RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 20/12/2023.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA E REPRODUÇÃO ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA ANIMAL

TRANSCRIPTOMA DAS CÉLULAS DA GRANULOSA DURANTE O DESENVOLVIMENTO FOLICULAR EM BOVINOS

HENRY DAVID MOGOLLÓN GARCÍA

Botucatu- SP
Dezembro 2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA E REPRODUÇÃO ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA ANIMAL

TRANSCRIPTOMA DAS CÉLULAS DA GRANULOSA DURANTE O DESENVOLVIMENTO FOLICULAR EM BOVINOS

HENRY DAVID MOGOLLÓN GARCÍA

Tese de doutorado apresentada ao programa de pós-graduação em Biotecnologia Animal para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira
Coorientador: Prof. Dr. John Kastelic

Botucatu- SP
Dezembro 2021

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

Mogollón García, Henry David.
Transcriptoma das células da granulosa durante o desenvolvimento folicular em bovinos / Henry David García Mogollón. - Botucatu, 2021

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Orientador: João Carlos Pinheiro Ferreira
Coorientador: John Kastelic
Capes: 50504002

1. Bovinos. 2. Folículo ovariano. 3. Expressão gênica. 4. Transcriptoma. 5. Ovários.

Palavras-chave: Expressão gênica; Foliculogênese; Ovário; Vacas.

Henry David Mogollón García

Data da defesa: 20/12/2021

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira
Presidente e orientador
Departamento de Cirurgia e Reprodução Animal
FMVZ- UNESP-Botucatu

Prof. Dr. Rodrigo de Andrade Ferrazza
Membro titular
Departamento de Zootecnia
UEL-Londrina

Prof. Dr. Anthony Castilho
Membro titular
Departamento de Zootecnia
UNOESTE-Presidente Prudente

Prof. Dr. Vitor R. G. Mercadante
Membro titular
Animal and Poultry Sciences
Large Animal Clinical Sciences Virginia Tech

Prof. Dr. Pedro Marcus P. Vidigal
Membro titular
Núcleo de Análise de Biomoléculas (NuBioMol)
UFV-Viçosa

DEDICATÓRIA

Todos os esforços aqui realizados, são dedicados aos animais, família, amigos e, em especial, a Ana Sofía, minha filha, que mesmo estando longe, sempre esteve perto.

AGRADECIMENTOS

Eternamente agradecido aos animais que emprestaram seu corpo e alma e permitiram o desenvolvimento do curso.

Eternamente agradecido aos meus pais Henry de Jesús Mogollón Muñoz e María Floresmila García Montañez, às minhas irmãs Heidy Johana Mogollón García, Sandra Gisela Mogollón García, Yinna Tatiana Mogollón García e Jésica Paola Mogollón García, à namorada e parceira da vida Gabriella Costa Ribeiro, à Rosalba Ayala e, em especial, à minha filha, Ana Sofía Mogollón Ayala, combustível que alimenta as minhas células.

Eternamente agradecido aos meus amigos e amigas Juliana Moreno, Diego Sanz, Brayan Sayed Lopéz, Natália Celeita Rodríguez, Antônio Guilherme Roncada Pupulim. Yeimer Antonio Santiago e Felipe Bordin, vocês tem feito com que a caminhada pela vida seja mais agradável.

Eternamente agradecido aos colegas da equipe, Jaqueline Carvalho, Eduardo Rossi, Flávia Florencio de Athayde e Guilherme Rizzoto.

Eternamente agradecido ao professor Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira quem fez de mim uma melhor pessoa, me apoiando nos momentos bons e ruins.

Eternamente agradecido ao professor Dr. John Kastelic, mestre com um grande coração, sempre disposto a espalhar conhecimentos.

Eternamente agradecido aos funcionários da FMVZ, estagiários, residentes, administrativos e professores que contribuíram com o desenvolvimento da pesquisa.

Por fim, agradecido com a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio do projeto, com o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e o Programa Estudante Convênio (PEC-PG) pela bolsa de estudos.

Agradecemos ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil (código de financiamento 001).

SUMÁRIO

Capítulo 1.....8

1. Introdução e justificativa.....9
2. Revisão de literatura.....12
   2.1. Desenvolvimento folicular em bovinos.....12
   2.2. RNA-Seq e reprodução.....12
   2.3. Perfil transcriptômico durante o desenvolvimento folicular em outras espécies.....13
   2.4. Perfil transcriptômico durante o desenvolvimento folicular em bovinos.....14
   2.5. Genes de interesse durante o desvio folicular.....16
3. Referências.....18

Capítulo 2.....24

Artigo "Transcriptomic analysis of bovine granulosa cells during follicular development" 25

