

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**INFLUÊNCIA DE GRÂNULOS CITOPLASMÁTICO EM
OÓCITOS NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E
INÍCIO DO FETAL EM BOVINOS**

Paola Maria da Silva Rosa

Médica Veterinária

2019

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**INFLUÊNCIA DE GRÂNULOS CITOPLASMÁTICO EM
OÓCITOS NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E
INÍCIO DO FETAL EM BOVINOS**

Discente: Paola Maria da Silva Rosa

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia

Co-orientadora: Dra. Clara Slade Oliveira

Co-orientadora: Dra. Marina Ragagnin de Lima

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
(Reprodução Animal)

2019

R788i Rosa, Paola Maria da Silva
Influência de grânulos citoplasmático em oócitos no desenvolvimento embrionário e início do fetal em bovinos / Paola Maria da Silva Rosa. -- Jaboticabal, 2019
41 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Joaquim Mansano Garcia
Coorientadora: Clara Slade Oliveira

1. Reprodução. 2. Oócitos. 3. Citoplasma. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: INFLUÊNCIA DE GRÂNULOS CITOPLASMÁTICO EM OÓCITOS NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E INÍCIO DO FETAL EM BOVINOS

AUTORA: PAOLA MARIA DA SILVA ROSA

ORIENTADOR: JOAQUIM MANSANO GARCIA

COORIENTADORA: MARINA RAGAGNIN DE LIMA

COORIENTADORA: CLARA SLADE OLIVEIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Reprodução Animal pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. CLARA SLADE OLIVEIRA (Videoconferência)
EMBRAPA Gado de Leite-Câmpus Experimental Santa Mônica / Valença/RJ

Prof. Dr. RIBRIO IVAN TAVARES PEREIRA BATISTA (Videoconferência)
Departamento de Medicina Veterinária-Universidade Federal Fluminense / Niterói/RJ

Profa. Dra. MARICY APPARÍCIO FERREIRA
Depto. de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 14 de outubro de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Paola Maria da Silva Rosa – nascida em Barra do Piraí/RJ, em 16 de janeiro de 1995. Graduiu-se em Medicina Veterinária pela Universidade Severino Sombra – USS, em julho de 2017. Durante a graduação foi bolsista pela Embrapa Gado de Leite, no Laboratório de Reprodução Animal no Campo Experimental de Santa Mônica- localizado em Juparanã/Valença, sob a orientação da Dra Clara Slade Oliveira, durante os anos de 2014 à 2016. Também foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, na modalidade de Iniciação Científica, Embrapa Gado de Leite, no Laboratório de Reprodução Animal no Campo Experimental de Santa Mônica- localizado em Juparanã/Valença, sob a orientação da Dra Clara Slade Oliveira, durante o primeiro semestre do ano de 2017. Em agosto de 2017 ingressou no curso de Mestrado em Medicina Veterinária - Reprodução Animal, junto à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, sob a orientação do Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia. Durante o período de mestrado foi bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, de agosto de 2017 a fevereiro de 2019.

“O começo de todas as ciências é o espanto de as coisas serem o que são”.
Aristóteles

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Edna e José Luis, aos meus irmãos Pablo e Izabella e aos meus sobrinhos Ana Clara, Luís Otávio e Luís Augusto pois sem eles, minha base e razão de tudo, nada seria possível.

AGRADECIMENTOS

A Deus que acompanhou meus passos durante a caminhada de minha vida, me permitiu crescer, florescer e me tornar a pessoa que sou hoje.

Aos meu pais Edna e Luís, irmãos Pablo e Izabella, afilhada Ana Clara, primos, cunhados, tios e amigos por todo apoio concedido e aprendizado durante os anos de convivência juntos.

Ao meu orientador Joaquim Mansano Garcia Gomes pelos valiosos ensinamentos, gentileza, atenção e confiança depositada em mim para realização desse trabalho.

A minha co-orientadora Clara Slade Oliveira pessoa que me mostrou o quão vasto é o mundo da reprodução animal, o que me fez apaixonar e almejar a caminhar nesse mundo de descobertas que é a pesquisa. Agradeço pelos inúmeros aprendizados e oportunidades acumulados durante o tempo de estágio/convívio e por fim agradeço a oportunidade de realizar este estudo e a confiança depositada em mim, sem dúvida este trabalho não seria possível sem sua presença.

A minha co-orientadora Marina pelo suporte em todos os momentos que precisei e pela confiança no meu trabalho.

A Embrapa Gado de Leite e os funcionários do Campo Experimental e Santa Mônica, no qual tive o privilégio de conviver e nesse tempo criar boas amizades. Agradeço a Cuca, Sidney, Adilson, Joaquim, Célio.

Aos amigos de pós-graduação Clara e Gabriela pela amizade, agradeço pelos ensinamentos, pelos risos, pelos conselhos, pelos abraços.

Ao Pedro também amigo de pós-graduação, pelas conversas, troca de experiências, e pelas análises fetais realizadas.

Aos membros de todas as minhas “bancas” que aceitaram contribuir e fazer parte dessa importante etapa de minha vida.

Agradeço em especial ao Ribrio pela pronta ajuda em emprestar os primes para análises dos genes MATER e ZAR1

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Produção <i>in vitro</i> de embriões (PIVE) bovinos.....	2
2.2. Maturação oocitária.....	4
2.3. Parâmetros morfológicos de qualidade oocitária	6
2.4. Grânulos citoplasmáticos	8
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1. Desenho experimental	10
3.2. Sessões de Opu.....	11
3.3. Ovários de abatedouro.....	12
3.4. Seleção de oócitos	12
3.5. Níveis de caspase 3 ativa.....	13
3.6. Atividade das junções GAP	13
3.7. Maturação <i>in vitro</i> (MIV)	14
3.8. Fertilização <i>in vitro</i> (FIV)	14
3.9. Cultivo <i>in vitro</i> (CIV)	15
3.10. Avaliações do desenvolvimento embrionário.....	15
3.11. Diagnóstico de gestação e desenvolvimento fetal precoce.....	16
3.12. Análise de expressão gênica	17
3.12. Análise estatística.....	18
4. RESULTADOS.....	19
4.1. Os níveis da enzima caspase 3 ativa são afetados pelo citoplasma granulado.....	20
4.2. A atividade das junções GAP não é afetada pelo citoplasma granulado	20
4.3. Expressão do transcrito ZAR1 é alterada em oócitos com citoplasma granular.....	21

4.4. O citoplasma granular em oócitos não afeta as taxas nem a cinética de desenvolvimento embrionário.....	24
4.5. A cinética do desenvolvimento embrionário é semelhante entre os oócitos controle e granular	25
4.6. O perfil citoplasmático granular não altera o desenvolvimento inicial do feto 26	
5. DISCUSSÃO	27
6. CONCLUSÃO	32
7. REFERÊNCIAS.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosina trifosfato
BMP15	“Bone morphogenetic 15”
BSA	Albumina sérica bovina
CAPES	Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior
CC	Citoplasma controle
CCC	Comprimento crânio-caudal
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
cDNA	DNA complementar
CEUA	Comitê de ética e uso dos animais
CG	Citoplasma granular
CO ₂	Dióxido de carbono
COC	Complexo <i>cumulus</i> -oócito
DBP	Diâmetro biparietal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ENY2	“Transcription And Export Complex 2 Subunit”
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
g	Grama
G	Gauge
GAPDH	“Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase”
QVG	Quebra de vesícula germinativa
H	Hora
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
Hpi	Horas pós-inseminação
IGF2R	“Insulin-like growth factor 2 receptor”
LH	Hormônio luteinizante
MATER	“Maternal antigen that embryo requires”
mg	Miligramma
MHz	Megahertz
MII	Metáfase II
Min	Minuto
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mmHg	Milímetro de mercúrio
nm	Nanômetro
OPU	Ovum pick up
PBS	Tampão salina fosfato
PBS-T	PBS suplementado com Tween-20 à 0.2%
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PFA	Paraformaldeído
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões

PPP2R1A	“Protein phosphatase 2 regulatory subunit alpha”
RGB	“red, green, blue”
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
RT	Transcrição reversa
S	Segundos
SOF	Fluido sintético de oviduto
SFB	Soro fetal bovino
TALP FIV	Meio de fecundação
TCM 199	Meio de cultura de tecido 199
TE	Transferência de embrião
TRA	Técnica de reprodução assistida
UI	Unidades internacionais
UQCRH	“Ubiquinol–cytochrome c reductase hinge”
VES	Diâmetro de vesícula embrionária
VG	Vesícula germinativa
xG	Rotação por minuto
ZAR1	“Zygote arrest 1”
°C	Grau Celsius
%	Porcentagem
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
µM	Micromolar

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência de primers (5 'a 3'), tamanho do produto e referência dos genes analisados em oócitos, blastocistos e células do cumulus **18**

Tabela 2. Efeitos do perfil citoplasmático no desenvolvimento pós-implantação.
..... **27**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Óocitos bovinos apresentando grânulos citoplasmáticos	19
Figura 2. Índice de apoptose em oócitos com citoplasma controle (A) e granular (B)	20
Figura 3. Atividade de junções GAP em oócitos com citoplasma controle (A) e granular (B)	21
Figura 4. Expressão relativa de transcritos ZAR1 (A), MATER (B), PPP2R1A (C), UQCRH (D), ENY2 (E) e IGF2R (F) detectados em oócitos com citoplasma controle e granular.	22
Figura 5. Expressão relativa de transcritos BMP15 (A) e IGF2R (B) detectados nas células do cumulus de oócitos com citoplasma granular.....	23
Figura 6. Expressão relativa de transcritos detectados em blastocistos obtidos a partir de oócitos com citoplasma granular.....	23
Figura 7. Taxas clivagem (A) e blastocisto (B) de oócitos com citoplasma controle e granular do experimento 1	24
Figura 8. Taxas de clivagem (A), blastocisto (B) e prenhez (C) de oócitos com citoplasma controle e granular do experimento 2	25
Figura 9. Análise da cinética de desenvolvimento de embriões produzidos a partir de oócitos com citoplasma granular.....	26

INFLUÊNCIA DE GRÂNULOS CITOPLASMÁTICO EM OÓCITOS NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E INÍCIO DO FETAL EM BOVINOS

RESUMO - Análises morfológicas para seleção de oócitos podem subestimar os gametas femininos em relação ao seu potencial de desenvolvimento, pela subjetividade da técnica por identificar apenas alterações aparentes em microscopia de luz. Este método pode não ser capaz de avaliar por exemplo, a competência a nível molecular, nuclear e citoplasmática do oócito, como perfil de transcritos acumulados, organização de organelas e vias de apoptose ativas. Portanto, sob a hipótese que grânulos citoplasmáticos em oócitos não alteram a capacidade de desenvolvimento, a qualidade dos embriões gerados e o desenvolvimento embrionário e fetal, o objetivo do nosso estudo foi avaliar os efeitos de grânulos citoplasmáticos na produção *in vitro* de embriões. Para testar esta hipótese, utilizamos o modelo bovino em dois experimentos para avaliar grupos de oócitos com citoplasma homogêneo (controle) e oócitos que apresentam granações no citoplasma (granular). No experimento 1, através de amostras de ovários de abatedouro, observamos que: i. Nas análises de perfil funcional do oócito, estruturas que possuem grânulos citoplasmáticos apresentam maiores níveis de caspase 3 ativa (indicador da cascata de apoptose), no entanto não demonstram nenhuma diferença em relação a atividade de junções GAP (comunicação oócito-células do cumulus), ii: Nas análises de expressão de genes marcadores de qualidade realizadas em oócitos, blastocistos e células do cumulus, apenas o transcrito ZAR1 foi diferencialmente expresso, sendo pouco detectado em oócitos do grupo granular e iii: Em análises de taxas e cinética de desenvolvimento embrionário (clivagem, blastocisto), não detectamos diferenças entre os grupos. No experimento 2, através de amostras obtidas por aspirações foliculares, observamos que, i: As taxas de desenvolvimento embrionário (clivagem, blastocisto e prenhez) não foram diferentes em relação a presença de grânulos citoplasmáticos e ii: O desenvolvimento fetal (diâmetro de vesícula embrionária, diâmetro biparietal e comprimento crânio-caudal) também foi similar. Portanto, concluímos que apesar de oócitos que apresentam grânulos citoplasmático, possuírem maiores níveis de caspase 3 ativa e menor abundância de transcritos de ZAR1, não foi detectada diferença no potencial de desenvolvimento pré e pós-implantação, bem como alterações no desenvolvimento fetal. Nossos resultados demonstram que o citoplasma granular no modelo bovino não afeta o potencial de desenvolvimento embrionário, e estas estruturas podem ser incluídas para produção *in vitro* de embriões sem prejuízos aparentes.

Palavras-chave: Avaliação morfológica, qualidade oocitária, dimorfismo citoplasmático.

