

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 16/07/2027.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

AMANDA DE OLIVEIRA FURLAN

**ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA E MICROTRANSCRIPTOMA DE VESÍCULAS
EXTRACELULARES PEQUENAS NO FLUIDO UTERINO DE GESTAÇÕES
PRODUZIDAS POR INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL E FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* EM
BOVINOS**

**Araçatuba
2025**

AMANDA DE OLIVEIRA FURLAN

**ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA E MICROTRANSCRIPTOMA DE VESÍCULAS
EXTRACELULARES PEQUENAS NO FLUIDO UTERINO DE GESTAÇÕES
PRODUZIDAS POR INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL E FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* EM
BOVINOS**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal)

Orientadora: Pesquisadora Dra. Flavia Lombardi Lopes

Coorientadora: Professora Associada Dra. Danila Barreiro Campos

Araçatuba

2025

F985a

Furlan, Amanda de Oliveira

Análise do transcriptoma e microtranscriptoma de vesículas extracelulares pequenas no fluido uterino de gestações produzidas por inseminação artificial e fertilização in vitro em bovinos / Amanda de Oliveira Furlan. -- Araçatuba, 2025

768 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba

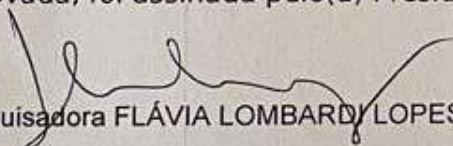
Orientadora: Flavia Lombardi Lopes

Coorientadora: Danila Barreiro Campos

1. Vesículas extracelulares pequenas. 2. MicroRNA. 3. LncRNA. 4. Reprodução assistida. I. Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE AMANDA DE OLIVEIRA FURLAN, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL, DA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA - CÂMPUS DE ARAÇATUBA.

Aos 16 dias do mês de julho do ano de 2025, às 8h30min, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de AMANDA DE OLIVEIRA FURLAN, intitulada **Análise do transcriptoma e microtranscriptoma de vesículas extracelulares pequenas no fluido uterino de gestações produzidas por inseminação artificial e fertilização *in vitro* em bovinos**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Pesquisadora FLÁVIA LOMBARDI LOPES (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP, Profa.Dra. ALESSANDRA BRIDI (Participação Virtual) do(a) Universidade do Oeste de Santa Catarina - Câmpus de Xanxerê, Pesquisadora LUCIANA CORREIA DE ALMEIDA REGITANO (Participação Virtual) do(a) Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária / EMBRAPA . Após a exposição pela doutoranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: APROVADO . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.


Pesquisadora FLÁVIA LOMBARDI LOPES



“Não a nós, Senhor, nenhuma glória para nós, mas sim ao teu nome, por teu amor e por tua fidelidade”.

Salmos 115:1

AGRADECIMENTOS

A Deus, que, com toda a sua misericórdia e amor, me permitiu realizar sonhos. Consegui ver e sentir sua presença em cada novo desafio. Obrigada, Senhor, por me permitir voar tão alto e tão longe durante esses quatro anos de doutorado.

Ao meu avô, Ângelo Furlan (*in memoriam*), que não está mais presente para comemorar esta vitória comigo, mas de quem nunca esquecerei. Obrigada por sempre me ouvir, me incentivar, rezar por mim, se preocupar comigo e por me levar à faculdade durante a graduação. Sinto muito a sua falta.

Ao meu marido, Johnny Jardinette, que dividiu sonhos comigo e sempre acreditou em mim, sem jamais questionar.

A minha irmã, Daniela Furlan, eu sou extremamente mais feliz por ter você na minha vida, obrigada por me ajudar e me ouvir todas as vezes.

Aos meus pais, Claudete Furlan e Edilson Furlan, obrigada por todo o suporte que me deram durante a minha vida inteira. Eu não seria nada do que sou hoje se não fosse pela educação e responsabilidade que aprendi com vocês. Aos meus olhos, meus pais são aqueles que deveriam ser chamados de doutores.

Agradeço imensamente à minha orientadora, Dra. Flavia Lombardi Lopes, por toda a confiança, pelo companheirismo e por me ensinar a ser pesquisadora. Obrigada por me acolher tão bem e por estar sempre disposta a ajudar. Guardarei com carinho os bons momentos que vivi na Universidade. O mestrado e o doutorado foram períodos intensos — os mais cansativos, mas também os mais gratificantes e felizes da minha vida acadêmica. Sou grata por ter tido a oportunidade de fazer parte do melhor laboratório da UNESP/FMVA.