Mogollón García, H.D. **Trasncriptôma das células da granulosa durante o desenvolvimento folicular em bovinos.** Botucatu 2021. 39p. Defesa de Tese Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Os mecanismos pelos quais ocorrem o desenvolvimento folicular e o estabelecimento da dominância ainda são apenas parcialmente compreendidos, constituindo-se como peças-chave para o completo entendimento não apenas da fisiologia reprodutiva, como também das patologias. O objetivo do estudo foi descrever, holisticamente, a expressão diferencial de genes nos estágios foliculares de pré-desvio, desvio, pós-desvio e pré-ovulatorio. Um total de 1805 genes foram diferencialmente expressos (DEGs). Desses DEGs, cento e cinco apresentaram intersecção nos diferentes estágios foliculares. A análise em conjunto da ontologia gênica (GO), enriquecimento em conjunto de genes (GSEA) e a interação de proteína-proteína (IPP), mostrou que os DEGs se associaram a respostas esteroidogênicas, proliferação celular e processos vasculares no folículo durante o estágio de desvio. No folículo pós-desvio e pré-ovulatorio, esses processos mantiveram estreita relação com a resposta inflamatória; fenômeno que foi liderado, principalmente, por DEGs da família quinase. Moléculas como Fig-α, kit-ligante, FGFs e seus receptores, GDF-9 e BMP-15, IGFs, ativina, EGF, KGF, peptídeo intestinal vasoativo e angiotensina-II foram identificadas em vários estudos prévios e são relacionadas a numerosas atividades no contexto da dinâmica ovariana como a esteroidogênese, o crescimento e apoptose celular e a angiogênese. O nosso estudo complementou esses achados e mostrou a importância de DEGs que ainda não tinham sido descritos. Dentre esses DEGs, destacam-se a ADM, NPR1, NPR3, CSF1R, RAGE. Em conclusão, os nossos resultados evidenciaram que a expressão do gene ADM, NPR1 e 3 é diferente entre o folículo desvio um e dois, regulando a vascularização e processos de desenvolvimento. Adicionalmente, a resposta inflamatória entre o folículo pós-desvio e o folículo pré-ovulatorio foi caracterizada pela expressão de genes agrupados no termo ontológico de RAGE e família das quinases, respectivamente.

Palavras chave: Vacas; foliculogênese; expressão gênica; ovário

Mogollón García, H.D. **Transcriptomic analysis of bovine granulosa cells during follicular development.** Botucatu 2021. 39p. Botucatu 2021. Defesa de Tese Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The mechanisms by which follicular development and the establishment of dominance occur are still partially understood, constituting key elements for a complete understanding not only of reproductive physiology but also of pathologies. The aim of the study was to describe, holistically, the differential expression of genes in the pre-deviation, deviation, post-deviation, and pre-ovulatory follicular stages. A total of 1805 genes were differentially expressed (DEGs). One hundred and five DEGs presented intersections in the different follicular stages. Together, gene ontology (GO), pooled gene enrichment (GSEA) and protein-protein interaction (IPP) showed that DEGs were associated with steroidogenic responses, cell proliferation, and vascular processes in the follicle during the deviation. In the post-deviation and pre-ovulatory follicles, these processes were closely related to the inflammatory response; a phenomenon that was led mainly by DEGs of the kinase family. Molecules such as Fig-α, kit ligand, FGFs, and their receptors, GDF-9 and BMP-15, IGFs, activin, EGF, KGF, vasoactive intestinal peptide, and angiotensin-II were identified in several previous studies and are related to numerous activities in the context of ovarian dynamics, notably steroidogenesis, follicle growth and apoptosis, and angiogenesis. Our study complemented these findings and showed the importance of DEGs that had not yet been described. Among these DEGs, were relevant ADM, NPR1, NPR3 and CSF1R. In conclusion, our results showed that the expression of the gene ADM, NPR1, and 3 is different between follicle deviation one and two, regulating vascularization and developmental processes. Additionally, the inflammatory response between the post-deviation follicle and the pre-ovulatory follicle was characterized by the expression of genes grouped in the ontological term of RAGE and kinase family, respectively.

Palavras chave: cows; folliculogenesis; gene expression; ovary

CAPÍTULO 1

1 Introdução e justificativa

De forma muito particular, o consumo de leite e derivados fornece inúmeros fatores protetores à saúde humana, servindo, por exemplo, como fonte abundante de cálcio, de micro-organismos benéficos à microbiota do trato gastrointestinal, ou mesmo servindo de base para produtos não-alimentícios, tais como hidratantes corporais (PEREIRA, 2014). Vale lembrar que, mesmo entre as pessoas que se declaram vegetarianas, há subgrupos adeptos ao consumo de leite e/ou produtos lácteos, (KESSLER et al., 2016), como os ovolactovegetarianos e os estritamente lactovegetarianos, o que evidencia a elevada demanda deste produto.

Por essa perspectiva, fica claro que ainda há muito espaço para o desenvolvimento do segmento leiteiro, e é nesse nicho que a ciência deve se envolver. Queixas frequentes como altas taxas de vacas subprodutivas e falta de persistência na lactação estão intimamente atreladas à baixa eficiência reprodutiva. Dessa maneira, as biotecnologias da reprodução são capazes de introduzir inúmeros ganhos, tais como: melhoramento genético, padronização do rebanho, melhor manejo zootécnico, e otimização da aplicação de gametas masculinos e femininos (CUNNINGHAM, 1999).

As biotecnologias reprodutivas, indispensáveis aliadas dos diversos setores da pecuária mundial, estão em constante processo de atualização e aprimoramento, no intuito de acompanhar as novas exigências da sociedade global contemporânea e o desenvolvimento de recentes técnicas de pesquisa, fortemente impulsionadas pelos avanços da ciência computacional e da biologia molecular. Portanto, existe ainda muito a se descobrir: moléculas a serem reveladas, mecanismos a serem esclarecidos e todas as suas implicações.

Dentre os eixos da pesquisa reprodutiva moderna, um dos que mais despertam interesse científico é o que aborda a dinâmica ovariana. Existe conhecimento já muito bem sedimentado acerca do desenvolvimento folicular sob a perspectiva endócrina: os efeitos do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (PRICE; WEBB, 1988) se encontram amplamente discutidos na literatura, focando-se em interações hormonais, mecanismos de retroalimentação, e suas consequências para os ciclos estral e menstrual das mais diversas espécies.