CYTOPLASMIC GRANULES INFLUENCE IN OOCYTES ON EMBRYONIC AND EARLY FETAL DEVELOPMENT IN BOVINE

ABSTRACT - Morphological analysis for oocyte selection may underestimate female gametes in regarding their developmental potential, due to the technique subjectivity for only identifies apparent changes in light microscopy. This method may not be able to evaluate for example the molecular, nuclear and cellular oocyte competence, such as transcript profile accumulations, organelles organization and active apoptosis pathways. Therefore, under the hypothesis that oocytes cytoplasmic granules do not alter the development capacity, embryos quality and embryonic and fetal development, the study objective was to evaluate cytoplasmic granules effects on in vitro embryo production. To test this hypothesis we used bovine model in two experiments to evaluate groups of homogeneous cytoplasm oocytes (control) and granular cytoplasm oocytes (granular). In experiment 1, through slaughterhouse ovarian samples we observed: i. In the analysis of oocyte functional profile structures that have cytoplasmic granules have higher active caspase 3 levels (apoptosis cascade indicator), but do not show any difference in GAP junction activity (oocyte- cumulus cell communication). ii. In the analysis of quality marker gene expression performed in oocytes, blastocysts and cumulus cells, only the ZAR1 transcript was differentially expressed and poorly detected in granular group oocytes and iii. In embryonic development rates (cleavage, blastocyst) and kinetics analysis we did not detect differences between the groups. In experiment 2, through samples obtained by follicular aspirations, we observed that: i. Embryonic development rates (cleavage, blastocyst and pregnancy) were not different in relation to the presence of cytoplasmic granules and ii: Fetal development (embryonic vesicle diameter, biparietal diameter and craniocaudal length) was also similar. Therefore, we conclude that although oocytes that have cytoplasmic granules have higher levels of active caspase 3 and lower abundance of ZAR1 transcripts, no difference was detected in pre- and post-implantation developmental potential, as well as changes in fetal development. Our results demonstrate that granular cytoplasm in the bovine model does not affect embryonic development potential and these structures can be included for in vitro embryo production without apparent damage.

Keywords: Morphological evaluation, oocyte quality, cytoplasmic dimorphism.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil está ranqueado como maior produtor de embriões *in vitro* da América Latina (IETS 2017). Esta posição nos confere a responsabilidade em conduzir estudos com objetivo de impulsionar e elucidar obstáculos ainda encontrados na técnica. A PIVE é cada vez mais aplicada em sistemas pecuários por garantir interesses econômicos como otimizar o potencial reprodutivo de fêmeas, recuperação contínua de gametas em animais gestantes e com patologias reprodutivas adquiridas (BOUQUET; JUGA, 2013), alternativas não oferecidas por outras biotecnologias como inseminação artificial em tempo fixo. No entanto, os índices alcançados ainda são subótimos quando comparados com números obtidos *in vivo* e diversos fatores podem estar envolvidos com a alta sensibilidade da técnica. Nesse contexto, a seleção de oócitos viáveis ao desenvolvimento, é um dos indicadores relacionados aos resultados desapontadores da técnica em relação a produção de embriões *in vivo*.

O sucesso das técnicas de reprodução assistida (TRA) está intimamente relacionado com a qualidade do oócito que dará origem ao embrião (LONERGAN et al., 2000, 2003). Por isso, as primeiras etapas da técnica, que consistem na seleção e classificação de oócitos aptos ao desenvolvimento, são passos extremamente importantes, que devem ser cuidadosamente conduzidos. Assim, a seleção e análise de qualidade imprecisos tem potencial de influenciar negativamente a produção embrionária.

A análise morfológica de oócitos, técnica realizada na rotina para seleção de estruturas, se baseia na homogeneidade do citoplasma e número e apresentação de camadas de células do cumulus (HENRIQUE; VIANA, 2004). Este é um método subjetivo e por muitas das vezes impreciso. Em termos gerais, não revela a realidade intrínseca do gameta (MAZZONE et al., 2005), e por isso, surge o questionamento se o modelo de avaliação influencia diretamente na performance da técnica. Dados de laboratórios de fertilização em humanos demonstram que mais da metade de oócitos recuperados apresentam certa anormalidade morfológica e as anomalias no citoplasma são uma das classes de anormalidade encontradas (ASHRAFI et al., 2015). Dados do Laboratório de Reprodução Animal do Campo Experimental Santa Mônica, da Embrapa Gado de Leite demonstram que cerca de 30% dos oócitos recuperados em sessões de

aspiração folicular de doadoras são considerados não viáveis ao desenvolvimento e descartados (dados não publicados). Esses indicadores demonstram, que tanto na pecuária quanto na reprodução humana assistida, a janela de alterações morfológicas de oócitos recuperados tem alto impacto sobre o total de estruturas recuperadas.

A morfologia oocitária pode não refletir a competência citoplasmática, correlacionada com indicadores de qualidade tal como conteúdo lipídico, perfil molecular e bioquímico. Ou seja, entender os limites para submeter oócitos que apresentem dimorfismos citoplasmáticos ao desenvolvimento, e não descartar estruturas aptas, é crucial para aperfeiçoar a técnica. Os efeitos das anormalidades morfológicas em oócitos na produção de blastocistos são difíceis de quantificar. Apesar de novas análises no âmbito molecular que incrementam cada vez mais com novos marcadores de qualidade (ACEVEDO, 2005; WRENZYCKI; HERRMANN; NIEMANN, 2007; JIAO; XU; WOODRUFF, 2012; O'SHEA et al., 2012), todas apresentam o mesmo obstáculo: Estudar uma única grande célula, e que se destruída para análise será inviabilizada. Métodos como utilizar corpúsculos polar ou células da granulosa como biomarcadores de qualidade oocitária, podem não transmitir dados confiáveis, bem como a técnica de biopsia pode infligir danos irreversíveis ao oócito.

Por esses motivos, diferentes abordagens foram conduzidas nesse estudo (perfil estrutural dos oócitos, expressão de genes marcadores de qualidade, análises de desenvolvimento embrionário individual, efeitos pós-implantacionais) para pontuar onde estão as maiores diferenças entre oócitos normais e com citoplasma granular. A análise apresentada propõe uma alternativa para atribuir novos limiares que encorajam a utilização de oócitos com morfologia atípica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos

Visto as inúmeras variáveis reprodutivas beneficiadas pela biotécnica de produção *in vitro* de embriões, como por exemplo, a possibilidade de otimizar a reprodução pela capacidade de acelerar o retorno econômico de animais com alto valor genético, diminuir o intervalo entre gerações, facilitar a comercialização de proles (BOUQUET; JUGA, 2013) também consiste em um método alternativo à superovulação para produção e transferência de embriões (TE) em larga escala (VIANA et al., 2010) e até mesmo reprodução de animais com patologias reprodutivas adquiridas e entre outras, a técnica apresenta-se cada vez mais difundida entre os sistemas produtivos, tanto na realidade da pecuária de corte (SINCLAIR; BROADBENT; DOLMAN, 1995) quanto de leite (PONTES et al., 2010).

Além do impacto positivo da fertilização *in vitro* (FIV) direcionado à reprodução animal, a técnica desperta interesses em áreas acadêmico/científicas. Nesse contexto, o modelo bovino surge como uma potencial ferramenta para elucidação de diversos questionamentos na biologia reprodutiva relacionados ao período embrionário, principalmente em processos que cercam o desenvolvimento pré-implantação como a aquisição de competência gamética, acúmulo do estoque transcricional oocitário, ativação do genoma do embrião e diferenciação das linhagens celulares. Além de tudo, apresenta-se como a etapa que precede e permite a realização de outras biotecnologias, como a transferência nuclear de células somáticas, edição gênica e produção de células tronco (MATCHING; TEST, 2001).

Conforme já descrito, o protocolo para produção *in vitro* de embriões bovinos consiste em três etapas principais: a maturação *in vitro* (MIV) de oócitos imaturos, a fertilização *in vitro* (FIV) de oócitos maturados pelo co-cultivo com espermatozoides capacitados e o cultivo *in vitro* (CIV) embrionário (MATCHING; TEST, 2001).

Em termos gerais, a técnica tem como principal objetivo mimetizar os eventos fisiológicos que ocorrem na ovulação (MIV), fecundação de oócitos em MII (FIV) e durante os primeiros 7 dias do desenvolvimento embrionário (CIV). Apesar dos avanços e do aperfeiçoamento da biotécnica, os embriões produzidos *in vitro* ainda apresentam notáveis diferenças intrínsecas e

extrínsecas quando comparados a embriões produzidos *in vivo* (BARFIELD, 2015).

Essas diferenças estão relacionadas a fatores como morfologia estrutural embrionária, perfil de expressão e ativação gênica (HOELKER et al., 2014), que culminam no potencial e competência em desenvolver até blastocistos, estabelecer prenhez e manter a gestação até o nascimento. Apenas cerca de 20 a 40% (LONERGAN; FAIR, 2008) dos oócitos submetidos às etapas de desenvolvimento *in vitro* são capazes de atingir o estágio de blastocisto. A maioria das estruturas falha e cessa o desenvolvimento.

Diversos eventos biológicos alicerces do desenvolvimento embrionário são foco de pesquisas para a melhoria na recuperação de blastocistos e competência embrionária. Assim, a caracterização correta da qualidade do oócito que dará origem ao embrião é um fator crucial para o sucesso da técnica.

2.2. Maturação oocitária

A maturação oocitária consiste na primeira etapa da fertilização *in vitro* (GE et al., 2017). Este processo é didaticamente dividido em dois principais fenômenos biologicamente descritos como maturação nuclear e maturação citoplasmática (GOTTARDI; MINGOTI, 2009). Em mamíferos, os eventos da maturação envolvem um complexo de processamentos no núcleo e citoplasma que apesar de ocorrerem em diferentes compartimentos são interligados e devem transcorrer de maneira sincronizada para culminar com a aquisição de competência do oócito e esta determinará o futuro do desenvolvimento embrionário (ARITRO SEN, 2013). Resumidamente, tem início na vida embrionária/fetal, passa pela etapa de quiescência, no qual a maturação é interrompida. Após a aquisição da maturidade sexual durante a puberdade, a maturação dos oócitos é retomada em ciclos até o momento em que o estoque gamético esgota e a fêmea atinge o fim do ciclo reprodutivo de sua vida.

A maturação nuclear consiste na progressão meiótica até a fase de metáfase da segunda divisão meiótica (SUSOR et al., 2016). Durante o

crescimento folicular, desde os folículos primordiais até o momento de dominância folicular, os oócitos permanecem adormecidos em estágio de diplóteno da prófase da primeira meiose (prófase I), no qual ocorre a descondensação dos cromossomos e estes são circundados pela membrana nuclear, configuração denominada vesícula germinativa. *In vivo*, os oócitos podem prosseguir por duas vias: entrar em processo de morte celular associada à atresia do folículo antral que estão contidos, ou retomar a meiose (LONERGAN; FAIR, 2015).

A retomada do ciclo celular envolve a quebra da vesícula germinativa (QVG), condensação do cromossomo e a formação de um fuso meiótico excêntrico (GOTTARDI; MINGOTI, 2009). É mediada pela resposta ao estímulo hormonal e, dessa forma, tem início em paralelo a onda pré-ovulatória do hormônio luteinizante (LH). Na segunda parada meiótica, o citoplasma é dividido e o oócito se torna uma célula haploide, pela extrusão do primeiro corpúsculo polar, favorecido pelo posicionamento excêntrico e assimétrico do fuso meiótico (LI; ALBERTINI, 2013). Após a maturação, o núcleo permanece em metáfase II até o momento da fecundação, que será o estímulo para a finalização da segunda meiose e extrusão do segundo corpúsculo polar.

A maturação citoplasmática consiste nos processos de redistribuição de organelas, estoque e processamento de RNAm e fatores de transcrição (FERREIRA et al., 2009). Esta fase da maturação é basicamente coordenada por microfilamentos e microtúbulos do citoesqueleto. Durante a fase imatura, os grânulos corticais estão dispersos em clusters no citoplasma. O retículo endoplasmático posiciona-se em localização uniforme no ooplasma (FERREIRA et al., 2009). As mitocôndrias, organelas com função vital na maquinaria metabólica durante o processo de maturação e desenvolvimento embrionário, são responsáveis por sintetizar o ATP necessário para a tradução de proteínas, posicionam-se na periferia da célula (WILDING et al., 2001).

No decorrer do processo de amadurecimento, as mitocôndrias percorrem um caminho migratório para o interior da célula associado a gotas de lipídeos, assumindo um posicionamento perinuclear. Os grânulos corticais migram para a periferia, promovendo após a fertilização o bloqueio da polispermia. O retículo

endoplasmático rugoso assume posição periférica e o fragmento de golgi em prófase I ao final de MII é transformado em vesículas (CHAVES et al., 2010).

Momentos antes do pico de LH, cessa a síntese e acúmulo de proteínas, lipídeos, mRNA e fatores de transcrição. O correto acúmulo desses componentes é capaz de definir o sucesso do desenvolvimento embrionário, uma vez que sustentam as primeiras clivagens até o momento em que o embrião seja capaz de transcrever mRNA a partir do seu próprio DNA (SIRARD, 2012). Ocorre o rompimento do diálogo programado entre as células do cumulus e o oócito, mediado pelas junções GAP, que também tem a função de garantir o fornecimento de substratos necessários ao desenvolvimento (LI; ALBERTINI, 2013). Ao final, a competência meiótica é estabelecida quando o folículo pré-ovulatório atinge por volta de 3mm de diâmetro e os oócitos 120-130 μ m (FAIR, 2010).

2.3. Parâmetros morfológicos de qualidade oocitária

Em termos de qualidade e competência, apesar dos avanços em pesquisas na biologia reprodutiva, oócitos maturados *in vitro* ainda apresentam resultados inferiores aos oócitos maturados *in vivo*, com discrepância nas taxas de produção de blastocisto de aproximadamente 40% (LONERGAN; FAIR, 2015). Diversos fatores podem estar relacionados a essa diferença de produção, como a assincronia entre maturação citoplasmática e nuclear, determinada pelo processamento *in vitro*. Outras fontes relacionadas de variação entre resultados no modelo *in vitro* que possuem alto impacto nas taxas produtivas são a origem e perfil do gameta feminino (PRESICCE et al., 1997), o estímulo hormonal, e a seleção das estruturas, baseada na avaliação de qualidade dos oócitos, que irão ser submetidos ao processo de desenvolvimento *in vitro* (LABRECQUE; SIRARD, 2014).

