVILLE, M.; LANE, M.; ARMSTRONG, D. T.; THOMPSON, J. G.; GILCHRIST, R. B. Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel *in vitro* maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. **Human Reproduction**, v. 25, p. 2999-3011, 2010.

AMBROGI, M.; DALL'ACQUA, P. C.; ROCHA-FRIGONI, N. A. S.; LEÃO, B. C. S.; MINGOTI, G. Z. Transporting bovine oocytes in a medium supplemented with different macromolecules and antioxidants: effects on nuclear and cytoplasmic maturation and embryonic development *in vitro*. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52 (3), p. 409-421, 2017.

ASSIDI, M.; DUFORT, I.; ALI, A.; HAMEL, M.; ALGRIANY, O.; DIELEMANN, S.; SIRAR, M-A. Identification of potential markers of oocyte competence expressed in bovine cumulus cells matured with follicle-stimulating hormone and/or phorbol myristate acetate *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 79, p. 209-222, 2008.

BILODEAU-GOESEELS, S. Cows are not mice: the role of cyclic AMP, phosphodiesterase, and adenosine monophosphate-activated protein kinase in the maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 78, p. 734-743, 2011.

BLONDIN P, SIRARD M-A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 4, p. 54-62, 1995.

BUNEL, A.; JORSSSEN, E. P.; MERCKX, E.; LEROY, J. L.; BOLS, P. E.; SIRARD, M. A. Individual bovine *in vitro* embryo production and cumulus cell transcriptomic analysis to distinguish cumulus-oocyte complexes with high or low developmental potential. **Theriogenology**, v.83, p. 228-237, 2015.

CARROCERA, S.; CAAMAÑO, J. N.; TRIGAL, B.; MARTÍN, B.; DÍEZ, C. Developmental kinetics of *in vitro*-produced bovine embryos: An aid for making decisions. **Theriogenology**, v. 85, p. 822-827, 2016.

de CESARO, M. P.; MACEDO, M. P.; SANTOS, J. T.; ROSA, P. R. A.; LUDKE, C. A.; RISSI, V. B.; GASPERIN, B. G.; GONÇALVES, P. B. D. Natriuretic peptides stimulate oocyte meiotic resumption in bovine. **Animal Reproduction Science**, v. 159, p. 52-59, 2015.

de CESARO, M. P.; SANTOS, J. T.; FERST, J. G.; NÓBREGA Jr, J. E.; ROSA, P. R. A.; ROVANI, M. T.; ILHA, G. F.; BOHRER, R. C.; FERREIRA, R.; GASPERIN, B. G.; BORDIGNON, V.; GONÇALVES, P. B. D. Natriuretic peptide system regulation in granulosa cells during follicle deviation and ovulation in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, p. 1-8, 2018. DOI: 10.1111/rda.13161

CONTI, M.; ANDERSEN, C. B.; RICHARD, F.; MEHATS, C.; CHUN, S-Y.; HORNER, K.; JIN, C.; TSAFRIRI, A. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 187, p. 153-159, 2002.

CONTI, M.; HSIEH, M.; ZAMAH, A. M.; OH, J. S. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 356, p. 65-73, 2012.

DALL'ACQUA, P. C.; LEÃO, B. C. S.; ROCHA-FRIGONI, N. A. S.; GOTTARDI, F. P.; MINGOTI, G. Z. Delaying meiotic resumption during transportation of bovine cumulus-oocyte complexes: effects on development, apoptosis and caspases activity of *in vitro*-produced embryos. **Zygote**, v. 25(6), p. 740-750, 2017.

DEKEL, N. Cellular, biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 234, p. 19-25, 2005.

DIECI, C.; LODDE, V.; LABREQUE, R.; DUFORT, I.; TESSARO, I.; SIRARD, M-A.; LUCIANO, A. M. Differences in cumulus cell gene expression. indicate the benefit of a pre-maturation step to improve in-vitro ovine embryo production. **Molecular Human Reproduction**, v. 22, p. 882-897, 2016.

EDRY, I.; SELA-ABRAMOVICH, S.; DEKEL, N. Meiotic arrest of oocyte depends on cell-to-cell communication in the ovarian follicle. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 252, p. 102-106, 2006.