Agradeço a todas as minhas amigas de laboratório — Beatriz, Isabelle, Juliana, Mariana, Martina e Luana — e aos meus amigos Matheus e Michel. Esses seis anos que passei com vocês foram os melhores da minha vida. Obrigada por todas as palavras de consolo, pelo incentivo e por toda a ajuda. Sei que o futuro reserva grandes e lindas bênçãos para cada um de vocês.

Agradeço à minha coorientadora, Dra. Danila Campos, pela parceria e por confiar no meu trabalho.

Agradeço à UNESP — Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da

Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (UNESP/FMVA), pela oportunidade de realização do doutorado.

Agradeço à minha banca de qualificação e defesa, Profa Dra. Luciana Regitano e Profa Dra. Alessandra Bridi, por quem tenho grande admiração. Obrigada pelas valiosas contribuições ao meu trabalho.

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

E, finalmente, agradeço à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado sanduiche, ao qual tive a grande oportunidade de colaborar com a professora Dra. Marina Fortes na “The University of Queensland”, Brisbane, Austrália.

"É justo que muito custe o que muito vale".

Santa Teresa d'Ávila

RESUMO

A comunicação materno/embrio-fetal mediada por vesículas extracelulares pequenas (sEVs) desempenha um papel crucial no sucesso da gestação, facilitando o diálogo entre mãe e feto durante o desenvolvimento embrionário. A carga transportada por essas sEVs, incluindo pequenos e longos RNAs não codificantes (miRNAs e lncRNAs), bem como RNAs mensageiros (mRNAs), regula as células-alvo, traduzindo as necessidades do embrião ao mesmo tempo em que sinaliza ao sistema imune materno a tolerância ao novo organismo. Isolamos sEVs do fluido uterino de gestações bovinas produzidas por fertilização *in vitro* (FIV) e inseminação artificial (IA), nos dias 18 (pré-adesão embrionária) e 32 (pós-adesão embrionária). Ao analisar os mRNAs, microRNAs, e lncRNAs transportados por essas vesículas, buscamos compreender melhor seus mecanismos de ação, visando melhorar o desempenho da FIV em bovinos. O fluido uterino foi coletado, e a concentração e o tamanho das sEVs foram mensurados para cada técnica reprodutiva. O RNA total foi extraído para análises de transcriptoma (RNA-Seq) e microtranscriptoma (microarranjo), seguidas de análise de enriquecimento de conjuntos gênicos. Um total de 22 conjuntos foram enriquecidos por mRNAs em IVF18 x AI18, e 24 em IVF32 x AI32. Dentro das técnicas, 2 conjuntos foram enriquecidos em AI32 x AI18 e 30 em IVF32 x IVF18 ($FDR \leq 0.005$). Notavelmente, os caminhos de interação citocina-receptor de citocina e moléculas de adesão celular (IVF32 x AI32) foram enriquecidos. A análise da expressão diferencial de lncRNAs mostrou 398 lncRNAs regulados positivamente e 5 negativamente em IVF32 x AI32; 24 regulados positivamente e 25 negativamente em AI32 x AI18; e 1.081 regulados positivamente e 21 negativamente em IVF32 x IVF18. A análise microtranscriptômica revelou 5 miRNAs regulados negativamente em AI32 x AI18 e 11 regulados positivamente e 2 negativamente em IVF32 x IVF18. O sucesso da comunicação mediada por sEVs depende de sua carga. Observamos um aumento no número de miRNAs, lncRNAs e mRNAs diferencialmente expressos em gestações por FIV, tanto aos 18 quanto aos 32 dias, em comparação com IA. Além disso, identificamos genes codificadores de citocinas que podem prejudicar a receptividade uterina e a tolerância materno/embrio-fetal, bem como genes envolvidos na adesão embrionária em FIV. Adicionalmente, genes diferencialmente expressos associados à via de endocitose parecem promover a liberação de sEVs, o que está de acordo com nossas observações de maiores concentrações de sEVs aos 32 dias nas gestações por FIV. Em resumo, as sEVs de gestações por IA e FIV apresentam conteúdos distintos de transcritos codificantes e não codificantes, o que pode estar relacionado a falhas na comunicação materno/embrio-fetal na FIV.

Palavras-chave: vesículas extracelulares pequenas; microRNA; lncRNA; reprodução assistida.