O critério de avaliação oocitário utilizado pelos laboratórios de reprodução bovina estimam a qualidade do Complexo cumulus oócito através de parâmetros morfológicas intra- e extracitoplasmáticos detectáveis por microscopia de luz.

Dessa maneira, o gameta feminino é disposto em escala qualitativa, no qual o perfil citoplasmático associado ao perfil das células somáticas que o circundam são avaliados (WANG; SUN, 2007).

Característica intracitoplasmáticas desejáveis em oócitos considerados viáveis (Grau I, grau II) são: homogeneidade ou suave heterogeneidade do ooplasma, sem sinais de vacuolizações, granulações periféricas, difusas ou centrais ou degeneração. Características extracitoplasmáticas são: mais de três camadas de células do cumulus, compactas e sem sinais de expansão. Em contrapartida, oócitos considerados não-viáveis (Grau III, degenerados e expandidos) ao desenvolvimento, são estruturas com citoplasma visivelmente heterogêneo, desnudo, com fragmentação e/ou expansão das células do cumulus ou com sinais de degenerações. Resumidamente (DE LOOS et al., 1989):

- Grau I: COC compacto, mais de três camadas de células do cumulus e citoplasma homogêneo.
- Grau II: COC compacto, menos de três camadas de células do cumulus, com citoplasma homogêneo ou suavemente heterogêneo,
- Grau III: Citoplasma heterogêneo e desnudo.
- Degenerado ou expandido: Citoplasma completamente heterogêneo, desnudo ou com expansão das células do cumulus.

Em termos gerais, a utilização de avaliações morfológicas ainda é controversa devido à subjetividade e baixa acurácia da técnica em determinar corretamente o potencial de conversão do oócito em blastocisto (WANG; SUN, 2007). Além de prover uma avaliação pouca refinada da qualidade do oócito, diversas estruturas que não correspondem aos parâmetros determinados podem estar aptas ao cultivo e, de modo diverso, aquelas que se encaixam nos parâmetros de qualidade podem não estar, o que pode ser um fator que contribui ao baixo desempenho da técnica.

A identificação de transcritos marcadores de qualidade oocitária identificou através de comparação entre perfil de transcrição gerada por análise de microarranjo, genes diferencialmente expressos entre oócitos “bons” e “ruins” (BIASE et al., 2014). Neste estudo, após biópsia do ooplasma de oócitos em

metáfase II e posterior separação dos grupos entre amostras de estruturas que alcançaram o estágio de blastocisto ou bloquearam antes (oócitos “bons” ou “ruins” respectivamente), revelou 29 genes diferencialmente expressos entre oócitos bons e ruins, entre eles IGF2R, ENY2, PPP2R1, UQCRH.

Nesse contexto, a técnica de avaliação morfológica associadas a abordagens alternativas de caracterização de qualidade, como a biópsia oocitária/biomarcadores de competência (BIASE et al., 2014), técnicas moleculares de análise das células foliculares e células do cumulus (UYAR; TORREALDAY; SELI, 2013), colorações fluorescentes para avaliação da conformação de cromatina, atividade das comunicações celulares (oócito-cumulus), índice de apoptose, conformação de grânulos corticais são perspectivas interessantes para estudos na tentativa de caracterizar diferenças de potencial e qualidade de oócitos. No entanto, apresentam os mesmos obstáculos, não são capazes de garantir a perfeita integridade do gameta feminino, ao passo que também sejam econômicas, viáveis e assim aplicável na rotina de produção.

2.4. Grânulos citoplasmáticos

Os processos de maturação, tanto citoplasmática quanto nuclear estão susceptíveis a falhas *in vivo* e *in vitro* (LONERGAN; FAIR, 2015; GE et al., 2017), que determinam anormalidades morfológicas observadas à microscopia de luz. Assim, embora a competência meiótica possa ser adquirida corretamente, diversos processos no citoplasma, necessários para o alcance da maturação e não observados à microscopia de luz, não são ainda completamente entendidos.

Nesse contexto, a formação de dimorfismos citoplasmáticos como o desenvolvimento de grânulos no citoplasma é uma casualidade, com ocorrência em por volta de 80% em oócitos recuperados em ciclos estimulados em mulheres submetidas a fertilização *in vitro* (ASHRAFI et al., 2015). Em bovinos, não há relatos na literatura desse índice, possivelmente devido à intensa oferta de material biológico. No entanto, dados demonstram que mesmo oócitos com

características interessantes ao desenvolvimento apresentam taxa de produção de embriões baixa, por volta de 20% a 40% (SIRARD et al., 2006). Isso demonstra a necessidade de pesquisas que esclareceram os pontos ainda não entendidos acerca da avaliação da competência oocitária.

Dimorfismos citoplasmáticos podem ser divididos em intracitoplasmáticas e extracitoplasmáticas. Anormalidades extracitoplasmáticas podem ser a conformação alterada de células do cumulus, não-homogeneidade de zona pelúcida, amplo espaço perivitelínico e fragmentação do corpúsculo polar (FARAMARZI; KHALILI; ASHOURZADEH, 2017). Entre as anormalidades intracitoplasmáticas estão o citoplasma escurecido, granulação de citoplasma, formato irregular, corpos refratários, agregação central de organelas e vesículas dentro do ooplasma, cluster de retículo endoplasmático e vacuolizações (EBNER; MOSER; TEWS, 2006).

Bem relatado principalmente na medicina humana, a origem do dimorfismo citoplasmático é multifatorial, pode ser causado por estimulação ovariana como protocolos hormonais, excessiva resposta ovariana pelo aumento do número de folículos aspirados e oócitos recuperados (TULAY et al., 2019), idade da doadora e condições nutricionais. Além disso, o momento de ocorrência das alterações durante a oogênese pode ocorrer em diferentes estágios da maturação pré-ovulatória (VAN BLERKOM; HENRY, 1992), ou até mesmo no momento da aspiração folicular (VAN BLERKOM, 1990). São frequentemente correlacionadas com aneuploidias genéticas e falha na fertilização, e podem aumentar progressivamente o grau de granulações durante o desenvolvimento. Estas descobertas sugerem que as alterações morfológicas podem variar de intensidade conforme o avanço das ondas foliculares.

Na rotina de produção de embriões bovinos, oócitos que apresentam qualquer alteração extra- ou intracitoplasmática são descartados. No entanto, dados na reprodução humana são controversos: alguns estudos apontam que a apresentação de dimorfismos intracitoplasmáticos como granulações, corpos refratários, incorporações escuras (SUTTER et al., 2012) não causam efeitos na fertilização (YU et al., 2015b) e desenvolvimento embrionário (ASHRAFI et al., 2015), outros demonstram que o potencial de clivagem (FARAMARZI; KHALILI; ASHOURZADEH, 2017) e implantação podem ser afetados (TULAY et al., 2019).

Com base nesses dados, é provável que haja uma correlação entre dimorfismos citoplasmáticos e falha na competência de desenvolvimento (BALABAN et al., 2008) e até anomalias cromossômicas (YAKIN et al., 2007). Ademais, pela variedade de dimorfismos citoplasmáticos, e poder serem causados a partir de diferentes vias, os efeitos nos oócitos e o desenvolvimento embrionário podem variar.

Pelo exposto, é notável que os parâmetros morfológicos utilizados para identificar a qualidade oocitária, não são capazes de predizer o potencial de desenvolvimento de oócitos que apresentam como anormalidades grânulos citoplasmáticos. Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo caracterizar o impacto intrínseco (molecular e estrutural) de grânulos no citoplasma e o desenvolvimento embrionário/fetal oriundos dessa classe de oócitos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Desenho experimental

No presente estudo, foi comparado o potencial de desenvolvimento e parâmetros associados à qualidade em oócitos apresentando dimorfismo citoplasmático (grupo citoplasma granular, CG) com oócitos sem anormalidades morfológicas aparentes a avaliações visuais (grupo citoplasma controle, CC).

Para tanto, dois experimentos foram conduzidos. No experimento 1, com o objetivo de dissecar características funcionais e o potencial de progressão dos grupos avaliados (CG vs CC), estruturas recuperadas de abatedouro foram submetidas a avaliações qualitativas para níveis de caspase 3 ativa em oócitos desnudos, atividade de junções GAP em COC's e perfil de expressão de genes relacionados à competência em oócitos desnudos, suas respectivas células do cumulus e em blastocistos produzidos a partir destes oócitos. Foram também avaliadas as taxas de clivagem e blastocisto e a cinética de desenvolvimento embrionário. No experimento 2, COC's foram recuperados através de sessões de aspiração folicular guiada por ultrassonografia ("Ovum Pick Up", OPU) de doadoras, utilizados para produção *in vitro* de embriões e os blastocistos produzidos foram transferidos para fêmeas receptoras. Nesse ensaio foram

avaliadas taxas de clivagem, blastocisto e prenhez e o perfil do início do desenvolvimento fetal dessas estruturas (diâmetro biparietal- DBP, diâmetro de vesícula embrionária- VES e comprimento crânio-caudal- CCC).

Os procedimentos seguiram as diretrizes éticas para experimentação animal e foram aprovados pelo Comitê local (CEUA / EGL-3956180316). Os reagentes utilizados foram da Sigma Chemical Co. (Missouri, EUA), caso contrário, são identificados por origem.

3.2. Sessões de OPU

Foram utilizadas doadoras de oócitos mestiças F1 Gir (*Bos taurus indicus*) X Holandês (*Bos taurus taurus*) ($326,75 \pm 26$ kg e $33,72 \pm 8,31$ meses), mantidas em pastagem de *Brachiaria Decumbens* com acesso *ad libitum* à água e suplementos minerais.

Os animais foram primeiramente submetidos à anestesia epidural (1,5 ml-cloridrato de lidocaína a 2%), entre a última vertebra lombar e primeira caudal, para posterior esvaziamento do reto e higienização da região perineal. O procedimento de aspiração folicular foi realizado com auxílio de um dispositivo transvaginal guiando a agulha e um transdutor microconvexo de 7,5 MHz acoplado a um equipamento de ultrassom (Mindray DP2200 VT).

Folículos entre 2 e 8 mm foram puncionados com agulhas 18G, e através de um sistema de vácuo (90 mmHg) foi coletado o fluido folicular de cada doadora em tubo de fundo cônico de 50ml contendo Dulbecco PBS suplementado com solução de heparina 50UI e 1% soro fetal bovino, a 37°C. O fluido foi filtrado e transferido para placas de Petri (100x20 mm) para rastreamento de COC's. Ao final da OPU, os COC's obtidos de todas as doadoras foram agrupados e separados de acordo com o perfil citoplasmático nos grupos CC e CG.

3.3. Ovários de abatedouro

Oócitos recuperados a partir de ovários de abatedouro foram transportados até o laboratório em garrafa térmica contendo solução de NaCl à 0,9% (34°-37°C) e processados em tempo não superior a 3 horas após o abate do animal.

Folículos de 2 a 8mm foram aspirados manualmente com auxílio de seringa de 20ml e agulha 21G. O fluido folicular recuperado foi transferido para tubo de fundo cônico de 50ml e mantido a 37,5°C até os oócitos serem rastreados. Após 10min do último folículo aspirado (tempo necessário para sedimentação das estruturas), 2ml do pellet foi recuperado e transferidos para placas de petri (100x20 mm) para seleção de COC's.

3.4. Seleção de oócitos

Complexos cumulus-oócitos de cada grupo foram selecionados nesse estudo morfolologicamente em estereomicroscópio da seguinte maneira:

- i. Grupo de oócitos com citoplasma controle (CC): COC's apresentando citoplasma evidentemente homogêneo, sem nenhum sinal de qualquer tipo de alteração como granulações e inclusões.
- ii. Grupo de oócitos com citoplasma granular (CG): COC's apresentando citoplasma com fortes granulações (mais de três grânulos com cerca de 15µm), sem sinais de degeneração (clareamento ou escurecimento excessivo do ooplasma).

Apenas o citoplasma foi considerado como variável morfológica. As células do cumulus foram padronizadas e selecionadas. Todos os COC's apresentavam mais de três camadas de células, não atresicas, fortemente aderidas ao oócito, sem sinais de expansão, apresentando forma arredondada, com perfeita integridade de zona pelúcida.

3.5. Níveis de caspase 3 ativa

Para análise do nível de caspase 3 ativa, os oócitos imaturos foram previamente desnudados (TrypLE Express, ThermoFisher, USA), fixados em solução de paraformaldeído a 4% a 37°C por 30 minutos e armazenados em PBS à 4°C. A imunofluorescência para identificar atividade da enzima caspase 3 foi previamente descrita (OLIVEIRA et al., 2016). Resumidamente, oócitos foram permeabilizados em solução de Triton X-100 a 0.5% durante 30 minutos à temperatura ambiente, lavados três vezes em PBS suplementado com Tween-20 a 0.2% (PBS-T) durante 10 minutos. O bloqueio de reações inespecíficas foi realizado por 30-60 minutos em BSA à 3% à temperatura ambiente. Incubação com anticorpo primário (Anti-caspase 3, coelho, 1: 750) foi realizada à 4°C, durante 12h. Os oócitos foram então lavados três vezes em PBS-T e incubados com anticorpo secundário (IgG de burro anti-coelho conjugado com Alexa Fluor 555, 1:400) durante 30-120 minutos à temperatura ambiente. Os oócitos foram examinados sob microscopia de fluorescência, com excitação 556 e comprimento de onda de 573 nm (Alexa Fluor 555).