Em relação específica aos bovinos, que são poliéstricos anuais, Fortune et al., (1988) evidenciaram a presença de ondas promotoras do crescimento folicular em resposta a estímulos hormonais do eixo supracitado, de tal modo que foi demonstrado (ADAMS et al., 1992) que é fundamental o aumento sérico do hormônio hipofisário folículo-estimulante (FSH) para que ocorra a emergência de uma onda de crescimento folicular, quando os próprios folículos, através da síntese de estrógenos (principalmente, 17ß-estradiol) pelas células de sua camada granulosa, inibem a liberação hipofisária de FSH, de tal modo que apenas um folículo (na maioria dos

casos) progride em desenvolvimento, sendo considerado dominante, enquanto os demais se tornam atrésicos. Tal evento foi descrito como divergência folicular (também conhecida como desvio) (GINTHER et al., 1996, 1999).

Apesar do conhecimento acumulado relacionado aos fatores endócrinos que controlam o desenvolvimento folicular ovariano, os mecanismos moleculares que regulam a seleção de um folículo e o estabelecimento da dominância, a cada onda folicular, permanece, em grande parte, desconhecido. Como consequência, as pesquisas vem se voltando, cada vez mais, às técnicas de biologia molecular e à bioinformática para investigar a organização e o funcionamento genômico detalhado das células foliculares (ZIELAK-STECIWKO; EVANS, 2016).

O destino dos folículos se subordina ao controle de fatores endócrinos, mas seus efeitos são também influenciados por outros fatores intraovarianos, que agem no interior da célula ou por mecanismos parácrinos e/ou autócrinos. Neste sentido, o início e a regulação do estádio de desenvolvimento pré-antral são predominantemente conduzidos por fatores de crescimento locais (AERTS; BOLS, 2010; MAGALHÃES et al., 2012).

Diversas moléculas estão envolvidas na determinação da dominância folicular, dentre as quais se encontram os receptores de hormônio luteinizante (LH), propostos por Beg et al., (2001), além de numerosos fatores autócrinos e parácrinos do próprio ovário (MIHM et al., 2008). Adicionalmente, angiotensina II (FERREIRA et al., 2011), fatores de crescimento fibroblásticos (FGFs) (BURATINI et al., 2007), fator de crescimento semelhante a insulina (IGF1) e proteína de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina (IGFBP) vêm sendo apontados como alguns dos principais envolvidos na expressão de genes encarregados de variadas atividades regulatórias, como proliferação, diferenciação, e atresia folicular (PORTELA et al., 2010), que são essenciais à esteroidogênese e à proteção contra apoptose.

Muitos estudos vêm sendo conduzidos, em inúmeras espécies, em busca de marcadores gênicos, protéicos, e metabolômicos que permitam uma compreensão mais integrada da fisiologia e da patogênese das afecções que acometem o trato reprodutivo feminino (LABRECQUE; SIRARD, 2014; UPADHYAY et al., 2013). Essa abordagem vem sendo possível graças aos novos conceitos, ao refinamento das técnicas de pesquisa e de análises de dados (MAZZONI et al., 2017). Talvez, a ciência que abrange os conceitos moleculares, estatísticos e computacionais de maior importância é a transcriptômica. Estudos desenvolvidos na última década que utilizaram transcriptômica, permitiram revelar avanços importantes na área de reprodução animal, especificamente, no desenvolvimento folicular. Esses estudos foram realizados em Iaque (LAN et al., 2014), ovelhas (CHEN et al., 2015; HERNÁNDEZ-MONTIEL et al., 2019; PUTTABYATAPPA et al., 2020), cabras (LIU et al., 2020), búfalos (CAPRA et al., 2020), porcos (YANG et al., 2020), ratos (BIAN et al., 2020) e bovinos (CHRISTENSON et al.,

2013). Os resultados desses estudos contribuíram na compreensão dos principais mecanismos relacionados com a expressão gênica conexa com o desenvolvimento folicular e a atividade ovariana.

No entanto, em bovinos, o número de estudos moleculares, que incluem a análise dos transcritos nas diversas fases do desenvolvimento folicular ainda é limitado. LI et al., (2016) estudaram o transcriptoma das células da granulosa de bovinos nas fases de pré-desvio e no início do desvio, estudo que excluiu as fases restantes de aquisição da capacidade ovulatória (12 mm) e pré-ovulatória. Um outro estudo realizado por Romereim et al., (2017) envolveu uma abordagem transcriptômica das células luteais, da granulosa e da teca, sendo que as células da granulosa e da teca foram colhidas do folículo com capacidade ovulatória e, do mesmo modo, excluiu as fases inicias do desenvolvimento folicular. Apesar desses estudos utilizarem a transcriptômica e serem realizados em bovinos, não contemplam uma visão holística dos principais fenômenos moleculares associados às diferentes etapas do desenvolvimento folicular.

Desse modo, o objetivo do presente estudo foi descrever a expressão gênica das células da granulosa de vacas Holandesas em quatro fases distintas de desenvolvimento folicular (pré-desvio, desvio, após a aquisição da capacidade ovulatória e 24 horas após a indução da ovulação com GnRH), empregando-se a técnica de RNA-seq.