ABSTRACT

Maternal/embryo-fetal communication mediated by small extracellular vesicles (sEVs) plays a crucial role in pregnancy outcomes, facilitating the dialogue between mother and fetus during embryonic development. The cargo transported by these sEVs—including small and long non-coding RNAs (miRNAs and lncRNAs), as well as messenger RNAs (mRNAs)—regulates target cells by conveying embryonic needs while also signaling the maternal immune system to tolerate the new organism. We isolated sEVs from the uterine fluid of bovine pregnancies produced by *in vitro* fertilization (IVF) and artificial insemination (AI) on days 18 (pre-embryo adhesion) and 32 (post-embryo adhesion). By analyzing the mRNAs, microRNAs, and lncRNAs carried by these vesicles, we aimed to better understand their mechanisms of action in order to improve pregnancy rates following IVF in cattle. Uterine fluid was collected, and the concentration and size of the sEVs were measured for each reproductive technique. Total RNA was extracted for transcriptome (RNA-Seq) and microtranscriptome (microarray) analyses, followed by gene set enrichment analysis. A total of 22 gene sets were enriched by mRNAs in IVF18 x AI18, and 24 in IVF32 x AI32 (FDR ≤ 0.005). Within techniques, 2 sets were enriched in AI32 x AI18, and 30 in IVF32 x IVF18. Notably, the cytokine–cytokine receptor interaction and cell adhesion molecule pathways (IVF32 x AI32) were enriched. Differential expression (DE) analysis of lncRNAs revealed 398 upregulated and 5 downregulated lncRNAs in IVF32 x AI32; 24 upregulated and 25 downregulated in AI32 x AI18; and 1,081 upregulated and 21 downregulated in IVF32 x IVF18. Microtranscriptomic analysis revealed 5 downregulated miRNAs in AI32 x AI18, and 11 upregulated and 2 downregulated in IVF32 x IVF18. The success of sEV-mediated communication depends on their cargo. We observed an increase in the number of differentially expressed miRNAs, lncRNAs, and mRNAs in IVF pregnancies on both days 18 and 32, compared to AI. Additionally, we identified cytokine-encoding genes that may impair uterine receptivity and maternal-fetal tolerance, as well as genes involved in embryo adhesion in IVF. Furthermore, differentially expressed genes associated with the endocytosis pathway appear to promote the release of sEVs, consistent with our observation of higher sEV concentrations on day 32 in IVF pregnancies. In summary, sEVs from AI and IVF pregnancies carry distinct coding and non-coding transcript content, which may be linked to failures in maternal/embryo-fetal communication in IVF.

Keywords: small extracellular vesicles; microRNA; lncRNA; assisted reproduction.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	11
1.1	A importância das técnicas de reprodução assistida no setor pecuário.....	11
1.2	Outras aplicações da reprodução assistida.....	12
1.3	Fertilização <i>in vitro</i> (FIV) x inseminação artificial (IA).....	12
1.4	Endocitose e biogênese dos exossomas.....	13
1.5	Exossomas na comunicação materno/embrio-fetal	16
1.6	Biogênese dos microRNAs (miRNAs) – Via Canônica	17
1.7	Biogênese dos lncRNAs	17
2	OBJETIVO	19
3	CAPÍTULO 1 – CODING AND NON-CODING UTERINE SMALL EXTRACELLULAR VESICLE CONTENT DIFFERS IN THE EARLY STAGES OF PREGNANCIES PRODUCED BY ARTIFICIAL INSEMINATION AND <i>IN VITRO</i> FERTILIZATION IN CATTLE	20
3.1	Resumo	21
3.2	Abstract	21
3.3	Introduction.....	22
3.4	Material and methods.....	24
3.4.1	<i>Sample size</i>	<i>24</i>
3.4.2	<i>Animals and experimental design.....</i>	<i>25</i>
3.4.3	<i>Pregnancy diagnosis and tissue processing.....</i>	<i>26</i>
3.4.4	<i>Small extracellular vesicles isolation</i>	<i>26</i>
3.4.5	<i>Morphology analysis of small extracellular vesicles.....</i>	<i>27</i>
3.4.6	<i>Characterization of small extracellular vesicles by flow nanocytometry</i>	<i>28</i>
3.4.7	<i>RNA extraction of small extracellular vesicles</i>	<i>28</i>
3.4.8	<i>RNA-Sequencing (RNA-Seq) library preparation.....</i>	<i>29</i>
3.4.9	<i>Bioinformatic analysis of RNA-Seq data</i>	<i>29</i>
3.4.10	<i>Identification of differentially expressed (DE) transcripts and co-expression analysis between mRNAs and lncRNAs</i>	<i>29</i>
3.4.11	<i>Gene set enrichment analysis</i>	<i>30</i>
3.4.12	<i>Microtranscriptome analysis by microarray</i>	<i>31</i>