EPPIG, J. J.; DOWNS, S. M. Chemical signals that regulate mammalian oocyte maturation. **Biology of Reproduction**, v. 30, p.1-11, 1984.

FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal Reproduction Science**, v.78, p. 203-216, 2003.

FAIR, T.; CARTER F.; PARK, S.; EVANS, A. C. O.; LONERGAN, P. Global gene expression analysis during bovine oocyte in vitro maturation. **Theriogenology**, v.68S, p. S91-S97, 2007.

FERREIRA E. M.; VIREQUE, A. A.; ADONA, P. R.; MEIRELLES, F. V.; FERRIANI, R. A.; NAVARRO, P. A. A. S. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modification and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71, p. 836-848, 2009.

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, p. 1–11, 2014.

FRANCIOSI, F.; COTICCHIO, G.; LODDE, V.; TESSARO, I.; MODINA, S. C.; FADINI, R.; DAL CANTO, M.; RENZINI, M. M.; ALBERTINI, D. F.; LUCIANO, A. M. Natriuretic Peptide Precursor C delays meiotic resumption and sustains gap junction-mediated communication in bovine cumulus-enclosed oocytes. **Biology Reproduction**, v. 91(3), p.1-9, 2014.

GERSHON, E.; PLAKS, V.; DEKEL, N. Gap junctions in the ovary: expression, localization and function. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.282, p. 18-25, 2008.

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

GILCHRIST, R. B.; RITTER, L. J.; ARMSTRONG, D. T. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 431-446, 2004.

HABERMAN, Y.; ALON, L. T.; ELIYAHU, E.; SHALGI, R. Receptor for activated C kinase (RACK) and protein kinase C (PKC) in egg activation. **Theriogenology**, v. 75, p.80-89, 2011.

IOZZO, R. V. The family of the small leucine-rich proteoglycans: key regulators of matrix assembly and cellular growth. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v.32, p. 141-174.

KHAN, D. R.; GUILLEMETTE, C.; SIRARD, M. A.; RICHARD, F. J. Characterization of FSH signalling networks in bovine cumulus cells: a perspective on oocyte competence acquisition. **Molecular Human Reproduction**, v.21, p. 688-701, 2015.

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

LEBEDEVA, I. Y.; SINGINA, G. N.; LOPUKHOV, A. V.; ZINOVIEVA, N. A. Dynamics of morphofunctional changes in aging bovine ova during prolonged culture in vitro. **Cell and Tissue Biology**, v. 8, p. 258-266, 2014.

LIMA, L. F.; BRUNO, J. B.; da SILVA, A. M. S.; DUARTE, A. B. C.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Importância das comunicações intercelulares para o desenvolvimento de folículos ovarianos. **Reprodução Climática**, v. 31, p.93-104, 2016.

LIMA, P. F.; ORMOND, C. M.; CAIXETA, E. S.; BARROS, R. G.; PRICE, C. A.; BURATINI, J. Effect of Kit ligand on natriuretic peptide precursor C and oocyte maturation in cattle. **Reproduction**, v. 52, p.481–489, 2016.

LODDE, V.; MODINA, S.; MADDOX-HYTTEL, P.; FRANCIOSI, F.; LAURIA, A.; LUCIANO, A. M. Oocyte morphology and transcriptional silencing in relation to chromatin remodeling during the final phases of bovine oocyte growth. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, p. 915-924, 2008.

LODDE V, MODINA S, GALBUSERA C, FRANCIOSI F, LUCIANO A B. Large-scale chromatin remodeling in germinal vesicle bovine oocytes: interplay with gap junction functionality and developmental competence. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, p. 740-749, 2013.

LODDE, V.; FRANCIOSI, F.; TESSARO, I.; MODINA, S. C.; LUCIANO, A. M. Role of gap junction-mediated communications in regulating large-scale chromatin configuration remodeling and embryonic developmental competence acquisition in fully grown bovine oocyte. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 30, p.1219-1226, 2013.

LUCIANO, A. M.; FRANCIOSI, F.; MODINA, S. C.; LODDE, V. Gap junction-mediated communications regulate chromatin remodeling during bovine oocyte growth and differentiation through cAMP-dependent mechanism(s). **Biology Reproduction**, v. 85, p. 1252-1259, 2011.

MA, W.; BAUMANN, C.; VIVEIROS, M. M. Lack of protein kinase C-Delta (PKC δ) disrupts fertilization and embryonic development. **Molecular Reproduction & Development**, v. 82, p. 797-808, 2015.