2 Revisão de literatura

2.1 Desenvolvimento folicular em bovinos

Em vacas, são observados múltiplos folículos nos estágios iniciais de desenvolvimento até o momento do desvio, quando, um folículo será selecionado e poderá, se as condições fisiológicas permitirem, ovular; durante o tempo em que os folículos restantes sofrerão atresia (MIHM et al., 2002). O hormônio liberador das gonadotropinas estimula a secreção do hormônio folículo estimulante (FSH) que, nas células da granulosa, de folículos definidos como pré antrais, se liga ao receptor de FSH (FSHr) estimulando o recrutamento de folículos pequenos com tamanhos em média de 3-4 mm (ADAMS et al., 1992).

O ciclo estral em vacas pode apresentar duas ou três ondas de crescimento folicular, mostrando, respectivamente, uma duração média de $\sim$21 e 22 dias (GINTHER et al., 1989). A morfologia do folículo sofre alterações estruturais, há proliferação das células da granulosa, fenômeno que é acompanhado com o alinhamento das células da teca. Desse modo, essas alterações confluem na conversão de folículos primários em secundários e terciários (AUSTIN et al., 2001). O processo de esteroidogênese é estimulado, as células da teca produzem andrógenos, que são transformados em estrógenos pelas células da granulosa (BADINGA et al., 1992). A função do estrógeno produzido é realizar uma retroalimentação negativa do FSH na glândula pituitária. Dessa forma, o folículo mais desenvolvido, continuará seu crescimento já superando o momento denominado de desvio (GINTHER, 2016).

Durante o desvio, o folículo mais desenvolvido (dominante) produz inibina, hormônio que diminui o FSH nos folículos em desenvolvimento denominados como subordinados (GOOD et al., 1995). Os folículos subordinados entrarão em atresia, processo que também pode ser observado em folículos dominantes sob exposição a elevadas concentrações de P4 (AUSTIN et al., 2001). Em contraste, quando o folículo dominante se desenvolve com concentrações de P4 diminuídas, produto da luteólise, há uma produção do hormônio luteinizante (LH) que estimulara a ovulação (GINTHER, 2016).

2.2 RNA-Seq e reprodução

A transcriptômica faz parte das conhecidas "ômicas"e é definida como "o conjunto de moléculas de mRNA geradas por uma célula ou população de células"(MCGETTIGAN, 2013). A transcriptômica foi desenvolvida com o objetivo de diminuir as restrições, até então encontradas, na técnica de hibridização. Com a chegada da transcriptômica, tem sido possível mapear e quantificar os mRNAs, mediante o método conhecido como sequenciamento do RNA (RNA-seq sigla em inglês). O resultado final do RNA-seq permite obter a expressão dos genes na linhagem celular de interesse (WANG;

GERSTEIN; SNYDER, 2009).

O primeiro artigo que incluiu o RNA-seq foi publicado no ano 2006 (BAINBRIDGE et al., 2006) e foi desenvolvido com a tecnologia Roche 454, entretanto, foi no final da década passada que as análises de RNA-seq evoluíram com a chegada da tecnologia de leitura curta concebida pela firma conhecida hoje como Illumina, achado que possibilitou a quantificação dos transcritos do genoma do rato, acompanhado pela descrição de genes novos e genes sem anotações existentes na época. Do mesmo modo, foram identificados promotores adicionais bem como regiões 3' e exons novos (MORTAZAVI et al., 2008).

A primeira análise de RNA-seq na área de reprodução em bovinos, estudou as mudanças no perfil transcriptômico de embriões cultivados *in vitro*, 1,6 milhões de bases não anotadas em 1.785 novas unidades transcritas foram reveladas (HUANG; KHATIB, 2010). No mesmo ano e, considerando a linha de produção de embriões, um outro estudo comparou o transcriptôma de embriões da espécie suína recuperados no dia 2 e cultivados *in vitro* com embriões colhidos *in vivo* no dia 6 após a inseminação artificial (IA). O gene SLC7A1 apresentou elevada expressão no grupo cultivado *in vitro* (BAUER et al., 2010).

Sob outra perspectiva, o RNA-seq em espermatozoides bovinos criopreservados, revelou um aumento na expressão dos genes PRM1 e HMGB4, esse estudo constituiu o primeiro perfil transcriptômico da espécie (CARD et al., 2013). Adicionalmente, a implementação do RNA-seq permitiu a caracterização da contribuição de touros previamente classificados com alta e baixa fertilidade com a expressão de alguns genes nos embriões originários de ambos tipos de sêmen (KROPP et al., 2017). No garanhão, o primeiro relato do perfil transcriptômico do espermatozoide, associou a presença dos genes com as anotações em processos moleculares de transporte de íons e sinais de tradução ativadas por quimiotaxia. Além disso, os componentes celulares de maior importância foram a membrana e as vesículas. O estudo, também sugeriu a incorporação de novos exons, variantes de splice e outras localizações para os genes PKM2, CRIPS3, TNP2 e PRM1 (DAS et al., 2013).

2.3 Perfil transcriptômico durante o desenvolvimento folicular em outras especies

O ovário tem como função principal a produção de oócitos que serão fertilizados. A produção de oócitos é precedida pelo desenvolvimento folicular, durante o qual os folículos sofrem alterações morfológicas, hormonais, moleculares entre outras (GINTHER, 2016). Ao final do desenvolvimento, o folículo é constituído por uma lâmina basal contornada por células da granulosa e, no centro, é apresentada uma cavidade de líquido denominada antro (HATZIRODOS et al., 2014a). O oócito tem comunicação parácrina com as células da granulosa, relação que ao longo do desenvolvimento folicular, altera a expressão gênica (ZHANG et al., 2010). Em humanos,

empregando-se *microarray*, foram gerados os transcriptomas das células da granulosa e células do cumulus derivadas de folículos pré-ovulatórios; cento e cinquenta e seis genes diferencialmente expressos mudaram a sua expressão > 8 (fold change) com ontologia genética associada a funções celulares de resposta inflamatória, matriz extracelular e comunicação inter-celular. Do mesmo modo, foram identificados 1406 genes com expressão entre 2-8 (fold change), com proliferação e metabolismo dos lipídeos como funções celulares destacadas (GRØNDAHL et al., 2012).