3.4.13	<i>Prediction of target mRNAs of DE miRNAs</i>	31
3.4.14	<i>Pathway enrichment analysis of target mRNAs of DE miRNAs</i>	31
3.5	Results.....	32
3.5.1	<i>Characterization of small extracellular vesicles</i>	32
3.5.2	<i>Differential expression of mRNAs</i>	33
3.5.3	<i>Gene set enrichment analysis</i>	35
3.5.4	<i>Differential expression of lncRNAs</i>	35
3.5.5	<i>Differential expression of miRNAs</i>	37
3.5.6	<i>Pathway enrichment analysis of target mRNAs of DE miRNAs</i>	39
3.6	Discussion	40
3.7	Conclusion	45
3.8	Data availability statement.....	45
3.9	Declaration of competing interest.....	45
3.10	Author contributions	46
3.11	References	46
	REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL	56
	APÊNDICE A – MATERIAL SUPLEMENTAR REFERENTE AO CAPÍTULO 1	61
	ANEXO A – NORMAS DA REVISTA MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT	764

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 A importância das técnicas de reprodução assistida no setor pecuário

Devido ao crescimento da população mundial, existe uma demanda crescente por alimentos, levantando preocupações de que a produção atual de proteína animal não será suficiente para atender o aumento populacional do planeta [revisado por Gifford e Gifford, 2013]. Ao observar o setor pecuário, o Brasil possui a quinta maior extensão territorial do mundo e abriga o maior rebanho bovino comercial global, totalizando 238,6 milhões de cabeças (IBGE, 2023). De acordo com a Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de carnes (ABIEC), o número de abates bovinos no Brasil em 2017 chegou a 39,2 milhões de cabeças, significando 14,4% da produção mundial de carne.

Decorrente da demanda pela produção de carne bovina, nota-se um aumento significativo na aplicação de biotécnicas de reprodução assistida para suprir essa crescente demanda por alimentos [revisado por Gifford e Gifford, 2013]. O avanço no campo da reprodução animal, promoveu o desenvolvimento e melhorias de protocolos na área da reprodução assistida (Sanches; Zangirolamo; Seneda, 2019). Essas técnicas, por sua vez, promovem o aumento no número de descendentes em um curto período de tempo e com melhores características genéticas [revisado por Ferré *et al.*, 2020]. De acordo com o boletim informativo de transferência de embriões, do inglês “International Embryo Technology Society” (IETS) (Viana *et al.*, 2018), o número dos embriões produzidos por fertilização *in vitro* (FIV) em animais tem crescido a cada ano, ultrapassando os embriões produzidos *in vivo* no mundo todo (Sanches; Zangirolamo; Seneda, 2019).

A maioria dos países sul-americanos, como o Brasil e a Argentina, utilizam a criação bovina como recurso importante para o crescimento econômico do país (Viana *et al.*, 2018) e estão entre as indústrias de biotecnologia que mais promovem a transferência de embriões no mundo. Somente o Brasil, possibilitou o crescimento de 55% ao ano na produção de embriões produzidos *in vitro* entre os anos de 2002 à 2012. A proporção da quantidade de animais e embriões produzidos no ano de 2023, colocou o Brasil em 2º lugar no mundo (Viana, 2023). Ao examinar o ano de 2021, as Américas responderam por 88,1% da produção global de embriões

produzidos *in vitro* [revisado por Viana, 2022].

1.2 Outras aplicações da reprodução assistida

A aplicação das técnicas de reprodução assistida em modelos animais possibilitou o desenvolvimento de novos protocolos, beneficiando não somente a reprodução animal, mas também a humana. No campo reprodutivo, a espécie bovina é altamente empregada como modelo experimental, uma vez que possui morfologia e fisiologia ovarianas comparáveis. O tamanho do animal e, consequentemente seus órgãos reprodutores, também contribui em estudos de avaliação endocrinológica e morfológica (Malhi; Adams; Singh, 2005).