Imagens de cada estrutura foram registradas e medidas quanto à intensidade de fluorescência (software ImageJ, NIH, EUA). Para tanto, as imagens foram primeiramente convertidas do formato RGB “red, green, blue”, para escala de cinza no formato compacto de 8bit. Após isso, foi selecionado a área descontando a zona pelúcida e a intensidade de fluorescência foi recuperada através da média dos valores de áreas cinzas do citoplasma.

3.6. Atividade das junções GAP

Junções GAP são membranas cilíndricas que conectam as células do cumulus umas a outras e aos oócitos. Essa conexão permite a transferência de substratos de baixo peso molecular (1000 Mr) entre as células. Para estimar os níveis das junções GAP entre oócitos e as células do cumulus, o corante Calceína-AM foi utilizado. Este corante não fluorescente se transfere das células do cumulus para os oócitos através das junções GAP. Uma vez dentro da célula esterases clivam o grupo acetoximetil, produzindo a calceína-A fluorescente,

incapaz de sair da célula através da membrana citoplasmática, e a intensidade média de fluorescência é quantificada (THOMAS; ARMSTRONG; GILCHRIST, 2004). Para isso, oócitos de cada grupo foram lavados em meio MIV contendo calceína (1 μ M) e em seguidas transferidos para gotas (MIV - calceína) e mantidos em estufa incubadora por 15 min (38.5°C, 5% CO₂ em ar atmosférico, com umidade máxima). Após isso, foram lavados por três vezes em meio MIV livre de calceína e retornados à estufa incubadora por 25 minutos. Os oócitos então foram desnudados (TrypLE Express) para remoção das células do cumulus e avaliados em microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse TS100, USA) em comprimento de onda de 496-516 nm. Imagens de cada estrutura foram capturadas e medidas para intensidade de fluorescência pelo software ImageJ (NIH, USA), na mesma metodologia aplicada para análises de caspase 3 ativa. E a intensidade média de fluorescência de cada grupo foi comparada.

3.7. Maturação *in vitro* (MIV)

Grupos de 20 oócitos foram cultivados em gotas de 100 μ l de TCM-199 suplementado com 10% de SFB, 1,0 μ g/ml de FSH (Folltropin TM, Bioniche Animal Health, Belleville, Canadá), 50 μ g/ml de gonadotrofina coriônica humana, hCG (Profasi TM, Serono, São Paulo, Brasil), 1,0 μ g/ml de estradiol, 16 μ g/ml de piruvato de sódio e 100 UI de penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomicina e cobertas com óleo mineral e cultivados por 24h em uma incubadora com 38,5 ° C, 5% de CO₂ no ar atmosférico e alta umidade.

3.8. Fertilização *in vitro* (FIV)

Após a MIV, a co-cultura de gametas foi realizada em grupos de 20 oócitos em 50 μ l de meio FERT-TALP suplementado com BSA a 0,6%, heparina 10 μ g/ml, penicilamina 18 μ M, hipotaurina 10 μ M e epinefrina 1,8 μ M. Palhetas congeladas de sêmen bovino (previamente testado) foram descongeladas a 36°C por 30 segundos, transferidas para gradiente de 45/90 Percoll e

centrifugadas a 3.600xg por 7 min. O sedimento (30µl) foi suspenso em 1 ml de meio FERT-TALP e centrifugado a 520xg durante 5 min. Após a centrifugação 20 µl de meio incluindo o pellet foi coletado do fundo do tubo, e homogeneizado em um tubo cônico. A suspensão foi ajustada para a concentração de 25×10^6 espermatozoides vivos por ml, e 4 µl desta foram distribuídos entre gotas de TALP-FIV contendo os oócitos, cobertas com óleo mineral por 18 horas em uma incubadora com 38,5 °C, 5% de CO₂ em ar atmosférico e alta umidade.

3.9. Cultivo *in vitro* (CIV)

Os prováveis zigotos foram pipetados vigorosamente e transferidos individualmente (experimento 1) para gotas de 6 µl ou em grupos de 20 estruturas (experimento 2) para gotas de 100 µl cobertas com óleo mineral. O meio de cultivo utilizado foi o SOF-AA suplementado com 1,5% de SFB e 6 mg/ml de BSA e o cultivo foi realizado por 7 dias a 38,5 C, 5% de CO₂ no ar atmosférico e umidade máxima. Após 96 hpi, foram adicionados 3 µl (experimento 1) de meio em cada gota individual ou o meio de cultivo foi parcialmente substituído, pela retirada de metade do volume e adição de 50 µl de meio na gota (experimento 2).

3.10. Avaliações do desenvolvimento embrionário

A taxa de clivagem foi avaliada 48hpi e a taxa de blastocistos foi estimada com base nos embriões clivados que evoluíram até o estágio de blastocisto em 168hpi. A cinética do desenvolvimento embrionário foi avaliada no experimento 1. Para isso, as estruturas foram avaliadas e monitoradas individualmente em quatro momentos (48hpi, 96hpi, 144hpi, 168hpi) e o número de células de cada estrutura foi registrado em cada momento.

A partir do estágio de 8 células, a contagem do número de blastômeros durante o desenvolvimento embrionário é pouca precisa em nosso sistema, por

esse motivo, embriões com mais de 8 células foram considerados com 14,6 células, mórulas com 30 células e blastocistos 101,1 células. Estes números foram previamente estabelecidos com base em embriões coletados, fixados e submetidos para coloração de núcleos (Hoechst), para contagem de células, sob as condições do mesmo laboratório no qual as amostras do nosso estudo foram produzidas (dados não publicados).

3.11. Diagnóstico de prenhez e desenvolvimento fetal

As vacas receptoras de embrião foram avaliadas 35 dias após a TE para determinar o estado da prenhez. Os exames do trato reprodutivo foram realizados por ultrassonografia transretal ou palpação retal. Análises fetais de diâmetro biparietal, diâmetro de vesícula embrionária e comprimento crânio-caudal realizadas por ultrassonografia transretal na frequência de 7,5 MHz e transdutor linear acoplado ao aparelho de ultrassom. Realizadas pelo mesmo técnico a cada 6 dias conforme descrito abaixo:

Diâmetro biparietal: Primeiramente foi identificado o maior corte longitudinal do embrião e a mensuração dos bordos dos ossos parietais foi recuperada.

Diâmetro de vesícula embrionária: Média entre mensurações entre os eixos horizontal e vertical desta estrutura utilizando os “calipers” para a sua demarcação do aparelho ultrassonográfico.

Comprimento crânio-caudal: Como a avaliação do diâmetro biparietal, primeiramente foi identificado o maior corte longitudinal do embrião, congelando posteriormente a imagem e recorrendo ao uso dos “calipers”, colocados em cada extremidade da massa embrionária (crânio e parte posterior do corpo).

As avaliações de VES e CCC começaram em 37 dias e terminaram em 55 dias de gestação. A avaliação da DBP iniciou-se aos 43 dias e terminou aos 91 dias de gestação.

3.12. Análise de expressão gênica

Os transcritos avaliados foram PPP2R1A, BMP15, UQCRH, MATER, ENY2, ZAR1, IGF2R. As sequências dos primers, o tamanho do fragmento, e a referência utilizada, estão listados na tabela 1. Para quantificação relativa dos transcritos, pools de 10 estruturas (oócitos desnudos, ou o pellet centrifugado de células do cumulus, ou blastocistos) foram depositados em microtubos de PCR de 0,2ml, imediatamente congelados e estocados em nitrogênio líquido.

Resumidamente, pools de 10 oócitos imaturos e desnudos com auxílio da enzima TrypLE Express foram utilizados. A suspensão de enzima com células do cumulus obtidas após pipetagem de pool de 10 COCs foi centrifugada por 7min a 3600xg. O sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi utilizado. Para quantificação gênica dos embriões, estruturas obtidas 168hpi após a fertilização foram utilizadas.

O RNA total foi extraído com o kit RNeasy Micro kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands), seguindo recomendações do fabricante e a eluição do mRNA extraído foi realizada com 14 μ l de água livre de RNase. Para produção de amostras de DNA complementar (10 μ l equivalentes a 7,2 estruturas- oócitos, blastocistos ou células do cumulus), as amostras de RNA foram submetidas à transcrição reversa usando o sistema de transcrição reversa ImProm-II (Promega, Madison, Wisconsin), de acordo com as recomendações do fabricante. Um volume final de 20 μ l (equivalente a 0,36 estrutura/ μ l) foi gerado.

A reação de qPCR foi realizada usando o Sistema de Detecção de Sequência ABI Prism 7300, sistema Foster City, CA, EUA (Applied Biosystems). O volume final de RT-cDNA de cada estrutura foi diluído em água livre de nucleases para uso nas reações de PCR. As reações foram realizadas em duplicata em um volume de 20 μ l usando uma mistura de 10 μ l de SYBR Green master mix (Applied Biosystems), 6 pmol de primers específicos, 7 μ l de água livre de nucleases e 1 μ l de cDNA, sendo o volume proporcional de 0,018 oócitos, 0,03 blastocistos ou 0,045 células do cumulus por reação.

Os resultados foram analisados utilizando o método da curva padrão e como expressão dos genes alvo em relação ao gene de referência endógena GAPDH, pois este gene é rotineiramente utilizado em estudos de expressão

gênica em oócitos (BIASE et al., 2014), células do cumulus (DIECI et al., 2016) e embriões (HAN et al., 2003) bovinos. A curva padrão de cada gene foi preparada por purificação do produto de reações RT-qPCR utilizando o kit de purificação de PCR QIAquick (Qiagen). As diluições variaram de 1 a 1:10 000, totalizando cinco pontos. Cinco pools foram avaliados de cada amostra (oócitos, cumulus e blastocistos) e de cada grupo (CC e CG).

Tabela 1. Sequência de primers (5' a 3'), tamanho do produto e referência dos genes analisados em oócitos, blastocistos e células do cumulus.

Gene	Sequência de primers (5' to 3')	Tamanho do produto (bp)	Referência
<i>PPP2R1A</i>	F: CCG CAG TCT TGA CAG GAA C R: GGA CCT GAA CAT CCT CGT TG	115	Design
<i>BMP15</i>	F: GGG TTC TAC GAC TCC GCT TC R: GGT TAC TTT CAG GCC CAT CAT	273	Bebbere et al. 2008
<i>UQCRH</i>	F: CGC CTC CGG ACA TGG GGC TA R: ACA GAG CTC GAG CCG CTC CC	114	Biase et al. 2012
<i>MATER</i>	F: CAG CCT CCA GGA GTT CTT TG R: GAC AGC CTA GGA GGG TTT CC	212	Bebbere et al. 2008
<i>ENY2</i>	F: GCG TGT GCT AGC TTT CTG TG R: GCT GAC GAC CGT TAC CTA CC	92	Biase et al. 2012
<i>ZAR1</i>	F: CAC TGC AAG GAC TGC AAT ATC R: CAG GTG ATA TCC TCC ACT C	137	Bebbere et al. 2008
<i>IGF2R</i>	F: CTA CGA CCT GAC CGA GTG R: TGA CAG CCT CCC AGT TG	95	Design
<i>GAPDH</i>	F: AAGGCCATCACCATCTTCCA R: CCACTACATACTCAGCACCAGCAT	99	Oliveira et al. 2013

Protein phosphatase 2 regulatory subunit alpha (PPP2R1A), Bone morphogenetic 15 (BMP15), Ubiquinol–cytochrome c reductase hinge (UQCRH), Maternal antigen that embryo requires (MATER), Transcription And Export Complex 2 Subunit (ENY2), Zygote arrest 1 (ZAR1), Insulin-like growth factor 2 receptor (IGF2R), Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase (GAPDH).

3.12. Análise estatística

Todas a análises estatísticas foram realizadas com 5% de nível de significância.

O Teste de Mann-Whitney foi utilizado para analisar os dados de atividade das junções GAP, índice de caspase 3 ativa e o índice de transcritos avaliados. O Teste-T foi aplicado para comparar as taxas de clivagem e de blastocisto. O Teste Exato de Fisher foi aplicado para Taxa de Prenhez. ANOVA de medidas repetidas foi utilizada para analisar os resultados das fetometrias (DBP, VES, CCC) e a cinética de desenvolvimento (ambos os dados foram analisados após transformação Box-Cox).

O Teste-T, Teste Exato de Fisher, e Teste de Mann-Whitney foram feitos no Software GraphPad Instat. ANOVA realizado no Software Minitab.

4. RESULTADOS

Imagens de estruturas classificadas para os grupos CC e CG estão presentes na Figura 1.

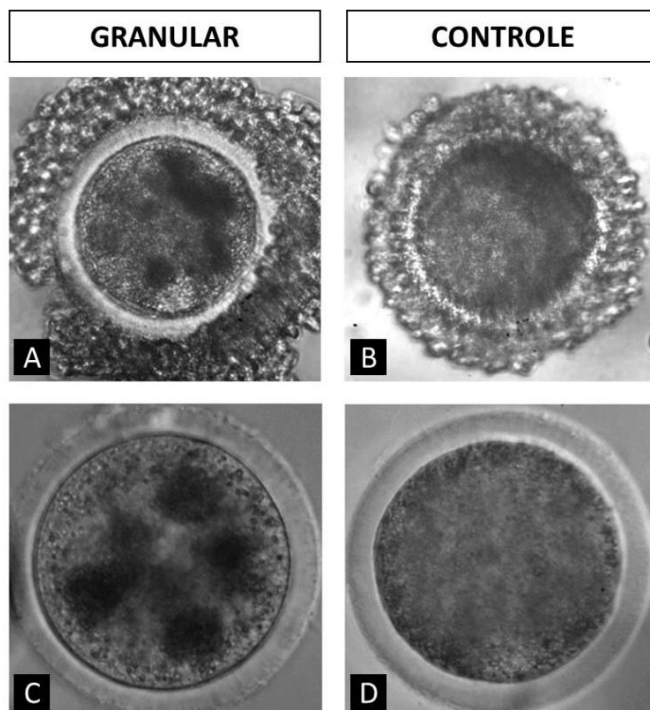


Figura 1. Óocitos bovinos apresentando grânulos citoplasmáticos. A imagem A, B, C e D em contraste de fase demonstra o perfil de oócitos selecionados para o grupo controle (A, B) e grupo citoplasma granular (C, D). *Barra de escala = 10 μ m.