O transcriptôma das células da granulosa e da teca foi estudado em éguas durante o desenvolvimento do folículo pré-ovulatório utilizando-se *microarray*. Nesse estudo, o folículo foi classificado como: dominante precoce (diâmetro ≥ 22 mm), dominante tardio (diâmetro ≥ 33 mm) e pré-ovulatório (34 hr após a administração de eCG). Os genes diferencialmente expressos, que aumentaram a expressão no folículo dominante tardio, foram relacionados com a resposta imune e inflamatória (PTX3, NTS, SPP1, S100A12, OLR1), matriz extracelular e remodelação do tecido (HAS2, PCOLCE2, PLAT, TNFRSF12A, EFEMP1). Os genes que apresentaram uma expressão decrescente nessa mesma fase, foram HSD17B1, CPS1; sendo relacionados com a esteroidogênese e remoção do excesso de amônio, respectivamente. Adicionalmente, os genes ASPM, TPX2, CDC20, BUB1, BUB1B e TKK que desempenham um papel regulador na divisão celular, apresentaram uma diminuição na expressão. Ao mesmo tempo, no folículo pré-ovulatório, foi observado o aumento na expressão dos genes SCGB2A1 e SCGB2A2, ortólogos das secretoglobulinas em humanos; PLAU, FGG, EDN2, PTGS2 e NTS, conexos com o fenômeno da ovulação, BDNF, NELL2, DKK1 e NIM1-like associados com funções de diferenciação e sobrevivência da célula, AGPAT4 e APOE relacionados com o metabolismo dos lipídeos e, o gene DEFB1, associado à imunidade. Os genes SPC25, TOP2A, UBE2C, HFM1, ASPM, NDC80, KIF11, CDC20 associados a processos de divisão celular e, os genes HSD17B1 e THSD1, exibiram uma expressão decrescente (DONADEU et al., 2014).

2.4 Perfil transcriptômico durante o desenvolvimento folicular em bovinos

Em bovinos, a comparação das células da teca com as células da granulosa, bem como, entre as células da granulosa antrais e as células da granulosa associadas à membrana basal, antes e 21 hrs após indução do pico de LH, seguido da administração exógena de GnRH, revelou a expressão de 11000 genes, dos quais somente 2% células da teca e 25% células da granulosa mudaram a sua expressão (CHRISTENSON et al., 2013). O pico de LH regulou a expressão dos mesmos genes nas células da teca e da granulosa. Além disso, as células da teca mostraram 57 genes únicos e, os genes CYP17A1 e NR5A1 pertenceram ao grupo de genes com expressão diminuída. Descoberta importante foi também, o aumento na expressão dos genes PTX3, RND3, PPP4R4 nas células da teca e da granulosa. Adicionalmente, a comparação células

da granulosa antrais e as células da granulosa associadas à membrana, demonstrou similaridade na expressão gênica (CHRISTENSON et al., 2013).

Os principais processos moleculares que acontecem durante o desenvolvimento folicular e a maturação das células da granulosa foram estudados em bovinos. A comparação foi realizada entre folículos < 5 mm e >10 mm. Os folículos maiores foram afetados nos processos de sinalização, imunologia e rearranjo celular. As redes de interação destacadas foram Notch, SLIT/ROBO, PI3K, ITGB5 e ERKs. Igualmente, os genes com atividade proeminente nos folículos maiores foram STAT e XBP1. Em contrapartida, nos folículos menores, os genes KIT, IHH e MEST, associados a processos de desenvolvimento, foram os mais destacados; o gene MGEA5, relacionado com atividades enzimáticas, foi identificado como *upstream* (HATZIRODOS et al., 2014a).

A expressão dos genes das células da teca interna, ao comparar folículos de tamanho 9-12 mm vs 3-5 mm, revelou a ativação de processos de diferenciação do mioblasto, ubiquitinação das proteínas, oxido nítrico e fator de transformação do crescimento β. Adicionalmente, no folículo maior, a diminuição e o aumento respectivo da expressão dos genes WNT2B e FRZB induziu à supressão da via de sinalização Wnt, fenômeno possivelmente explicado pela alteração da função e estrutura celular (HATZIRODOS et al., 2014b).

Nesse contexto, um outro estudo em bovinos, comparou o transcriptôma das células da granulosa do folículo pré-desvio (4 mm) vs o início do desvio (> 8.5 mm) (LI et al., 2016). Os genes com aumento ou diminuição na expressão gênica foram 42 e 43, respectivamente. Os genes com maior mudança na expressão gênica, dentro de cada grupo (*upregulated* ou *downregulated*) respectivamente, foram GAPDH, gene associado à união de NAD e, o gene ACTR1A, relacionado com a motilidade de vesículas microtubulares. No início do desvio, os genes CYP11A1 e CYP19A1 mostraram aumento na sua expressão, esses genes estão relacionados com a síntese de hormônios esteroides.