1.3 Fertilização *in vitro* (FIV) x inseminação artificial (IA)

O sucesso gestacional em bovinos produzidos por fertilização *in vitro* (FIV) e inseminação artificial (IA) ainda é limitado, com uma alta taxa de perdas. Estudos anteriores (Gatea *et al.*, 2018; Lucy, 2001; Perry *et al.*, 2005; [revisado por Santos *et al.*, 2004; Wiltbank *et al.*, 2016]) indicam que as taxas de perda em gestações derivadas de FIV variam de 59% a 85%. Já nas gestações por IA, as perdas oscilam entre 45% e 65% em vacas leiteiras em lactação e entre 10% e 30% em vacas de corte [revisado por Ealy; Wooldridge; Mccoski, 2019]. Contudo, ao observar as perdas gestacionais aos dias 32-62 de gestação, as taxas relatadas são de 15,1% para FIV e 4,7% para IA (Crowe *et al.*, 2024). Os fatores que podem influenciar o sucesso gestacional são numerosos, como componentes genéticos, fisiológicos, nutricionais e inflamatórios/infecciosos [revisado por Muglia *et al.*, 2022]. A maioria das perdas gestacionais decorrentes da FIV ocorre no início da gestação (18 - 21 dias), durante o período de reconhecimento materno da gestação, seguido pelos dias 30 - 40 de gestação, no período de pós-adesão embrionária, e com uma taxa menor de insucesso entre os dias 45 e 90 de gestação. Em IA, o momento das perdas é semelhante das observadas em vacas leiteiras e de corte. O período de perda se concentra entre os dias 8 a 27 de gestação, porém a significância dessas perdas é menor quando comparado a FIV [revisado por Ealy; Wooldridge; Mccoski, 2019]. Embora a taxa de sucesso da FIV ainda não seja tão alta quanto a da IA, o setor pecuário tem investido cada vez mais nessa técnica para gerar animais com

características genéticas superiores, ampliando a qualidade da prole e potencializando o retorno comercial [revisado por Demetrio *et al.*, 2020]. Nesse contexto, estudos são fundamentais para entender melhor as implicações da FIV e, assim, aumentar sua taxa de sucesso.

1.4 Endocitose e biogênese dos exossomas

A endocitose é um processo biológico que tem como objetivo a internalização de partículas grandes para o interior da célula. Essas partículas, representadas por proteínas, lipídios, receptores de membrana, entre outras moléculas podem ser internalizadas de forma dependente de clatrina ou independente de clatrina (Pons *et al.*, 2012). A endocitose tem início com a internalização dessas moléculas. Quando uma molécula precisa ser transportada para a região intracelular, ela se conecta aos seus ligantes correspondentes na membrana plasmática, formando heterodímeros que se tornam autossfosforilados. Após a ativação, enzimas da família das ubiquitinas marcam as proteínas que serão endocitadas [revisado por Richburg, Myers e Bratton, 2014]. Essa marcação determina o destino para o qual a molécula internalizada deve ser direcionada no tráfego intracelular [revisado por Clague, Liu e Urbé, 2012].

Posteriormente, com a união das ubiquitinas aos ligantes, inicia-se a endocitose mediada por clatrina [revisado por Clague; Liu; Urbé, 2012]. A clatrina é constituída por uma estrutura de trisquelion, composta por três cadeias pesadas e três cadeias leves. O contato entre as “pernas” do trisquelion permite sua automontagem, e, com sua formação, diversas proteínas são direcionadas para essa região, auxiliando na criação de uma vesícula revestida por clatrina. Algumas proteínas adaptadoras de transporte vesicular são recrutadas para a região da membrana plasmática, contribuindo para a formação de uma “cavidade” revestida por clatrina. Essas proteínas adaptadoras desempenham um papel na regulação do “cesto” e possuem um domínio UIM, permitindo que ajam como ligantes entre as proteínas adaptadoras e a clatrina [revisado por Goh e Sorkin, 2013]. Durante essa etapa, outras proteínas da família das endofilinas, são recrutadas para auxiliar na detecção e curvatura da membrana (Buser *et al.*, 2019).