MACHADO, F. M.; CAIXETA, E. S.; SUDIMAN, J.; GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G.; LIMA, P. F.; PRICE, C. A.; BURATINI, J. Fibroblast growth factor 17 and bone morphogenetic protein 15 enhance cumulus expansion and improve quality of *in vitro*-produced embryos in cattle. **Theriogenology**, v. 84, p. 390-398, 2015.

MCKENZIE, L. J.; PANGAS, S. A.; CARSON, S. A.; KOVANCI, E.; CISNERO, P.; BUSTER, J. E.; AMATO, P.; MATZUK, M. M. Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. **Human Reproduction**, v.19, p. 2869-2874, 2004.

MERRILEES, M. J.; ZUO, N.; EVANKO, S. P.; DAY, A. J.; WIGHT, T. N. GI domain of versican regulates hyaluronan organization and the phenotype of cultured human dermal fibroblasts. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 64, p. 353-363, 2016.

MISONO, K. S.; PHILO, J. S.; ARAKAWA, T.; OGATA, C. M.; QIU, Y.; OGAWA, H.; YOUNG, H. S. Structure, signaling mechanism and regulation of natriuretic peptide receptor-guanylate cyclase. **The FEBS Journal**, v. 278, p.1818-1829, 2012.

MOORE, S. G.; HASLER, J. F. A 100-Year review: reproductive technologies in dairy science. **Journal of the Dairy Science**, v. 100, p. 10314-10331, 2017.

MOUSSA, M.; SHU, J.; ZHANG, X. H.; ZENG, F. Maternal control of oocyte quality in cattle "a review". **Animal Reproduction Science**, v. 155, p.11-27, 2015.

NORRIS, R. P.; RATZAN, W. J.; FREUDZON, M.; MEHLMANN, L. M.; KRALL, J.; MOVSESIAN, M. A.; WANG, H.; KE, H.; NIKOLAEV, V. O.; JAFFE, L. A. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. **Development**, v.136, p. 1869-1878, 2009

NUTTINCK, F.; CHARPIGNY, G.; MERMILLOD, P.; LOOSFELT, H.; MEDURI, G.; FRERET, S.; GRIMARD, B.; HEYMAN, Y. Expression of components of insulin-like growth factor system and gonadotropin receptors in bovine cumulus-oocyte complexes during oocyte maturation. **Domestic Animal Endocrinology**, v.27, p. 179-195, 2004.

PARK, J. Y.; SU, Y. Q.; ARIGA, M.; LAW, E.; JIN, S. L.; CONTI, M. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. **Science**, v. 303, p.682-684, 2004.

PENG, J-Y.; X, H-Y.; HAN, P.; ZHAO, H-B.; BAI, L.; NA, X-P.; CAO, B-Y. Identification and gene expression. analyses of natriuretic peptide system in the ovary of goat (*Capra hicrus*). **Gene**, v. 524, p. 105:113, 2013.

da ROSA, P. R. A.; de CESARO, M. P.; DAU, A. M. P.; DUGGAVATHI, R.; BORDIGNON, V.; GONÇALVES, P. B. D. Reversible meiotic arrest of bovine oocytes by EGFR inhibition and follicular hemisections. **Theriogenology**, v.99, p. 53-62, 2017.

REGASSA, A.; RINGS, F.; HOELKER, M.; CINAR, U.; THOLEN, E.; LOOFT, C.; SCHENLLANDER, K.; TESFAYE, D. Transcriptomic dynamics and molecular cross-talk between bovine oocytes and its companion cumulus cells. **BMC Genomics**, v.12, p.1-20.

RICHARDS, J. S.; RUSSELL, D. L.; OCHSNER, S.; HSIEH, M.; DOYLE, K.H.; FALENDER, A. E.; LO, Y. K.; SHARMA, S. C. Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 57, p.195–220, 2002.

SALHAB, M., DHORNE-POLLET, S.; AUCLAIR, S.; GUYADER-JOLY, C.; BRISARD, D.; DALBIES-TRAN, R.; DUPONT, J.; PONSART, C.; MERMILLOD, P.; UZBEKOVA, S. In vitro maturation of oocytes alters gene expression and signaling pathways in bovine cumulus cells. **Molecular Reproduction and Development**, v.86, p. 166-182, 2013.