4.1. Os níveis da enzima caspase 3 ativa são afetados pelo citoplasma granulado

Na análise de caspase 3 ativa (Figura 2. A, B e C), foram avaliados 21 oócitos no grupo citoplasma controle e 49 no grupo citoplasma granular, obtidos a partir de 2 repetições. Os níveis de caspase 3 ativa mostraram significativa incidência ($p < 0,0001$) no grupo citoplasma granular ($172,08 \pm 16,95$) quando comparado ao grupo citoplasma controle ($66,17 \pm 11,61$).

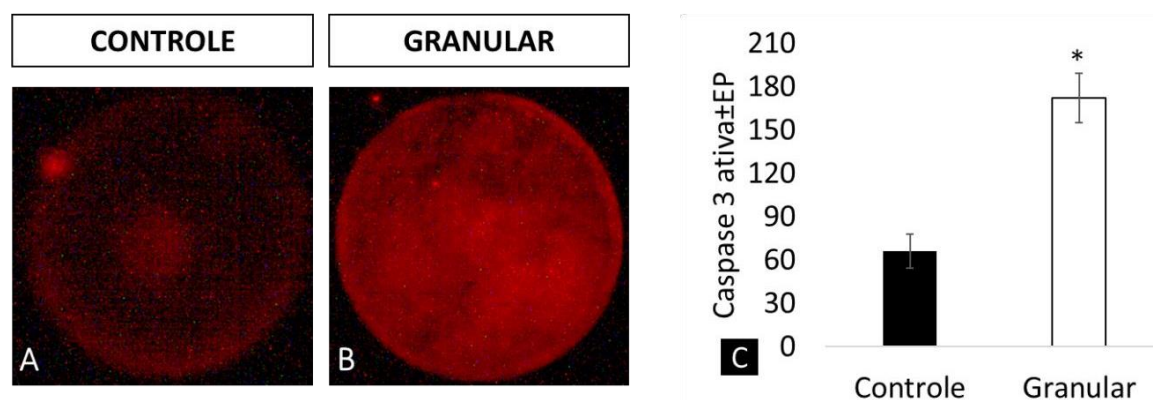


Figura 2. Índice de apoptose em oócitos com citoplasma controle (A) e granular (B), corados para identificar o índice de caspase 3 ativa avaliados sob microscopia de epifluorescência. Gráfico representativo (C) da análise e oócitos de ambos os grupos. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para analisar os níveis de caspase 3 ativa ($p < 0,05$).

4.2. A atividade das junções GAP não é afetada pelo citoplasma granulado

Na análise de atividade das junções GAP foram avaliados 38 oócitos no grupo citoplasma controle e 58 no grupo citoplasma granular, obtidos a partir de 2 repetições. A atividade das junções GAP mostrou-se similar entre os grupos (CC: $5,64 \pm 0,45$ vs CG: $6,29 \pm 0,29$), (Figura 3. A, B e C).

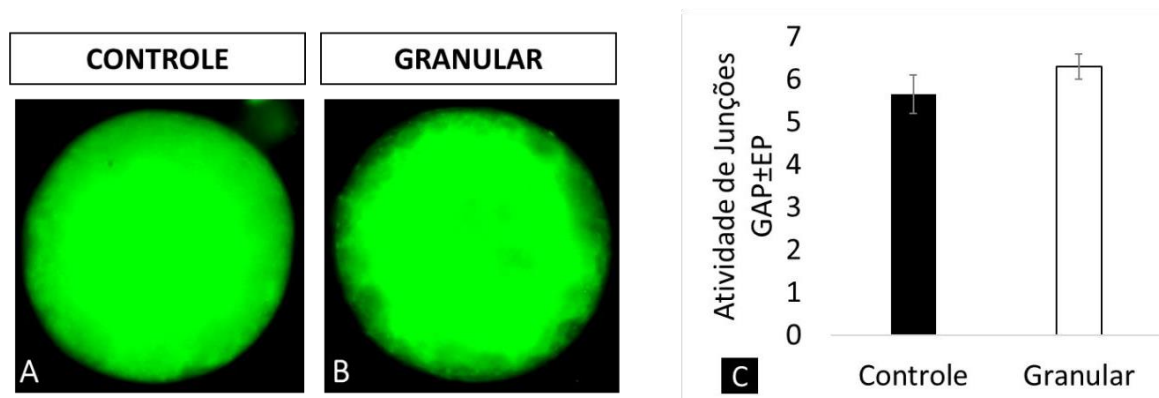


Figura 3. Atividade de junções GAP em oócitos com citoplasma controle (A) e granular (B), avaliados sob microscopia de epifluorescência. Gráfico representativo (C) da análise e oócitos de ambos os grupos. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para analisar os níveis de junções GAP ($p < 0,05$).

4.3. Expressão do transcrito ZAR1 é alterada em oócitos com citoplasma granular

Nos oócitos, os transcritos analisados foram ZAR1, MATER, PPP2R1A, UQCRH, ENY2 e IGF2R. A expressão do gene ZAR1 foi elevada em oócitos do grupo citoplasma controle (CC: $178,27 \pm 151,63$ vs CG: $0,89 \pm 0,89$, $p=0,0159$) (Figura 4. A). Outros genes não mostraram diferença entre os grupos (Figura 4. B, C, D, E, F). Nas células do cumulus, os genes analisados foram BMP15 e IGF2R. No entanto, nenhuma diferença na quantificação de cada transcrito foi detectada (Figura 5. A, B). Nos blastocistos, os genes analisados foram PPP2R1A, UQCRH, ENY2 e IGF2R e nenhum transcrito demonstrou diferença entre os grupos (Figura 6. A, B, C, D).

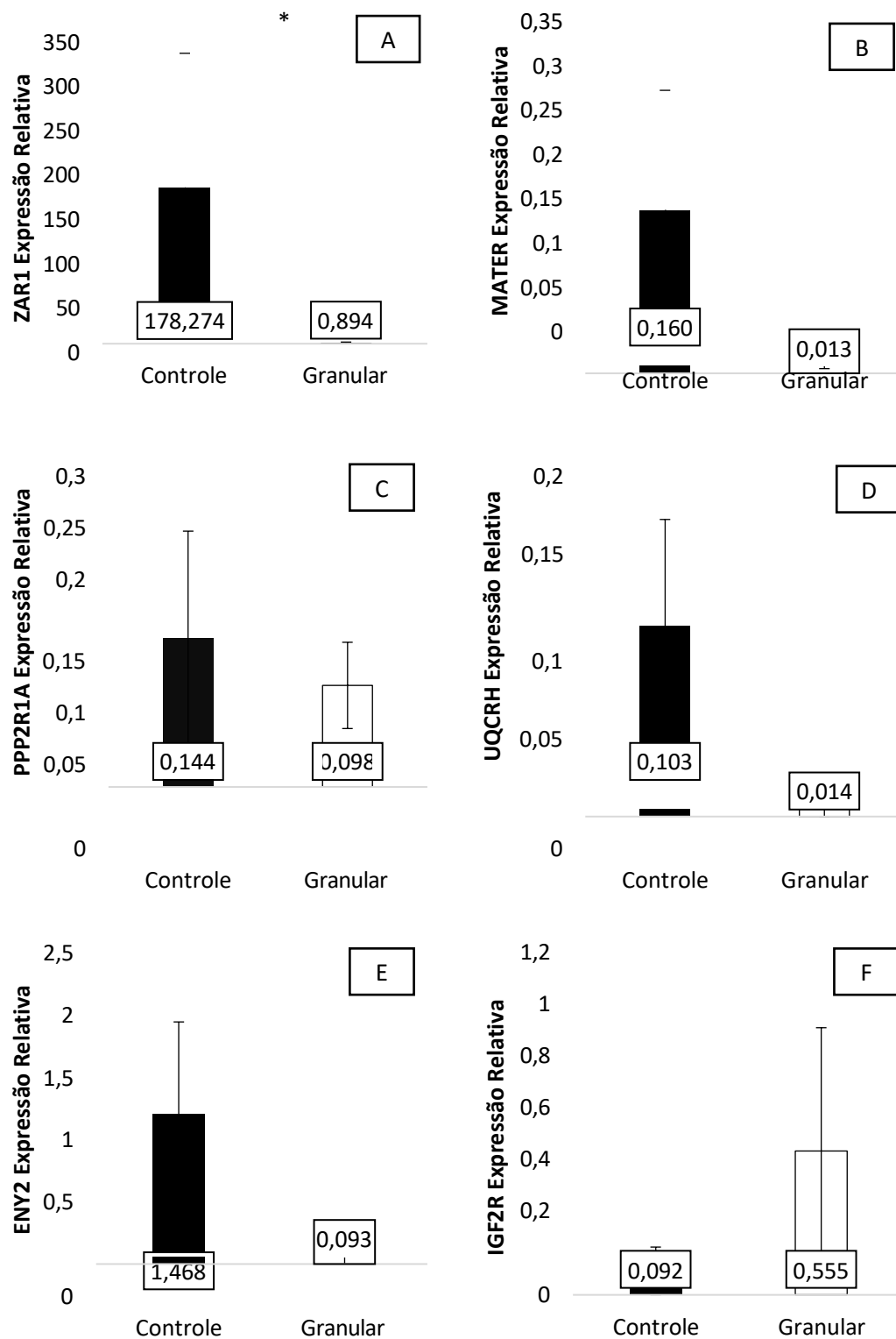


Figura 4. Expressão relativa de transcritos ZAR1 (A), MATER (B), PPP2R1A (C), UQCRH (D), ENY2 (E) e IGF2R (F) detectados em oócitos com citoplasma controle e granular. (*) Asterisco indica a diferença significativa entre os grupos analisados. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar a expressão dos genes entre grupos ($p < 0,05$).

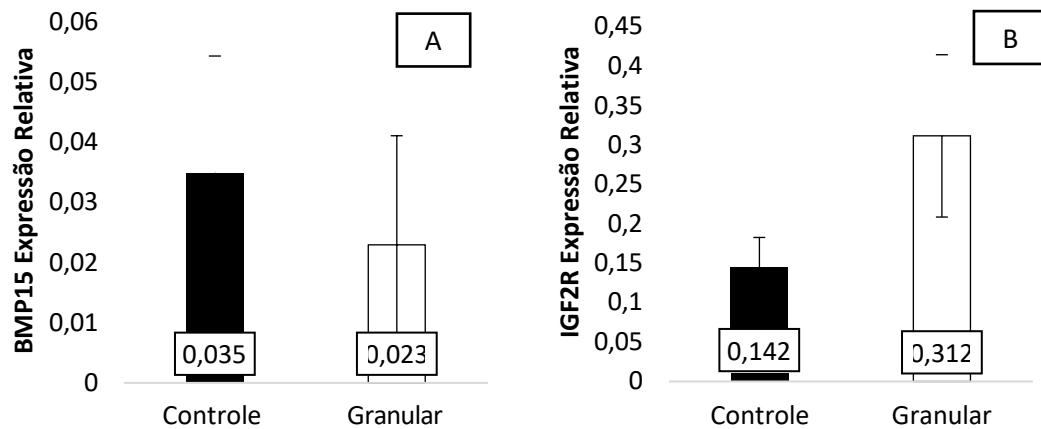


Figura 5. Expressão relativa de transcritos BMP15 (A) e IGF2R (B) detectados nas células do cumulus de oócitos com citoplasma granular. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar a expressão dos genes entre grupos ($p < 0,05$).