O perfil transcriptômico das células da granulosa nos folículos atrésicos, também foi estudado (HATZIRODOS et al., 2014c). As comparações da expressão diferencial dos genes mostraram que, no folículo atrésico, as funções de morte celular, desenvolvimento do órgão, desenvolvimento do tecido e desenvolvimento embrionário foram afetadas. Ainda, os processos relacionados com o gene TP53 foram predispostos a serem ativados. As vias destacadas foram inflamatórias/fibróticas, fator de transformação de crescimento β e fator de necrose tumoral-α (HATZIRODOS et al., 2014c). Nas células da teca, o perfil transcriptômico da maioria dos genes diferencialmente expressos no folículo atrésico, foi associado com citocinas, hormônios, receptores, ciclo celular e replicação do DNA (HATZIRODOS et al., 2014d). Os genes TP53, IKBKB e TGFB1 apresentaram aumento na expressão de transcritos. Adicionalmente, como genes *upstream* foram identificados Retinoblastoma 1, Fator 1 de transcrição E2 e

fator de crescimento do hepatócito (HATZIRODOS et al., 2014d).

Em estudo recente de nosso laboratório (FERRAZZA et al., 2017) realizamos a análise proteômica do fluido folicular de bovinos em quatro momentos críticos do desenvolvimento folicular [fases pré-desvio (7 mm), desvio (F1= 8,5 mm), de aquisição da capacidade ovulatória (12 mm) e pré-ovulatória (24 hora após GnRH)], estabelecendo uma visão integrada das funções proteicas e suas inter-relações durante o desenvolvimento folicular. Foram identificadas 143 proteínas, das quais 22 tiveram expressão diferenciada ao longo do desenvolvimento, tendo os momentos pré-desvio, pós-desvio e pré-ovulatório apresentado perfis proteicos distintos. Quando estudados esses perfis, importantes vias metabólicas foram identificadas, como as de sinalização da resposta de fase aguda, do sistema de coagulação, do sistema complemento, de ativação do receptor hepático/retinoide X, e de biossíntese de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio. De acordo com o estágio de desenvolvimento folicular essas vias se alternaram apresentando-se ativadas ou inibidas. Por exemplo, a via do sistema de coagulação apresentou-se suprimida nos momentos pré-desvio e de desvio folicular, contudo, foi seletivamente ativada no momento pós-desvio, voltando a ter regulação reduzida no momento pré-ovulatório. A dinâmica proteica observada nesta via, sugere que a sua modulação é fator indispensável, de acordo com o estágio de desenvolvimento folicular, para a remodelação contínua da matriz extracelular (FERRAZZA et al., 2017).

2.5 Genes de interesse durante o desvio folicular

O desvio folicular acontece quando os folículos recrutados são diferenciados pelo diâmetro; desse modo, um folículo atinge o maior diâmetro em relação aos restantes que, posteriormente, sofrerão atresia (Ginther, 2016). Estudos que empregaram transcriptômica, permitiram relacionar alguns genes com a possível capacidade de um folículo se tornar dominante durante o desvio. Dentre esses genes, destacam-se alguns com funções esteroidogênicas como o CYP19A1, CYP11A1, HSD17B1 e HSD3B1 (GUPTA et al., 2014; LI et al., 2016 e 2017; YAO et al., 2021). Um aumento na expressão dos genes CYP19A1 e CYP11A1 no maior folículo *versus* o segundo maior folículo, durante o começo do desvio, estimula a produção de proteínas que levam o mesmo nome e que, no caso da CYP19A1, regulada pelos receptores de estrogênio e cAMP/protein kinase A ativa os processos moleculares que permitem a adquisição da dominância folicular, cascata de eventos que é sustentada pelo receptor de FSH nas células da granulosa (LUO et al., 2006).

Um outro mecanismo que modula a esteroidogênese no folículo durante o começo do desvio pode ser explicado pelo efeito potencializador da via Wnt na ação do FSH (GUPTA et al., 2014). A via Wnt é responsável pela morfogênese de tecidos, função realizada na embriogênese e na reparação tecidual (PATEL et al., 2019). A via Wnt pode

estimular processos moleculares através de três vias: a canônica, via não canônica e via Wnt/Ca2+. A via canônica é caracterizada pela união do ligante Wnt ao receptor e co-receptor, respectivamente, *frizzled* (FZD) e receptor relacionado à proteína (LRP); posteriormente, o *Disheveled 1* (DVL1) é ligado a Axina 2 (AXIN2), mecanismo que impede a formação do complexo AXIN2/GSK3b/APC/ CTNNB1 (complexo de degradação proteolítica do CTTNNB1) e permite a transcrição de genes (BOYER et al., 2010). Em células da granulosa de folículos no começo do desvio e, cultivadas com IWR-1 (inibidor de Wnt), foi observada uma diminuição da produção de estradiol e numero de células, efeito que, molecularmente, foi caracterizado pelo aumento da proteína AXIN2 e inibição da proteína CTNNB1. No entanto, o mesmo tratamento, sem a inclusão de FSH no meio de cultura, não ocasionou diminuição na produção de estradiol, resultados que demonstram uma ação da via Wnt FSH dependente (GUPTA et al., 2014).

3 REFERÊNCIAS

ADAMS, G. P. et al. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 94, p. 177–188, 1992.

AERTS, J. M. J.; BOLS, P. E. J. Ovarian follicular dynamics: A review with emphasis on the bovine species. Part I: folliculogenesis and pre-antral follicle development. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 1, p. 171–179, 2010.