SALUSTRI, A.; GARLANDA, C.; HIRSCH, E.; de ACETIS, M.; MACCAGNO, A.; BOTTAZZI, B.; DONI, A.; BASTONE, A.; MANTOVANI, G.; PECCOZ, P. B.; SALVATORI, G.; MAHONEY, D. J.; DAYS, A. J.; SIRACUSA, G.; ROMANI, L.; MANTOVANI, A. PTX3 plays a key role in the organization of the cumulus oophorus extracellular matrix and in in vivo fertilization. **Development**, v. 131, p. 1577-1586, 2004.

SÁNCHEZ, F.; SMITZ, J. Molecular control of oogenesis. **Biochimic et Biophysic acta**, v. 1822, p. 1896-1912, 2012.

SATO, Y.; CHENG, Y.; KAWAMURA, K.; TAKAE, S.; HSUEH, A. J. W. **Mol Endocrinology**, v. 26(7), p. 1158-1186, 2012.

SCARCHILLI, L.; CAMAIONI, A.; BOTTAZZI, B.; NEGRI, V.; DONI, A.; DEBAN, L.; BASTONE, A.; SALVATORI, G.; MANTOVANI, A.; SIRACUSA, G.; SALUSTRI, A. PTX3 interacts with inter- α -trypsin inhibitor: implications for hyaluronan organization and cumulus oophorus expansion. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 30161-30170, 2007.

SIRARD, M-A. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v. 55, p. 1241-1254, 2000.

SIRARD, M.A.; FLORMAN, H.M.; LEIBFRIED-RUTHLEDGE, M.L.; BARNES, F.L.; SIMS, M.L.; FIRST, N.L. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, n.40, p. 1257–1263, 1989.

SMITZ, J. E. J.; THOMPSON, J. G.; GILCHRIST, R. B. The promise of in vitro maturation in assisted reproduction and fertility preservation. **Seminar in Reproductive Medicine**, v. 29, p. 24-37, 2011.

STEVENSON, J. S.; BRITT, J. H. A 100-Year review: practical female reproductive management. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 10292-10313, 2017.

SUTTON-MCDOWALL, M. L.; PURDEY, M.; BROWN, H. M.; ABELL, A. D.; MOTTERSHEAD, D. G.; CETICA, P. D.; DALVIT, G. C.; GOLDYZ, E. M.; GILCHRIST, R. B.; GARDNER, D. K.; THOMPSON, J. G. Redox and antioxidant state within cattle oocytes following in vitro maturation with bone morphogenetic protein 15 and follicle stimulation hormone. **Molecular Reproduction and Development**, v. 82, p. 281-294, 2015.

van den HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v.63, p.1717-1751, 2005.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology**. v. 3, p. RESEARCH0034, 2002.

VIGNERON, C.; PERREAU, C.; DUPONT, J.; UZBEKOVA, S.; PRIGENT, C.; MERMILLOD, P. Several signaling pathways are involved in the control of cattle oocyte maturation. **Molecular, Reproduction and Development**, v. 69, p. 466-474, 2004.

XIE, M.; MCCOSKI, S. R.; JOHNSON, S. E.; RHOADS, M. L.; EALY, A. D. Combinatorial effects of epidermal growth factor, fibroblast growth factor 2 and insulin-like growth factor 1 on trophoblast cell proliferation and embryogenesis in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, p. 419-430, 2017.

WANG, L. M.; FENG, H. L.; MA, Y. Zh.; CANG, M.; LI, H. J.; YAN, Zh.; ZHOU, P.; WEN, J. X.; BOU, S.; LIU, D. J. Expression of IGF receptors and its ligands in bovine oocytes and preimplantation embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 114, p. 99-108, 2009.

WEHREND, A.; MEINECKE, B. Kinetics of meiotic progression, M-phase promoting factor (MPF) and mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) activities during in vitro maturation of porcine and bovine oocytes: species specific differences in the length of the meiotic stages. **Animal Reproduction Science**, v.66, p. 175-184, 2001.

YANG, W-C.; YANG, L-G.; RIAZ, H.; TANG, K-Q.; CHEN, L.; LI, S-J. Effects in cattle of genetic variation within the IGF1R gene on the superovulation performance and pregnancy rates after embryo transfer. **Animal Reproduction Science**, v. 143, p. 24-29, 2013.