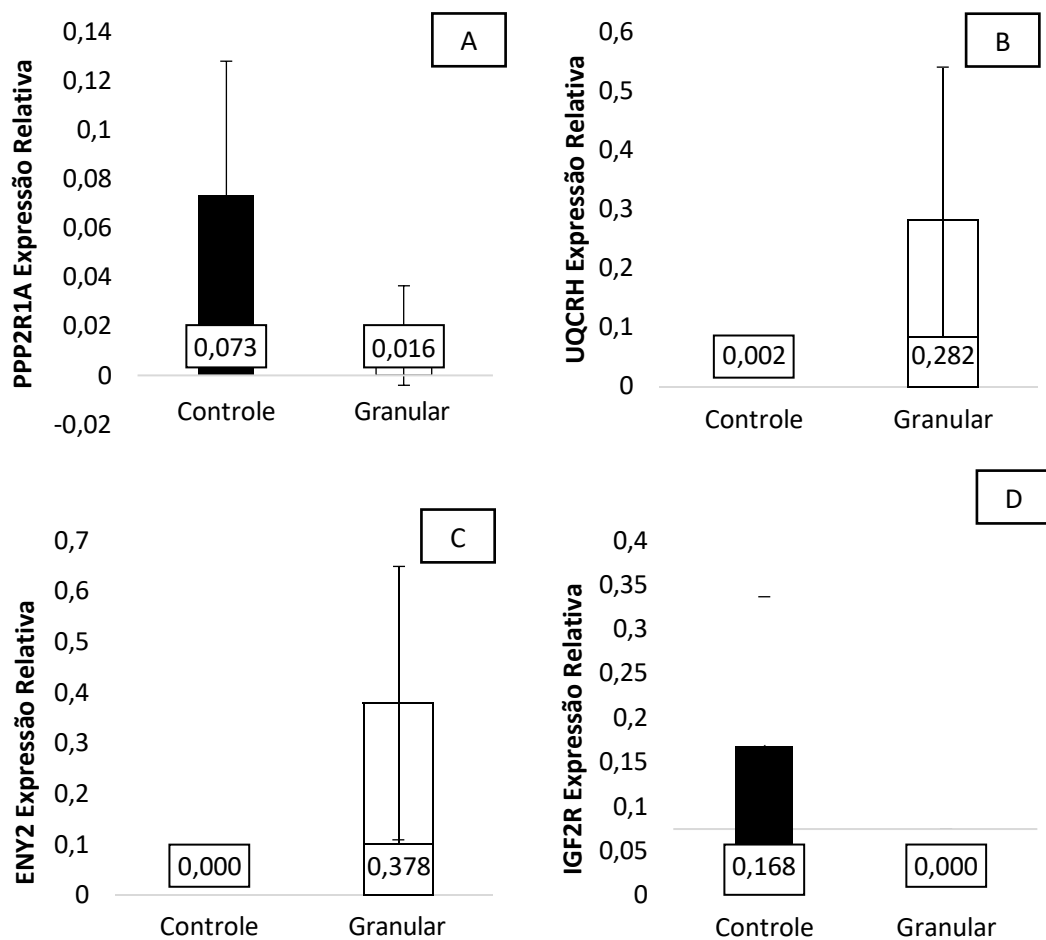


Figura 6. Expressão relativa de transcritos detectados em blastocistos obtidos a partir de oócitos com citoplasma granular. Blastocistos foram recuperados 168

hpi. A. PPP2R1A; B. UQCRH; C. ENY2; D. IGF2R. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar a expressão dos genes entre grupos ($p < 0,05$).

4.4. O citoplasma granular em oócitos não afeta as taxas de clivagem e blastocisto e prenhez.

Embriões produzidos a partir de oócitos com citoplasma granular e controle foram comparados quanto ao potencial de desenvolvimento pela taxa de clivagem, produção de blastocisto e prenhez. Para esta análise de taxas, os resultados obtidos com oócitos de matadouro (experimento 1) e aspiração folicular (experimento 2) serão apresentados nas Figuras 7 e 8 respectivamente

No experimento 1, os oócitos foram recuperados através de ovários de abatedouro. Foram analisadas 331 estruturas no grupo controle e 291 no grupo granular, obtidos de 6 repetições. A taxa de clivagem não diferiu entre o grupo citoplasma controle (CC: $59,52 \pm 7,21\%$) e o grupo citoplasma granular (CG: $59,79 \pm 6,1\%$) (Figura 7. A). Na taxa de blastocisto também não foi detectada diferença (CC: $29,28 \pm 4,14\%$ vs CG: $23,15 \pm 2,96\%$) (Figura 7. B).

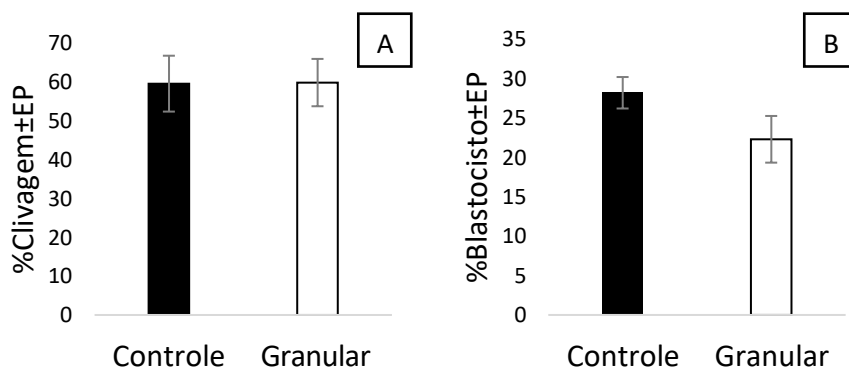


Figura 7. Taxas clivagem (A) e blastocisto (B) de oócitos com citoplasma controle e granular do experimento 1 (estruturas obtidas a partir de ovários de abatedouro). O teste T foi aplicado para comparar as taxas entre grupos ($p < 0,05$).

No Experimento 2, os oócitos foram recuperados através das sessões de OPU. Foram analisados 813 estruturas do grupo controle e 469 no grupo

granular, obtidas a partir de 6 repetições. Nenhuma diferença foi detectada na taxa de clivagem (CC: $68,88 \pm 4,82\%$ vs G: $74,41 \pm 5,89\%$), nem na taxa de blastocisto (CC: $21,11 \pm 3,28\%$ vs CG: $21,02 \pm 6,08\%$). Foram avaliadas 60 transferências embrionárias no grupo controle e 30 no grupo de citoplasma granular, obtidos de 5 repetições. A mesma capacidade de implantação (CC: $24,27 \pm 9,70\%$ vs CG: $26,31 \pm 7,23\%$), (Figura 8. A, B, C) também foi observada.

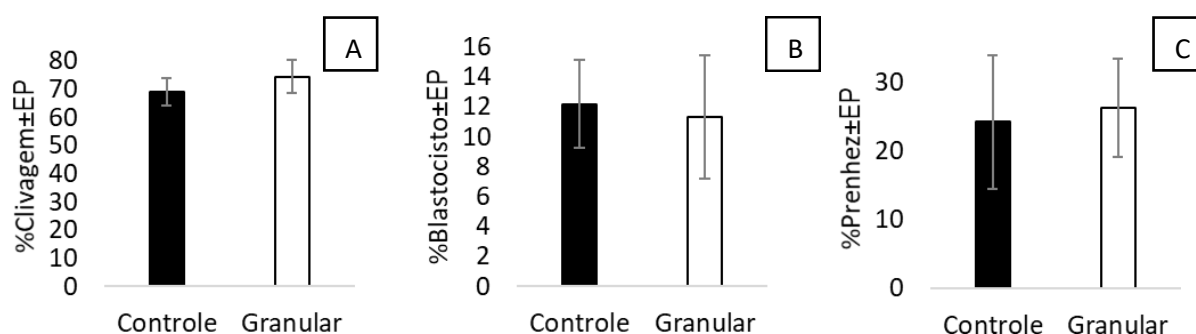


Figura 8. Taxas de clivagem (A), blastocisto (B) e prenhez (C) de oócitos com citoplasma controle e granular do experimento 2 (estruturas obtidas de ovários de aspiração folicular de doadoras). O teste T foi aplicado para comparar as taxas de clivagem e blastocisto e o teste exato de Fisher para a taxa de prenhez ($p < 0,05$).

4.5. A cinética do desenvolvimento embrionário é semelhante entre os oócitos controle e granular

O número de células em cada embrião foi registrado em quatro momentos (48hpi, 96hpi, 144hpi e 168hpi). Essa análise revela o número média de células de todas as estruturas encontradas em cada avaliação, assim estima o momento no qual existe diferenças na cinética de desenvolvimento entre os grupos. (Oliveira et al., 2019). Nenhum dos momentos analisados mostrou diferença (48hpi- CC: $5,50 \pm 0,18$ vs CG: $5,70 \pm 0,18$; 96hpi- CC: $11,50 \pm 0,57$ vs CG: $11,70 \pm 0,64$; 144hpi- CC: $22,80 \pm 1,33$ vs CG: $21,80 \pm 1,39$; 168hpi - CC: $38,30 \pm 2,73$ vs CG: $37,00 \pm 2,97$).

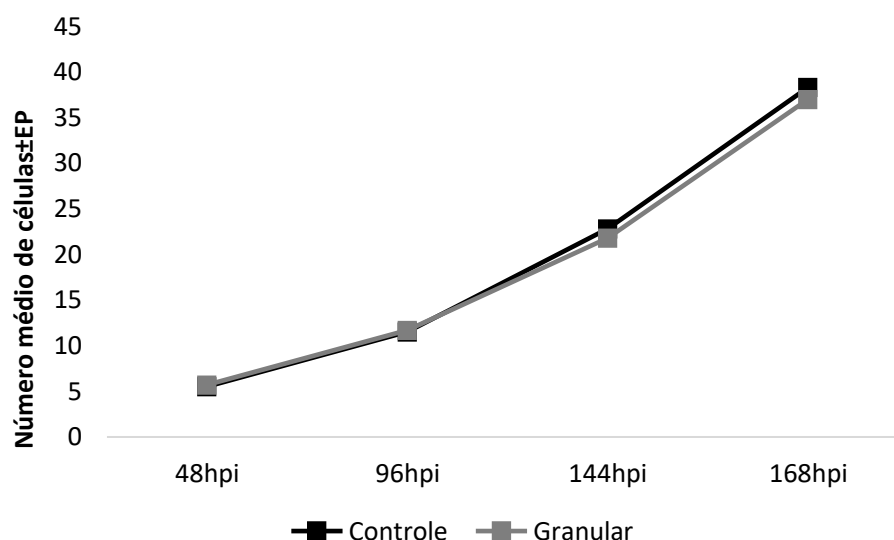


Figura 9. Análise da cinética de desenvolvimento de embriões produzidos a partir de oócitos com citoplasma granular. As estruturas foram cultivadas em gotas separadamente. Portanto, este método permite avaliações individuais do dia 1 ao dia 7. Foram avaliados quatro momentos da cultura *in vitro* (48hpi, 96hpi, 144hpi, 168hpi). ANOVA de medidas repetidas ($p < 0,05$).

4.6. O perfil citoplasmático granular não altera o desenvolvimento fetal

Os blastocistos transferidos (8 do grupo citoplasma controle e 5 do grupo citoplasma granular) foram monitorados semanalmente através de fetometrias (parâmetros DBP, VES e CCC) para entender se as alterações morfológicas também são detectadas no desenvolvimento embrionário e fetal. Nessas análises, não foram detectadas diferenças em nenhum dos momentos avaliados, para nenhum dos parâmetros, conforme descrito na tabela 2 (A- DBP, B-VES, C-CCC).

Tabela 2. Comparação entre as médias de DBP, VES e CCC obtidos conceptos bovinos oriundos de oócitos dos grupos de citoplasma controle e citoplasma granular.

Dias de gestação (mm)											
A	DBP	37	43	49	55	61	67	73	79	85	91
	Controle	-	8.4	10.3	12.1	14.3	17.4	19.7	22.6	25.7	28.6
	Granular	-	8.5	11.3	12.6	14.3	17.8	19.8	22.7	26.2	29.6
B	VES										
	Controle	14.3	20.7	28.9	37						
	Granular	14.6	21.8	29.9	38.6						
C	CCC										
	Controle	16	23.3	31.4	46.3						
	Granular	17	24.1	33.9	47.2						

Os embriões foram avaliados semanalmente durante o primeiro trimestre da gestação. Linha A. Representa o diâmetro biparietal (DBP). Linha B. Representa o diâmetro da vesícula embrionária (VES). Linha C. Representa o comprimento crânio-caudal (CCC) de acordo com cada grupo. Oócitos do citoplasma granular (CG) vs oócitos do citoplasma de controle (CC).

5. DISCUSSÃO

O objetivo principal deste trabalho foi compreender e explorar diferenças em parâmetros funcionais entre oócitos com modelo de citoplasma desejável (controle) e oócitos com apresentação de citoplasma granular, que normalmente seriam considerados não-viáveis para a produção *in vitro* de embriões e descartados.

Cerca de 70% a 80% dos oócitos imaturos recuperados para utilizar nas TRA na medicina humana possuem determinada anormalidade citoplasmática (ASHRAFI et al., 2015; FARAMARZI; KHALILI; ASHOURZADEH, 2017). Em bovinos, dados não publicados do Laboratório de Reprodução Animal do Campo Experimental Santa Mônica, da Embrapa Gado de Leite, revelam que cerca de 30% dos oócitos recuperados nas sessões de OPU apresentam grânulos citoplasmáticos e por isso são rejeitados na análise morfológica no momento da

seleção, e esse número pode ser ainda maior em determinadas raças ou condições climáticas desafiadoras. Por isso, existe grande importância em compreender e dissecar efeitos de grânulos no citoplasma no desenvolvimento embrionário.

Nesse contexto, o modelo bovino surge como um excelente meio de esclarecer os pontos ainda não completamente compreendidos, que cercam a morfologia e qualidade de oócitos, visto as restrições éticas no uso de material biológico humano, e, por conseguinte o limitado acesso a amostras. Além das semelhanças com a fisiologia reprodutiva, e processos da oogênese/embriogênese humana, bem como similaridades na duração da foliculogênese, ovulação, ativação do genoma após alguns ciclos de desenvolvimento, semelhante conteúdo lipídico e metabolismo embrionário (LANGBEEN et al., 2015), a oferta facilitada e irrestrita a ovários de abatedouros propiciam a utilização do modelo bovino a pesquisa.

Este estudo reporta o impacto de uma forma de dimorfismo citoplasmático de oócitos, o citoplasma granular, em delineamento sem alterações de células do cumulus, que se apresentavam íntegras e padronizadas, sem alterações morfológicas aparentes, em ambos os grupos. A vantagem desse desenho experimental justifica-se pois grande maioria dos dados que envolvem a caracterização de COC's, avalia o perfil citoplasmático associado ao número de camadas e expansão do cumulus (Patel *et al.* 2007, Souza-Cácares *et al.* 2019). Dessa maneira, vale ressaltar, que os resultados encontrados neste trabalho expressam isoladamente os efeitos de alterações citoplasmática, um pool de estruturas comumente não exploradas, devido à metodologia de análise morfológica global nas tecnologias de reprodução bovina.