As enzimas pertencentes à família das dinaminas são encontradas na finalização da endocitose e formam “anéis” em volta das regiões invaginadas. A

presença dessas enzimas assegura que a célula não desenvolva uma invaginação excessivamente profunda no “cesto” [revisado por Ferguson e De Camilli, 2012]. Além disso, atuam na ligação de proteínas à actina e na formação do citoesqueleto. À medida que as partículas são internalizadas, a célula começa a estender prolongamentos do citoesqueleto. Os filamentos de actina são recrutados para a cesta de clatrina por meio da interação de proteínas e, após essa interação, ocorre a liberação da cortactina, promovendo a polimerização da actina. Quando a internalização ocorre com o auxílio da polimerização da actina, inicia-se o processo de “desmontagem” da cesta de clatrina. Essa “desmontagem” é realizada por meio de proteínas que se ligam entre os pontos dos vértices onde as “pernas” de trisquelion se encontram (Duleh; Welch, 2011).

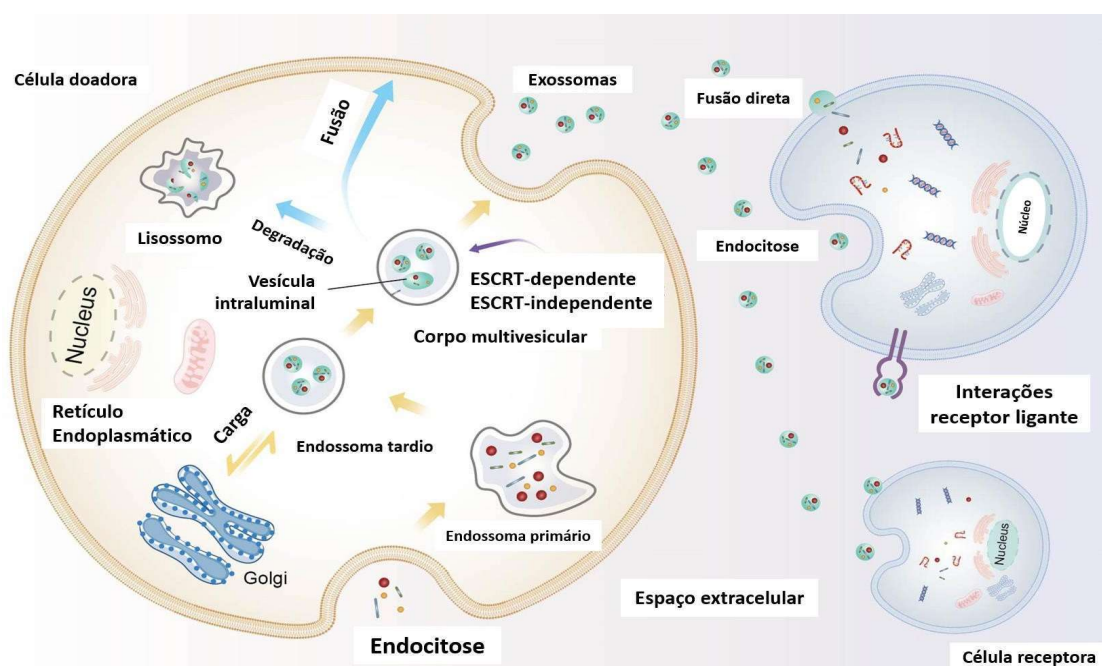
Após a “desmontagem” da cesta revestida por clatrina, a vesícula endocitada inicia interações com outras proteínas que influenciam o formato e a maturação dos endossomas. Com a formação dos endossomas primários, as cargas internalizadas são classificadas e direcionadas para diferentes compartimentos celulares. O endossoma primário é composto por proteínas que facilitam o tráfego intracelular e a reciclagem (complexo retrômero) [revisado por Cullen e Korswagen, 2012]. O complexo retrômero atua na classificação da carga endossômica, podendo promover sua distribuição por três vias distintas (via de reciclagem, via retrógrada e via degradativa). Na via de reciclagem, as proteínas são recicladas do endossoma para a membrana plasmática, com o objetivo de serem reutilizadas. As cargas destinadas à via retrógrada são transportadas dos endossomas para a rede trans-Golgi, onde são encaminhadas para compartimentos intracelulares específicos. No entanto, na via degradativa, os endossomas primários amadurecem em endossomas tardios e se fundem com os lisossomas. Cargas endocitadas que não são marcadas para seguir em nenhuma dessas vias são redirecionadas para outros destinos. Dessa forma, as cargas presentes nos endossomas primários, que permanecem dentro dos endossomas que amadurecem em endossomas tardios ou corpos multivesiculares, e são liberadas para o ambiente extracelular como exossomas [revisado por Li *et al.*, 2016].