ZHANG, M.; SU, Y-Q.; SUGIURA, K.; WIGGLESWORTH, K.; XIA, G.; EPPIG, J. J. Estradiol promotes and maintains cumulus cell expression of natriuretic peptide receptor 2 (NPR2) and meiotic arrest in mouse oocytes *in vitro*. **Endocrinology**, v. 152(11), p. 4377-4385, 2011.

ZHANG, T.; ZHANG, C.; FAN, X.; LI, R.; ZHANG, J. Effect of C-type natriuretic peptide pretreatment on in vitro bovine oocyte maturation. **In Vitro Cellular and Developmental Biology**, v. 53, p. 199–206, 2017.

ZHONG, Y.; LIN, J.; LIU, X.; ZHANG, Y.; ZHAO, X. C-type natriuretic peptide maintains domestic cat oocytes in meiotic arrest. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, p. 1553-1559, 2016.

ANEXOS

Anexo 1. Expressão gênica relativa ($2^{-\Delta C_t}$) das células do cumulus de oócitos bovinos imaturos imediatamente após a remoção do ambiente folicular (C0), após 8h de pré-MIV com NPPC (NPPC) e após 8h de MIV (C8)

Gene	Grupo		
	C0	NPPC	C8
<i>Expansão células cumulus</i>			
<i>GREM1</i>	0.75 ± 0.03 ^a	-0.12 ± 0.19 ^b	0.13 ± 0.11 ^b
<i>HAS2</i>	8.55 ± 0.53 ^a	0.51 ± 0.22 ^{ab}	-2.61 ± 0.10 ^b
<i>PTGS2/COX2</i>	7.06 ± 0.04 ^a	5.61 ± 0.32 ^b	4.98 ± 0.22 ^b
<i>PTX3</i>	8.06 ± 1.36 ^a	2.04 ± 0.43 ^b	4.22 ± 0.32 ^b
<i>TNFAIP6</i>	9.17 ± 1.50 ^a	2.24 ± 0.67 ^b	-0.63 ± 0.29 ^b
<i>VCAN</i>	-1.78 ± 0.12 ^b	-4.44 ± 0.14 ^a	-4.01 ± 0.34 ^a
<i>Maturação oocitária</i>			
<i>ADCY3</i>	0.60 ± 0.02 ^b	0.64 ± 0.01 ^{ab}	0.72 ± 0.04 ^a
<i>ADCY6</i>	2.22 ± 0.08	2.30 ± 0.18	2.77 ± 0.34
<i>ADCY9</i>	3.32 ± 0.20	3.16 ± 0.25	3.44 ± 0.21
<i>AREG</i>	1.16 ± 0.00 ^a	0.72 ± 0.09 ^a	0.20 ± 0.13 ^b
<i>BDNF</i>	1.02 ± 0.04 ^a	0.58 ± 0.03 ^b	0.67 ± 0.05 ^b
<i>BMP15</i>	7.06 ± 0.94 ^b	8.75 ± 0.45 ^{ab}	10.05 ± 0.62 ^a
<i>EGFR</i>	1.33 ± 0.11 ^a	-0.07 ± 0.18 ^b	-0.35 ± 0.26 ^b
<i>FSHR</i>	1.32 ± 0.04 ^c	2.55 ± 0.27 ^a	5.48 ± 0.24 ^b
<i>GUCY1B3</i>	5.61 ± 0.12	5.74 ± 0.18	5.92 ± 0.28
<i>IMPDH1</i>	3.72 ± 0.17 ^b	4.15 ± 0.18 ^{ab}	6.08 ± 0.08 ^a
<i>IMPDH2</i>	1.28 ± 0.09	1.56 ± 0.21	1.18 ± 0.32
<i>MAPK1</i>	2.46 ± 0.16	1.67 ± 0.24	1.73 ± 0.22
<i>NOS2</i>	0.35 ± 0.06 ^c	3.51 ± 0.50 ^b	6.26 ± 0.35 ^a