Uma revisão sistemática a respeito do valor preditivo da morfologia oocitária na fertilização *in vitro* humana, descreveu que denominações para dimorfismos citoplasmáticos são confusas o que dificulta a análise e discussão dos resultados (RIENZI; VAJTA; UBALDI, 2011). Nesse estudo, estudamos a forma de dimorfismo citoplasmático, descrita como grânulos citoplasmáticos, e o grupo citoplasma granular foi caracterizado por COCs apresentando três ou mais grânulos difusos no ooplasma, com cerca de 15µm.

Nossos resultados demonstraram que o desenvolvimento embrionário (taxa de clivagem e taxa de blastocisto) não é afetado pela presença de grânulos citoplasmáticos (CC vs CG). A influência causada por alterações na integridade do citoplasma é controversa, ou seja, resultados similares no qual grânulos não implicaram em falhas na progressão celular foram já foram descritas em estudos com embriões de humanos que apresentaram anormalidades citoplasmáticas, englobando presença de grânulos, escurecimento citoplasmático ou até corpos refratários (YAKIN et al., 2007; QASSEM et al., 2015). Por outro lado, resultados que demonstram que alterações como granulações e vacúolos (WILDING et al., 2007; YU et al., 2015b; FARAMARZI; KHALILI; ASHOURZADEH, 2017) alteram a fertilização, padrão de clivagem e até qualidade de embriões.

Os resultados encontrados no presente estudo também demonstraram que a cinética de desenvolvimento e padrão de clivagem para formação de blastocisto foi similar entre os grupos. A velocidade de desenvolvimento é uma análise esclarecedora, pois permite através do perfil de progressão embrionário estimar o sucesso em atingir o estágio de blastocisto (OLIVEIRA et al., 2019). Além disso, detectamos que granulações citoplasmáticas não influenciam o potencial de implantação (taxa de prenhez), o desenvolvimento embrionário fetal. Embora a mortalidade embrionária precoce seja mais incidente (DISKIN et al., 2016), a perda embrionária tardia e abortos são responsáveis por grandes perdas econômicas para produtores. Sendo assim, análises do desenvolvimento embrionário tardio constata a fração final do impacto econômico com falhas na técnica de produção *in vitro*. Por isso justifica a necessidade e relevância em ser melhor investigada.

Analisando os resultados relacionados ao perfil funcional obtidos neste estudo, o conteúdo dessas granulações é um fator a ser considerado. Os grânulos citoplasmáticos comumente relatados podem ser corpos refratários, incorporações escuras, fragmentos, manchas, granulosos densos; gotículas lipídicas; lipofuscina e até mesmo aglomerados de retículo endoplasmático liso (RIENZI; VAJTA; UBALDI, 2011). Um resultado interessante foi a associação entre essas alterações morfológicas e o aumento nos níveis de caspase 3 ativa, uma enzima efetora da cascata de apoptose. O processo de apoptose desempenha um importante papel para a eliminação da grande maioria das

células germinativas em todos os estágios da oogênese (TIWARI et al., 2015), mas também está relacionado ao impedimento de que fatores deletérios contribuam para o progresso do oócito, como agregados de retículo endoplasmático liso ou outros (ASHRAFI et al., 2015). Esta função, de mediação de agregados citoplasmáticos, parece esclarecer os altos níveis em oócitos com citoplasma granular, desta forma mesmo apresentando maiores índices de iniciadores da cascata de apoptose, o limiar necessário para desencadear o processo completo de morte celular não foi atingido.

Conforme esperado, a atividade das junções de comunicação célula- oócito (Junções GAP) foi similar entre os oócitos de citoplasma granular e controle. A comunicação entre oócitos e células do cumulus é uma importante via de transferência de moléculas e substratos (THOMAS; ARMSTRONG; GILCHRIST, 2004). A manutenção da comunicação entre essas células é fundamental para transferência de moduladores do processo de retomada mitose (RUSSELL et al., 2016). Por isso, a integridade das células do cumulus foi criteriosamente avaliada e padronizada no momento de seleção dos oócitos, o que corrobora com os resultados de atividade das junções GAP encontrados.

Quando avaliamos o perfil de expressão gênica em oócitos, células da granulosa e blastocistos, o principal resultado foi a expressão relativa um gene de efeito materno em oócitos granulares. A abundância do transcrito ZAR1 em oócitos de citoplasma granular foi reduzida quando comparada a oócitos de citoplasma controle. ZAR1 e MATER foram os dois genes de efeito materno (TONG et al., 2000) analisados nesse estudo. Esses transcritos são conhecidos por apresentar expressão similar (THÉLIE et al., 2007; BEBBERE et al., 2008) e são bem caracterizados por desempenharem um papel importante no desenvolvimento embrionário inicial, principalmente nos eventos que desencadeiam a ativação do genoma embrionário (PENNETIER et al., 2004, 2006).

No presente estudo, apesar da baixa abundância do transcrito ZAR1 detectado no grupo de citoplasma granular, nenhuma diferença no potencial de desenvolvimento embrionário (taxa de clivagem e produção de blastocisto) foi observada. Dessa forma, foi caracterizada uma alteração importante no grupo citoplasma granular, mas que não foi suficiente para ocasionar prejuízos ao

desenvolvimento. Os níveis de transcritos isoladamente (para um gene específico) apresentam variações e o limite de cada variação para significância funcional é difícil de ser estabelecido e interpretado. Em outras palavras, como vemos neste estudo, a alteração nos níveis de um gene importante para o desenvolvimento não necessariamente ocasiona danos.

Dados acerca da expressão embrionária do gene ZAR1 demonstram que em bovinos a expressão não está limitada apenas em oócitos, como em camundongos (WU et al., 2003). O aumento da detecção de transcritos por volta do estágio de 4 células em embriões bovinos é relatada (BREVINI et al., 2004). O que pode explicar a razão de que apesar do transcrito ZAR1 ter sido diferencialmente expresso no grupo de citoplasma granular, essa alteração não foi capaz de afetar o potencial de desenvolvimento embrionário. Essas evidências, sugerem possíveis mecanismos de compensação transcricional, sob a hipótese que em oócitos granulares, estes transcritos uma vez acumulados durante a oogênese, mesmo em baixos índices, a habilidade do embrião de expressar corretamente o gene, pode ser independente da quantidade dos transcrito maternos herdados.

Outros transcritos (PPP2R1A, UQCRH, IGF2R e ENY2) foram analisados quanto ao seu perfil de expressão tanto em oócitos quanto em embriões. O principal objetivo deste recurso foi entender se o papel do gene altera mesmo após a ativação do genoma embrionário (AGE), quando os transcritos maternos acumulados durante a oogênese se esgotam (BADR et al., 2007; FAIR, 2010). Os genes não foram afetados pelo citoplasma granular e estão relacionados a processos como: 1. Retomada da meiose em oócitos (PPP2R1A) (HU et al., 2014; YU et al., 2015a; LIU et al., 2016), 2. Respiração mitocondrial (UQCRH) (PARK et al., 2017), 3. Crescimento fetal (IGF2R) (YOUNG L, FERNANDES K, MCEVOY TG, BUTTERWITH SC, GUTIERREZ CG, CAROLAN C, BROADBENT PJ, ROBINSON JJ, WILMUT I, 2001) e 4. Regulação de ativação da transcrição (ENY2) (GALÁN; RODRÍGUEZ-NAVARRO, 2012). Também avaliamos a expressão de BMP15 e IGF2R em células da granulosa extraídas dos oócitos obtidos de cada grupo experimental. BMP15 é um gene relacionado à proliferação celular, expansão e manutenção da apoptose das células do

cumulus, e nenhuma diferença em sua expressão relativa foi detectada. (HUSSEIN, 2005).

É interessante notar que as análises funcionais indiretamente correlacionadas com vias possivelmente ativadas pelos transcritos analisados (capacidade de fertilização-retomada da meiose e expansão das células do cumulus, fetometrias-crescimento fetal) corroboram com os níveis de expressão detectados dos genes analisados. Em outros termos, da mesma maneira que não há alteração a nível transcricional, não há alteração nos mecanismos funcionais acionados pelos transcritos analisados.

6. CONCLUSÃO

Os resultados sustentam a hipótese de que oócitos que apresentam grânulos no citoplasma possuem expressão alterada de ZAR1 e níveis aumentados da enzima caspase 3 ativa. No entanto, estas alterações não afetaram o desenvolvimento embrionário pré ou pós implantacional, sugerindo que estas estruturas são competentes e podem ser utilizadas na rotina de produção *in vitro* de embriões bovinos. Além disso, conclui-se que a avaliação morfológica de qualidade citoplasmática em estereoscópio no momento da seleção de oócitos não reflete a competência oocitária em bovinos.

7. REFERÊNCIAS

- ACEVEDO, N. and G. D. S. Oocyte-specific gene signaling and its regulation of mammalian reproductive potential. **Frontiers in Bioscience**, v. 10, p. 2335–2345, 2005.
- ARITRO SEN, F. C. Oocyte Maturation: A story of arrest and release. **Frontiers in Bioscience**, n. 5, p. 451–477, 2013.
- ASHRAFI, M.; KARIMIAN, L.; EFTEKHARI-YAZDI, P.; HASANI, F.;

- ARABIPOOR, A.; BAHMANABADI, A.; AKHOND, M. R. Effect of oocyte dysmorphisms on intracytoplasmic sperm injection cycle outcomes in normal ovarian responders. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 41, n. 12, p. 1912–1920, 2015.
- BADR, H.; BONGIONI, G.; ABDOON, A. S. S.; KANDIL, O.; PUGLISI, R. Gene expression in the in vitro- produced preimplantation bovine embryos . **Zygote**, v. 15, n. 4, p. 355–367, 2007.
- BALABAN, B.; ATA, B.; ISIKLAR, A.; YAKIN, K.; URMAN, B. Severe cytoplasmic abnormalities of the oocyte decrease cryosurvival and subsequent embryonic development of cryopreserved embryos. **Human Reproduction**, v. 23, n. 8, p. 1778–1785, 2008.
- BARFIELD, J. Evaluation of in vitro-produced bovine embryos. **CETA/ACTE & AETA Joint Convention**, p. 8p., 2015.
- BEBBERE, D.; BOGLIOLO, L.; ARIU, F.; FOIS, S.; LEONI, G. G.; TORE, S.; SUCCU, S.; BERLINGUER, F.; NAITANA, S.; LEDDA, S. Expression pattern of zygote arrest 1 (ZAR1), maternal antigen that embryo requires (MATER), growth differentiation factor 9 (GDF9) and bone morphogenetic protein 15 (BMP15) genes in ovine oocytes and in vitro-produced preimplantation embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, n. 8, p. 908, 2008.
- BIASE, F. H.; EVERTS, R. E.; OLIVEIRA, R.; SANTOS-BIASE, W. K. F.; FONSECA MERIGHE, G. K.; SMITH, L. C.; MARTELLI, L.; LEWIN, H.; MEIRELLES, F. V. Messenger RNAs in metaphase II oocytes correlate with successful embryo development to the blastocyst stage. **Zygote**, v. 22, n. 1, p. 69–79, 2014.
- BOUQUET, A.; JUGA, J. Integrating genomic selection into dairy cattle breeding programmes: A review. **Animal**, v. 7, n. 5, p. 705–713, 2013.
- BREVINI, T. A. L.; CILLO, F.; COLLEONI, S.; LAZZARI, G.; GALLI, C.; GANDOLFI, F. Expression pattern of the maternal factor zygote arrest 1 (Zar1) in bovine tissues, oocytes, and embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 69, n. 4, p. 375–380, 2004.
- CHAVES, R.; DUARTE, A.; MATOS, M.; FIGUEIREDO, J. Sistemas de cultivo

in vitro para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos Systems in vitro development of immature oocytes of mammals. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v. 34, n. 1, p. 37–49, 2010.

DE LOOS, F.; VAN VLIET, C.; VAN MAURIK, P.; KRUIP, T. A. M. Morphology of immature bovine oocytes. **Gamete Research**, v. 24, n. 2, p. 197–204, 1989.

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 bovine embryo production. **MHR: Basic science of reproductive medicine**, p. 1–16, 2016.

DISKIN, M. G. A.; WATERS, S. M. B.; PARR, M. H. B.; KENNY, D. A. B. Pregnancy losses in cattle : potential for improvement. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, n. 1988, p. 83–93, 2016.

EBNER, T.; MOSER, M.; TEWS, G. Is oocyte morphology prognostic of embryo developmental potential after ICSI? **Reproductive BioMedicine Online**, v. 12, n. 4, p. 507–512, 2006.

FAIR, T. Mammalian oocyte development : checkpoints for competence. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, p. 13–20, 2010.

FARAMARZI, A.; KHALILI, M. A.; ASHOURZADEH, S. Oocyte morphology and embryo morphokinetics in an intra-cytoplasmic sperm injection programme. Is there a relationship? **Zygote**, v. 25, n. 02, p. 190–196, 2017.

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 modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71, n. 5, p. 836–848, 2009.

GALÁN, A.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, S. Sus1/ENY2: A multitasking protein in eukaryotic gene expression. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 47, n. 6, p. 556–568, 2012.