AUSTIN, E. J.; MIHM, M.; EVANS, A. C. O.; KNIGHT, P. G.; IRELAND, J. L. H.; IRELAND, J. J.; ROCHE, J. F. Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 3, p. 839–848, 2001.

BADINGA, L.; DRIANCOURT, M. A.; SAVIO, J. D.; WOLFENSON, D.; DROST, M.; DE LA SOTA, R. L.; THATCHER, W. W. Endocrine and ovarian responses associated with the first-wave dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 47, n. 5, p. 871–883, 1992.

BAINBRIDGE, M. N. et al. Analysis of the prostate cancer cell line LNCaP transcriptome using a sequencing-by-synthesis approach. **BMC Genomics**, v. 7, p. 1–11, 2006.

BAUER, B. K. et al. Transcriptional profiling by deep sequencing identifies differences in mRNA transcript abundance in in vivo-derived versus in vitro-cultured porcine blastocyst stage embryos. **Biology of Reproduction**, v. 83, n. 5, p. 791–798, 2010.

BEG, M. A. et al. Follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. **Biology of Reproduction** , v. 64, n. 2, p. 432–441, 2001.

BOYER, A.; GOFF, A. K.; BOERBOOM, D. WNT signaling in ovarian follicle biology and tumorigenesis. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 21, n. 1, p. 25–32, 2010.

BIAN, X. et al. Transcriptional changes of mouse ovary during follicle initial or cyclic recruitment mediated by extra hormone treatment. Life Sciences, n. August, p. 118654, 2020. BURATINI, J. et al. Expression and function of fibroblast growth factor 10 and its receptor, fibroblast growth factor receptor 2B, in bovine follicles. **Biology**

of Reproduction, v. 77, n. 4, p. 743–750, 2007.

CAPRA, E. et al. Seasonal effects on miRNA and transcriptomic profile of oocytes and follicular cells in buffalo (Bubalus bubalis). **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2020.

CARD, C. J. et al. Cryopreserved bovine spermatozoal transcript profile as revealed by high-throughput ribonucleic acid sequencing. **Biology of Reproduction**, v. 88, n. 2, p. 1–9, 2013.

CHEN, H. Y. et al. Differential gene expression in ovaries of Qira black sheep and Hetian sheep using RNA-seq technique. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–15, 2015.

CHRISTENSON, L. K. et al. Research resource: Preovulatory LH surge effects on follicular theca and granulosa transcriptomes. **Molecular Endocrinology**, v. 27, n. 7, p. 1153–1171, 2013.

CUNNINGHAM, E. P. The application of biotechnologies to enhance animal production in defferent farming systems. Livest. **Prod. Scientific**, v. 58, p. 1–24, 1999.

DAS, P. J. et al. Stallion sperm transcriptome comprises functionally coherent coding and regulatory RNAs as revealed by microarray analysis and RNA-seq. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. 1–15, 2013.

DONADEU, F. X. et al. Transcriptome profiling of granulosa and theca cells during dominant follicle development in the horse. **Biology of Reproduction**, v. 91, n. 5, p. 1–12, 2014.

FERRAZZA, R. et al. Thermoregulatory responses of Holstein cows exposed to experimentally induced heat stress. **Journal of Thermal Biology**, v. 66, p. 68–80, 2017.

FERREIRA, R. et al. Angiotensin II signaling promotes follicle growth and dominance in cattle. **Endocrinology**, v. 152, n. 12, p. 4957–4965, 2011.

FORTUNE, J. E.; SIROIS, J.; QUIRK, S. M. The growth and differentiation of ovarian follicles during the bovine estrous cycle. **Theriogenology**, v. 29, n. 1, p. 95–109, 1988.

GINTHER, O. J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J. P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **Journal of re-**

production and fertility, v. 87, n. 1, p. 223–230, 1989.

GINTHER, O. J. et al. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 6, p. 1187–1194, 1996.

GINTHER, O. J. et al. Selection of the dominant follicle in cattle: Establishment of follicle deviation in less than 8 hours through depression of FSH concentrations. **Theriogenology**, v. 52, n. 6, p. 1079–1093, 1999.

GINTHER, O. J. The theory of follicle selection in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 57, p. 85–99, 2016.

GOOD, T. E. M.; WEBER, P. S. D.; IRELAND, J. L. H.; PULASKI, J.; PADMANABHAN, V.; SCHNEYER, A. L.; LAMBERT-MESSERLIAN, G.; GHOSH, B. R.; MILLER, W. L.; GROOME, N.; IRELAND, J. J. Isolation of nine different biologically and immunologically active molecular variants of bovine follicular inhibin. **Biology of Reproduction**, v. 53, n. 6, p. 1478–1488, 1995.

GRØNDAHL, M. L. et al. Specific genes are selectively expressed between cumulus and granulosa cells from individual human pre-ovulatory follicles. **Molecular Human Reproduction**, v. 18, n. 12, p. 572–584, 2012.

GUPTA, P. S. P.; FOLGER, J. K.; RAJPUT, S. K.; LV, L.; YAO, J.; IRELAND, J. J.; SMITH, G. W. Regulation and regulatory role of WNT signaling in potentiating FSH action during bovine dominant follicle selection. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. 1–9, 2014.

HATZIRODOS, N. et al. Transcriptome profiling of granulosa cells of bovine ovarian follicles during growth from small to large antral sizes. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, 2014a.

HATZIRODOS, N. et al. Transcriptome profiling of the theca interna in transition from small to large antral ovarian Follicles. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. e97489, 2014b.