Os exossomas originam-se da formação de corpos multivesiculares. Assim, à medida que o endossoma primário amadurece em endossoma tardio, ocorre o acúmulo de vesículas intraluminais em seu interior (Colombo *et al.*, 2013). Por fim, os endossomas tardios podem se fundir com a membrana plasmática,

resultando na liberação de vesículas intraluminais no espaço extracelular. O principal mecanismo descrito para a formação dos exossomas é mediado pelo complexo ESCRT [revisado por Bebelman *et al.*, 2018].

O complexo de classificação endossomica necessário para o transporte é constituído por ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II e ESCRT-III. O ESCRT-0 ocorre pela formação de um heterodímero e tem como finalidade o reconhecimento de proteínas que foram ubiquitinadas na membrana endossomica (Yue *et al.*, 2018). O ESCRT-II é recrutado pelo ESCRT-I, sendo ambos responsáveis pela deformação da membrana do corpo multivesicular (Colombo *et al.*, 2013). O complexo ESCRT-II, por sua vez, recruta o complexo ESCRT-III, que conduz a cisão da vesícula, resultando na formação de vesículas intraluminais (Yue *et al.*, 2018). O processo é finalizado pela proteína VPS4A e seu co-fator VTA1, responsáveis pela desmontagem do complexo ESCRT-III de maneira dependente de ATP (Colombo *et al.*, 2013). As vesículas intraluminais podem seguir duas vias: degradativa ou secretora. Na via degradativa, os corpos multivesiculares se fundem com os lisossomas, enquanto na via secretora, os corpos multivesiculares seguem para a região extracelular, liberando suas vesículas intraluminais, denominadas exossomas [revisado por Bebelman *et al.*, 2018]. A biogênese dos exossomas pode ser visualizada na Figura 1.

Figura 1 - Biogênese dos exossomas.



Fonte: Adaptado de Feng *et al.*, 2020.

A formação dos exossomas pode iniciar a partir da internalização de moléculas do espaço extracelular por meio da endocitose, embora também possa ocorrer de forma independente desse processo. Uma vez internalizados, formam-se endossomos primários, que sofrem maturação para endossomos tardios. No interior dos endossomos tardios, ocorre o brotamento de vesículas intraluminais, resultando na formação dos corpos multivesiculares (MVBs). Esses MVBs podem ser direcionados aos lisossomos para degradação ou podem se fundir com a membrana plasmática, liberando os exossomas no meio extracelular. Os exossomas transportam proteínas, ácidos nucleicos e outros conteúdos, podendo interagir com células-alvo por meio de fusão direta, endocitose ou por interações ligante-receptor [revisado por Feng *et al.*, 2020].

1.5 Exossomas na comunicação materno/embrio-fetal

As vesículas extracelulares podem ser classificadas em exossomas, microvesículas e corpos apoptóticos, sendo encontradas em diversos tecidos e fluidos corporais, como o sangue e a placenta [revisado por Ávila *et al.*, 2018]. A liberação dessas vesículas ocorre em resposta a estímulos fisiológicos ou patológicos. Dentre elas, os exossomas, com tamanho aproximado de 30 a 140 nanômetros (nm), são secretados por diversos tipos celulares, tanto *in vivo* quanto *in vitro* [revisado por Li *et al.*, 2019]. Durante a gestação, a comunicação celular mediada por pequenas vesículas extracelulares desempenha um papel essencial, promovendo processos fundamentais como a implantação, migração e invasão dos trofoblastos [revisado por Ávila *et al.*, 2018 e Zhang *et al.*, 2020]. Essa importância tem sido destacada também em estudos voltados à reprodução assistida, evidenciando o potencial dos exossomas para otimizar técnicas como a inseminação artificial e a fertilização *in vitro* [revisado por Ávila *et al.*, 2018 e Lange-Consiglio *et al.*, 2022].

O conteúdo dessas vesículas inclui moléculas biologicamente ativas, como proteínas, RNAs mensageiros (mRNAs), micro-RNAs (miRNAs) e RNAs longos não codificadores (lncRNAs), que participam da regulação da comunicação materno/embrio-fetal [revisado por Abramowicz e Story, 2020] (Gallo *et al.*, 2012; Valadi *et al.*, 2007). Alterações em sua composição e concentração têm sido associadas a complicações gestacionais [revisado por Mitchell *et al.*, 2015].