GE, W.; LIU, J.-C.; DYCE, P. W.; KLINGER, F. G.; WANG, J.-J.; SHEN, W.; DE FELICI, M. Complete in vitro oogenesis: retrospects and prospects. **Cell Death and Differentiation**, v. 24, n. 11, p. 1845–1852, 2017.

GOTTARDI, F.; MINGOTI, G. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, n. 2, p. 82–94, 2009.

HAN, D.; SONG, S.; UHUM, S. J.; DO, J.; KIM, N.; LEE, H. T. Expression of IGF2 and IGF receptor mRNA in bovine nuclear transferred embryos. **Zygote**, v. 11, p. 245–252, 2003.

HENRIQUE, J.; VIANA, M. Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. v. 84, p. 1–12, 2004.

HOELKER, M.; HELD, E.; SALILEW-WONDIM, D.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Molecular signatures of bovine embryo developmental competence. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, n. 1, p. 22–36, 2014.

HU, M.-W.; WANG, Z.-B.; JIANG, Z.-Z.; QI, S.-T.; HUANG, L.; LIANG, Q.-X.; SCHATTE, H.; SUN, Q.-Y. Scaffold Subunit Aalpha of PP2A Is Essential for Female Meiosis and Fertility in Mice¹. **Biology of Reproduction**, v. 91, n. 1, p. 1–10, 2014.

HUSSEIN, T. S. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. 22, p. 5257–5268, 2005.

JIAO, Z. X.; XU, M.; WOODRUFF, T. K. Age-associated alteration of oocyte-specific gene expression in polar bodies: Potential markers of oocyte competence. **Fertility and Sterility**, v. 98, n. 2, p. 480–486, 2012.

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

LANGBEEN, A.; DE, H. F. M.; BARTHOLOMEUS, E.; LEROY, J. L. M. R.; BOLS, E. J. Bovine in vitro reproduction models can contribute to the development of (female) fertility preservation strategies. **Theriogenology**, v. 9, n. 84, p. 477–489, 2015.

LI, R.; ALBERTINI, D. F. The road to maturation: Somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 14, n. 3, p. 141–152, 2013.

LIU, Q.; LI, Y.; FENG, Y.; LIU, C.; MA, J.; LI, Y.; XIANG, H.; JI, Y.; CAO, Y.; TONG, X.; XUE, Z. Single-cell analysis of differences in transcriptomic profiles of oocytes and cumulus cells at GV, MI, MII stages from PCOS patients. **Scientific Reports**, v. 6, n. November, p. 1–12, 2016.

LONERGAN, P.; DINNYES, A.; FAIR, T.; YANG, X.; BOLAND, M. Bovine Oocyte and Embryo Development Following Meiotic Inhibition With Butyrolactone I. **Molecular Reproduction and Development**, v. 209, n. March, p. 204–209, 2000.

LONERGAN, P.; FAIR, T. In vitro-produced bovine embryos-Dealing with the warts. **Theriogenology**, v. 69, n. 1, p. 17–22, 2008.

LONERGAN, P.; FAIR, T. Maturation of Oocytes in Vitro. **Annu. Rev. Anim. Biosci**, n. October, p. 1–14, 2015.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; FAIR, T.; BOLAND, M. P. Oocyte and embryo quality: Effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, n. 4, p. 259–267, 2003.

MATCHING, T.; TEST, R. Production and Culture of the Bovine Embryo. **Comparative Embryo Culture: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**, v. 2006, n. 8, p. 162–173, 2001.

MAZZONE, S.; BORINI, A.; SERRAO, L.; COTICCHIO, G.; SERENI, E.; IADAROLA, I. What Criteria for the Definition of Oocyte Quality? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1034, n. 1, p. 132–144, 2005.

O'SHEA, L. C.; MEHTA, J.; LONERGAN, P.; HENSEY, C.; FAIR, T. Developmental competence in oocytes and cumulus cells: Candidate genes and networks. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 58, n. 2, p. 88–101, 2012.

OLIVEIRA, C. S.; DE BARROS, B. A. F.; MONTEIRO, C. A. S.; ROSA, P. M.

S.; LEAL, G. R.; SERAPIÃO, R. V.; CAMARGO, L. S. A. Individual assessment of bovine embryo development using a homemade chamber reveals kinetic patterns of success and failure to reach blastocyst stage. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 0, n. 0, p. 1–11, 2019.

OLIVEIRA, C. S.; SARAIVA, N. Z.; DE LIMA, M. R.; OLIVEIRA, L. Z.; SERAPIÃO, R. V.; GARCIA, J. M.; BORGES, C. A. V.; CAMARGO, L. S. A. Cell death is involved in sexual dimorphism during preimplantation development. **Mechanisms of Development**, v. 139, p. 42–50, 2016.

PARK, E. R.; KIM, S. B.; LEE, J. S.; KIM, Y. H.; LEE, D. H.; CHO, E. H.; PARK, S. H.; HAN, C. J.; KIM, B. Y.; CHOI, D. W.; YOO, Y. Do; YU, A.; LEE, J. W.; JANG, J. J.; PARK, Y. N.; SUH, K. S.; LEE, K. H. The mitochondrial hinge protein, UQCRH, is a novel prognostic factor for hepatocellular carcinoma. **Cancer Medicine**, v. 6, n. 4, p. 749–760, 2017.

PATEL, O. V.; BETTEGOWDA, A.; IRELAND, J. J.; COUSSENS, P. M.; LONERGAN, P.; SMITH, G. W. Functional genomics studies of oocyte competence: Evidence that reduced transcript abundance for follistatin is associated with poor developmental competence of bovine oocytes. **Reproduction**, v. 133, n. 1, p. 95–106, 2007.

PENNETIER, S.; PERREAU, C.; UZBEKOVA, S.; THÉLIE, A.; DELALEU, B.; MERMILLOD, P.; DALBIÈS-TRAN, R. MATER protein expression and intracellular localization throughout folliculogenesis and preimplantation embryo development in the bovine. **BMC Developmental Biology**, v. 6, p. 1–9, 2006.

PENNETIER, S.; UZBEKOVA, S.; PERREAU, C.; PAPILLIER, P.; MERMILLOD, P.; DALBIÈS-TRAN, R. Spatio-Temporal Expression of the Germ Cell Marker Genes MATER, ZAR1, GDF9, BMP15, and VASA in Adult Bovine Tissues, Oocytes, and Preimplantation Embryos. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 4, p. 1359–1366, 2004.

PONTES, J. H. F.; SILVA, K. C. F.; BASSO, A. C.; RIGO, A. G.; FERREIRA, C. R.; SANTOS, G. M. G.; SANCHES, B. V.; PORCIONATO, J. P. F.; VIEIRA, P. H. S.; FAIFER, F. S.; STERZA, F. A. M.; SCHENK, J. L.; SENEDA, M. M. Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*,

Bos indicus, and indicus-aurus dairy cows using sexed sperm.

Theriogenology, v. 74, n. 8, p. 1349–1355, 2010.

PRESICCE, G. A.; JIANG, S.; SIMKIN, M.; ZHANG, L.; LOONEY, C. R.; GODKE, R. A.; YANG, X. Age and Hormonal Dependence of Acquisition of Oocyte Competence for Embryogenesis in Prepubertal Calves'. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 386–392, 1997.

QASSEM, E.; FALAH, K.; AGHAWAYS, I. .; SALIH, T. A correlative study of oocytes morphology with fertilization, cleavage, embryo quality and implantation rates after intra cytoplasmic sperm injection. **Acta Medica International**, v. 2, n. 1, p. 7, 2015.

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

RUSSELL, D. L.; GILCHRIST, R. B.; BROWN, H. M.; THOMPSON, J. G. Bidirectional communication between cumulus cells and the oocyte: Old hands and new players? **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 62–68, 2016.

SINCLAIR, K. D.; BROADBENT, P. J.; DOLMAN, D. F. In vitro produced embryos as a means of achieving pregnancy and improving productivity in beef cows. **Animal Science**, v. 60, n. 1, p. 55–64, 1995.

SIRARD, M. A. Factors affecting oocyte and embryo transcriptomes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. SUPPL.4, p. 148–155, 2012.

SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 126–136, 2006.

SOUZA-CÁCARES, M. B.; FIALHO, A. L. L.; SILVA, W. A. L.; CARDOSO, C. J. T.; PÖHLAND, R.; MARTINS, M. I. M.; MELO-STERZA, F. A. Oocyte quality and heat shock proteins in oocytes from bovine breeds adapted to the tropics under different conditions of environmental thermal stress. **Theriogenology**, v. 130, p. 103–110, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.02.039>>.

SUSOR, A.; JANSOVA, D.; ANGER, M.; KUBELKA, M. Translation in the

mammalian oocyte in space and time. **Cell and Tissue Research**, v. 363, n. 1, p. 69–84, 2016.

SUTTER, P. D.; DOZORTSEV, D.; QIAN, C.; DHONT, M. Oocyte morphology does not correlate with fertilization rate and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. **Human Reproduction**, v. 11, n. 3, p. 595–597, 2012.

THÉLIE, A.; PAPILLIER, P.; PENNETIER, S.; PERREAU, C.; TRAVERSO, J. M.; UZBEKOVA, S.; MERMILLOD, P.; JOLY, C.; HUMBLLOT, P.; DALBIÈS-TRAN, R. Differential regulation of abundance and deadenylation of maternal transcripts during bovine oocyte maturation in vitro and in vivo. **BMC Developmental Biology**, v. 7, p. 1–13, 2007.

THOMAS, R. E.; ARMSTRONG, D. T.; GILCHRIST, R. B. Bovine Cumulus Cell-Oocyte Gap Junctional Communication During In Vitro Maturation in Response to Manipulation of Cell-Specific Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate Levels1. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 3, p. 548–556, 2004.

TIWARI, M.; PRASAD, S.; TRIPATHI, A.; PANDEY, A. N.; ALI, I.; SINGH, A. K.; SHRIVASTAV, T. G.; CHAUBE, S. K. Apoptosis in mammalian oocytes: A review. **Apoptosis**, v. 20, n. 8, p. 1019–1025, 2015.

TONG, Z. Bin; GOLD, L.; PFEIFER, K. E.; DORWARD, H.; LEE, E.; BONDY, C. A.; DEAN, J.; NELSON, L. M. Mater, a maternal effect gene required for early embryonic development in mice. **Nature Genetics**, v. 26, n. 3, p. 267–268, 2000.

TULAY, P.; ARSLAN, H.; BURAN, A.; KOPRULU, Y. Assessment of successful pregnancy using granular oocytes in ICSI treatments. **Zygote**, n. December 2014, p. 1–4, 2019.

UYAR, A.; TORREALDAY, S.; SELI, E. Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality. **Fertility and Sterility**, v. 99, n. 4, p. 979–997, 2013.

VAN BLERKOM, J. Occurrence and developmental consequences of aberrant cellular organization in meiotically mature human oocytes after exogenous ovarian hyperstimulation. **Journal of Electron Microscopy Technique**, v. 16, n. 4, p. 324–346, 1990.

VAN BLERKOM, J.; HENRY, G. Oocyte dysmorphism and aneuploidy in meiotically mature human oocytes after ovarian stimulation. **Human Reproduction**, v. 7, n. 3, p. 379–390, 1992.

VIANA, J. H. M.; SIQUEIRA, L. G. B.; PALHÃO, M. P.; CAMARGO, L. S. de A. Use of in vitro fertilization technique in the last decade and its effect on Brazilian embryo industry and animal production. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, n. SUPPL. 2, p. 661–674, 2010.

WANG, Q.; SUN, Q. Y. Evaluation of oocyte quality: Morphological, cellular and molecular predictors. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, n. 1, p. 1–12, 2007.

WILDING, M.; DALE, B.; MARINO, M.; MATTEO, L.; ALVIGGI, C.; PISATURO, M. L.; LOMBARDI, L.; PLACIDO, G. De. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. **Human Reproduction**, v. 16, n. 5, p. 909–917, 2001.

WILDING, M.; DI MATTEO, L.; D'ANDRETTI, S.; MONTANARO, N.; CAPOBIANCO, C.; DALE, B. An oocyte score for use in assisted reproduction. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 24, n. 8, p. 350–358, 2007.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; NIEMANN, H. Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. **Theriogenology**, v. 68, p. 77–83, 2007.

WU, X.; VIVEIROS, M. M.; EPPIG, J. J.; BAI, Y.; FITZPATRICK, S. L.; MATZUK, M. M. Zygote arrest 1 (Zar1) is a novel maternal-effect gene critical for the oocyte-to-embryo transition. **Nature Genetics**, v. 33, n. 2, p. 187–191, 2003.

YAKIN, K.; BALABAN, B.; ISIKLAR, A.; URMAN, B. Oocyte dysmorphism is not associated with aneuploidy in the developing embryo. **Fertility and Sterility**, v. 88, n. 4, p. 811–816, 2007.

YOUNG L, FERNANDES K, MCEVOY TG, BUTTERWITH SC, GUTIERREZ CG, CAROLAN C, BROADBENT PJ, ROBINSON JJ, WILMUT I, S. K. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth. **Nature**

genetics, v. 27, n. 2, p. 153–154, 2001.

YU, C.; JI, S. Y.; SHA, Q. Q.; SUN, Q. Y.; FAN, H. Y. CRL4-DCAF1 ubiquitin E3 ligase directs protein phosphatase 2A degradation to control oocyte meiotic maturation. **Nature Communications**, v. 6, p. 1–11, 2015a.

YU, E. J.; AHN, H.; LEE, J. M.; JEE, B. C.; KIM, S. H. Fertilization and embryo quality of mature oocytes with specific morphological abnormalities. **Clinical and Experimental Reproductive Medicine**, v. 42, n. 4, p. 156–162, 2015b.