HATZIRODOS, N. et al. Transcriptome profiling of the granulosa from bovine ovarian follicles during atresia. **BMC Genomics**, v. 9, n. 6, 2014c.

HATZIRODOS, N. et al. Transcriptome profiling of the theca interna from bovine ovarian follicles during atresia. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, 2014d.

HERNÁNDEZ-MONTIEL, W. et al. RNA-seq transcriptome analysis in ovarian tissue of pelibuey breed to explore the regulation of prolificacy. **Genes**, v. 10, n. 5, p. 1–13, 2019.

HUANG, W.; KHATIB, H. Comparison of transcriptomic landscapes of bovine embryos using RNA-Seq. **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2010.

KESSLER, C. S. et al. Personality profiles, values and empathy: differences between lacto-ovo-vegetarians and vegans. **Forschende Komplementarmedizin**, v. 23, n. 2, p. 95–102, 2016.

KROPP, J. et al. Male fertility status is associated with DNA methylation signatures in sperm and transcriptomic profiles of bovine preimplantation embryos. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 1–15, 2017.

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

LAN, D. L. et al. RNA-Seq analysis of yak ovary: improving yak gene structure information and mining reproduction-related genes. Science China. **Life sciences**, v. 57, n. 9, p. 925–935, 2014.

LI, P. et al. Transcriptome analysis of bovine ovarian follicles at predeviation and onset of deviation stages of a follicular wave. **International Journal of Genomics**, v. 2016, 2016.

LI, P.; MENG, J.; ZHU, Z.; FOLGER, J. K.; LYU, L. Detection of Genes Associated with Follicle Development Through Transcriptome Analysis of Bovine Ovarian Follicles GCs. **Current Bioinformatics**, v. 13, n. 2, p. 127–140, 2017.

LIU, Y. et al. Identification of transcriptome differences in goat ovaries at the follicular phase and the luteal phase using an RNA-Seq method. **Theriogenology**, v. 158, p. 239–249, 2020.

LUO, W.; WILTBANK, M. C. Distinct regulation by steroids of messenger RNAs for FSHR and CYP19A1 in bovine granulosa cells. **Biology of Reproduction**, v. 75, n. 2, p. 217–225, 2006.

MAGALHÃES, D. et al. Hormônio do crescimento (GH) e fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I): importantes reguladores das foliculogêneses in vivo e in vitro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, n. 1, p. 32–38, 2012.

MAZZONI, G. et al. Application of integrative genomics and systems biology to conventional and in vitro reproductive traits in cattle. **Animal Reproduction**, v. 14, n. 3, p. 507–513, 2017.

MCGETTIGAN, P. A. Transcriptomics in the RNA-seq era. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 17, p. 4–11, 2013.

MIHM, M.; CROWE, M. A.; KNIGHT, P. G.; AUSTIN, E. J. Follicle wave growth in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, n. 4, p. 191–200, 2002.

MIHM, M. et al. Differentiation of the bovine dominant follicle from the cohort upregulates mRNA expression for new tissue development genes. **Reproduction**, v. 135, n. 2, p. 253–265, 2008.

MORTAZAVI, A. et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. **Nature Methods**, v. 5, n. 7, p. 621–628, 2008.

PATEL, S.; ALAM, A.; PANT, R.; CHATTOPADHYAY, S. Wnt Signaling and Its Significance Within the Tumor Microenvironment: Novel Therapeutic Insights. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. December, 2019.

PEREIRA, P. C. Milk nutritional composition and its role in human health. **Nutrition**, v. 30, n. 6, p. 619–627, 2014.

PORTELA, V. M. et al. Expression and function of fibroblast growth factor 18 in the ovarian follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 83, n. 3, p. 339–346, 2010.

PRICE, C. A.; WEBB, R. Steroid control of gonadotropin secretion and ovarian function in heifers. **Endocrinology**, v. 122, n. 5, p. 2222–2231, 1988.

PUTTABYATAPPA, M. et al. Developmental programming: sheep granulosa and theca cell-specific transcriptional regulation by prenatal testosterone. **Endocrinology**, v. 105, n. 8, p. 1–17, 2020.

ROMEREIM, S. M. et al. Gene expression profiling of bovine ovarian follicular and

luteal cells provides insight into cellular identities and functions. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 439, p. 379–394, 2017.

UPADHYAY, R. D. et al. Proteomics in reproductive biology: Beacon for unraveling the molecular complexities. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1834, n. 1, p. 8–15, 2013.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **NATURE REVIEWS | genetics**, v. 10, p. 57–63, 2009.

YANG, M. et al. Transcriptional analysis of deoxynivalenol-induced apoptosis of sow ovarian granulosa cell. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 55, n. 2, p. 217–228, 2020.

YAO, Y. C.; SONG, X. T.; ZHAI, Y. F.; LIU, S.; LU, J.; XU, X.; QI, M. Y.; ZHANG, J. N.; HUANG, H.; LIU, Y. F.; LIU, G. S.; YUAN, H. Transcriptome analysis of sheep follicular development during prerecruitment, dominant, and mature stages after FSH superstimulation. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 74, 2021.

ZHANG, M. et al. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. **Science**, v. 330, p. 366–370, 2010.

ZIELAK-STECIWKO, A. E.; EVANS, A. C. O. Genomic portrait of ovarian follicle growth regulation in cattle. **Reproductive Biology**, v. 16, n. 3, p. 197–202, 2016.