<i>NOS3</i>	6.98 ± 0.10 ^a	5.88 ± 0.26 ^b	5.43 ± 0.15 ^b
<i>NPPC</i>	10.79 ± 1.10	11.91 ± 0.68	10.36 ± 0.50
<i>NPR1</i>	8.69 ± 0.26	9+78 ± 1.16	9.59 ± 0.57
<i>NPR2</i>	2.80 ± 0.16	2+89 ± 0.13	3.24 ± 0.20
<i>NPR3</i>	0.50 ± 0.02 ^c	0.63 ± 0.03 ^b	0.87 ± 0.02 ^a
<i>OOSP1</i>	8.98 ± 1.19	10.16 ± 0.87	10.41 ± 0.56
<i>PDE5A</i>	1.01 ± 0.03 ^a	-0.11 ± 0.10 ^b	-0.16 ± 0.17 ^b
<i>PRKCD</i>	6.14 ± 0.16 ^a	4.19 ± 0.18 ^b	3.88 ± 0.35 ^b
<i>RGS2</i>	7.82 ± 1.09 ^a	7.87 ± 0.68 ^a	1.85 ± 0.48 ^b
<i>STAT3</i>	3.35 ± 0.19 ^a	1+94 ± 0.22 ^b	1.47 ± 0.21 ^b

Desenvolvimento embrionário

<i>CLIC3</i>	3.10 ± 0.40 ^b	5.78 ± 0.43 ^a	7.53 ± 0.60 ^a
<i>IGF1R</i>	0.08 ± 0.07 ^a	-1.74 ± 0.21 ^b	-1.74 ± 0.22 ^b
<i>IGFBP2</i>	2.43 ± 0.11	2.95 ± 0.16	2.57 ± 0.39
<i>KRT8</i>	2.98 ± 0.14 ^a	0.78 ± 0.37 ^b	2.59 ± 0.58 ^a
<i>LUM</i>	5.73 ± 0.11 ^a	3.57 ± 0.14 ^b	1.85 ± 0.26 ^c
<i>NDUFA1</i>	2.50 ± 0.67	2.34 ± 0.64	2.50 ± 0.56
<i>POU5F1</i>	2.71 ± 0.21	3.16 ± 0.21	2.87 ± 0.35
<i>PRDX1</i>	0.22 ± 0.16	0.33 ± 0.16	0.34 ± 0.24
<i>PRDX3</i>	2.90 ± 0.15 ^b	3.84 ± 0.11 ^a	4.27 ± 0.15 ^a
<i>S100A10</i>	1.18 ± 0.07 ^b	1.64 ± 0.19 ^{ab}	2.11 ± 0.17+ ^a
<i>S100A14</i>	2.36 ± 0.09 ^b	3.03 ± 0.19 ^a	2.14 ± 0.20 ^b

Os dados estão apresentados como média ± erro padrão da média relativo aos genes housekeepings, pelo valor de $2^{-\Delta Ct}$. ^{abc}Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$) nos valores de ΔCt ; a ausência de letras indica ausência de diferença significativa ($P > 0,05$). Kruskal-Wallis, Dunn's (distribuição não paramétrica) ou ANOVA, Tukey's.

Anexo 2. Expressão gênica relativa em células do cumulus de oócitos bovinos maduros após 22h de MIV (C22), após 8h de pré-MIV com NPPC seguida de 22h de MIV (NPPC) e após 30h de MIV (C30)

Gene	Grupo		
	C22	NPPC	C30
<i>Expansão do cumulus</i>			
<i>GREM1</i>	5.96 ± 0.65	6.60 ± 0.56	8.06 ± 0.46
<i>HAS2</i>	-0.52 ± 0.30	-0.56 ± 0.24	0.37 ± 0.16
<i>PTGS2/COX2</i>	4.15 ± 0.27 ^a	2.56 ± 0.24 ^b	2.98 ± 0.26 ^b
<i>PTX3</i>	1.77 ± 0.29 ^a	-0.62 ± 0.23 ^c	0.46 ± 0.24 ^b
<i>TNFAIP6</i>	-2.49 ± 0.31	-3,20 ± 0.54	-2.87 ± 0.32
<i>VCAN</i>	-3.63 ± 0.37	-3.71 ± 0.25	-3,27 ± 0.15
<i>Maturação oocitária</i>			
<i>ADCY3</i>	5.54 ± 0.23	5.30 ± 0.06	5.44 ± 0.19
<i>ADCY6</i>	1.67 ± 0.32 ^a	1.11 ± 0.18 ^{ab}	0.75 ± 0.13 ^b
<i>ADCY9</i>	4.10 ± 0.29	3.72 ± 0.21	3.67 ± 0.20
<i>AREG</i>	9.10 ± 0.33 ^{ab}	8.18 ± 0.43 ^b	10.53 ± 0.32 ^a
<i>BDNF</i>	6.87 ± 0.34 ^{ab}	6.31 ± 0.80	8.47 ± 0.21 ^a
<i>BMP15</i>	10.88 ± 0.39 ^a	5.86 ± 1.18 ^b	9.93 ± 0.21 ^{ab}
<i>EGFR</i>	2.43 ± 0.19	2.12 ± 0.16	2.57 ± 0.20
<i>FSHR</i>	8.32 ± 0.32	7.96 ± 0.48	7.55 ± 0.37
<i>GUCY1B3</i>	6.52 ± 0.37	6.82 ± 0.11	7.02 ± 0.11
<i>IMPDH1</i>	5.17 ± 0.24	5.36 ± 0.20	5.74 ± 0.10
<i>IMPDH2</i>	2.60 ± 0.17	2.60 ± 0.17	2.84 ± 0.10
<i>MAPK1</i>	0.96 ± 0.26	1.06 ± 0.21	1.10 ± 0.10
<i>NOS2</i>	5.54 ± 0.21	5.84 ± 0.27	5.58 ± 0.25
<i>NOS3</i>	5.61 ± 0.36 ^a	4.76 ± 0.42 ^{ab}	4.10 ± 0.30 ^b
<i>NPPC</i>	9.28 ± 0.32	9.92 ± 0.34	10.01 ± 0.56
<i>NPR1</i>	8.41 ± 0.57	8.55 ± 0.36	7.27 ± 0.19
<i>NPR2</i>	4.33 ± 0.38	3.85 ± 0.31	4.45 ± 0.10
<i>NPR3</i>	8.23 ± 0.20	8.10 ± 0.25	8.26 ± 0.26
<i>OOSP1</i>	0.87 ± 0.25	7.42 ± 0.72	8.04 ± 0.19
<i>PDE5A</i>	1.91 ± 0.35 ^b	2.51 ± 0.11 ^{ab}	2.86 ± 0.17
<i>PRKCD</i>	4.77 ± 0.31	4.52 ± 0.24	4.80 ± 0.16
<i>RGS2</i>	0.44 ± 0.41	-0.48 ± 0.14	-0.59 ± 0.34
<i>STAT3</i>	2.17 ± 0.25	1.78 ± 0.19	2.13 ± 0.24
<i>Desenvolvimento embrionário</i>			
<i>CLIC3</i>	4.00 ± 0.34	3.12 ± 0.19	3.45 ± 0.18
<i>IGF1R</i>	-0.12 ± 0.32	-0,40 ± 0.22	-0.02 ± 0.14
<i>IGFBP2</i>	5.05 ± 0.46	4.49 ± 0.45	5.67 ± 0.62
<i>KRT8</i>	0.21 ± 0.04	0.43 ± 0.15	0.56 ± 0.12

<i>LUM</i>	2.34 ± 0.29 ^a	0.57 ± 0.45 ^b	2.35 ± 0.32 ^a
<i>NDUFA1</i>	2.08 ± 0.40	1.99 ± 0.11	2.70 ± 0.54
<i>POU5F1</i>	4.43 ± 0.19	4.20 ± 0.23	4.79 ± 0.18
<i>PRDX1</i>	0.21 ± 0.35	0.18 ± 0.11	-0.14 ± 0.19
<i>PRDX3</i>	2.93 ± 0.58	3.02 ± 0.26	2.91 ± 0.26
<i>S100A10</i>	1.11 ± 0.39	0.54 ± 0.25	0.03 ± 0.18
<i>S100A14</i>	2.93 ± 0.39	3.30 ± 0.23	3.25 ± 0.33

Os dados estão apresentados como média ± erro padrão da média relativo aos genes housekeepings, pelo valor de $2^{-\Delta Ct}$. ^{abc}Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$) nos valores de ΔCt ; a ausência de letras indica ausência de diferença significativa ($P > 0,05$). Kruskal-Wallis, Dunn's (distribuição não paramétrica) ou ANOVA, Tukey's.