Considerando que a classificação dos exossomas leva em conta características como tamanho, densidade e composição molecular, observa-se que sua concentração no ambiente uterino tende a aumentar ao longo da gestação, reforçando a importância de investigações em diferentes estágios gestacionais [revisado por Zhang *et al.*, 2020].

1.6 Biogênese dos microRNAs (miRNAs) – Via Canônica

Os microRNAs (miRNAs ou MiRs) são pequenas moléculas de fita simples de aproximadamente 19-25 nucleotídeos e que não codificam proteínas. Sua função é reguladora pós-transcricional e sua expressão pode ser modulada por estímulos patológicos ou fisiológicos [revisado por Liang, Wang, S. e Wang, Z., 2017].

Dentro do núcleo da célula ocorre a transcrição de um gene de miRNA pela RNA polimerase II (Pol II) ou em alguns casos, pela RNA polimerase III (Pol III). Ao final da transcrição temos um transcrito conhecido como pri-miRNA. O pri-miRNA é clivado em pre-miRNA (com aproximadamente 60-70 nucleotídeos) por um complexo microprocessador da enzima RNAase II Drosha e pela proteína DiGeorge Critical Region 8 (DGCR8). O pre-miRNA é transportado do núcleo para o citoplasma pelo cofator Exportin-5 e Ran-GTP. Na sequência, o pre-miRNA é clivado novamente pela RNase III Dicer acoplada à proteína de ligação ao RNA TAR de fita dupla 2, que gera duas fitas de miRNA com 22 nucleotídeos. Essas duas fitas se ligam a proteína Argonaute para serem incorporadas ao complexo de silenciamento induzido por miRNA (miRISC). Após se ligar ao miRISC, uma fita é levada a degradação e outra é levada para se ligar ao mRNA-alvo, promovendo a repressão da tradução via degradação ou silenciamento do mRNA alvo [revisado por Tesfaye *et al.*, 2018].

1.7 Biogênese dos lncRNAs

Os lncRNAs, do inglês, long non-coding RNAs, são transcritos longos de RNA, com aproximadamente 200 nucleotídeos que, em sua maioria, não são traduzidos em proteínas. Os lncRNAs são transcritos pela RNA polimerase II e, em sua maioria, apresentam uma capa 5' de metilguanossina e, frequentemente, uma cauda poli(A) em sua extremidade 3'. Eles atuam em diversos processos

regulatórios, tanto pré quanto pós-transcricionais. Podem modular a expressão gênica ao influenciar o recrutamento da RNA polimerase II, de fatores de transcrição, e de enzimas moduladoras de cromatina, além de participar do processamento pós-transcricional de outros RNAs e afetar a estabilidade e a tradução do mRNA. Além disso, os lncRNAs podem atuar como competidores endógenos de miRNAs, bloqueando sua ação sobre genes-alvo [revisado por Karlsson e Baccarelli, 2016].

LncRNAs podem ser classificados com base em sua localização subcelular, como nucleares, citoplasmáticos ou mitocondriais, e também segundo seu modo de ação, como reguladores *cis* ou *trans*, arcabouços moleculares, sequestradores de miRNAs, entre outros [revisado por Liu *et al.*, 2021].

Os lncRNAs não são conservados entre espécies e apresentam maior especificidade tecidual do que os mRNAs (Poloni; Oliveira; Feltes, 2024, revisado). Assim, a biogênese dos lncRNAs é específica ao tipo e estágio celular, e está condicionada ao estímulo recebido. Por fim, diferentemente dos miRNAs, os lncRNAs atuam tanto na ativação quanto na inibição da expressão gênica de seus alvos [revisado por Dahariya *et al.*, 2019].

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

- ABRAMOWICZ, A.; STORY, M. D. The long and short of it: the emerging roles of non-coding RNA in small extracellular vesicles. **Cancers**, Basel, v. 12, n. 6, e1445, p. 1-17, 2020. DOI: 10.3390/cancers12061445.
- ÁVILA, A. C. F. C. M.; ANDRADE, G. M.; BRIDI, A.; GIMENES, L. U.; MEIRELLES, F. V.; PERECIN, F.; SILVEIRA, J. C. Extracellular vesicles and its advances in female reproduction. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 16, n. 1, p. 31-38, 2018. DOI: 10.21451/1984-3143-AR2018-00101.
- BEBELMAN, M. P.; SMIT, M. J.; PEGTEL, D. M.; BAGLIO, S. R. Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer. **Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 188, p. 1-11, 2018. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2018.02.013.
- BUSER, D. P.; RITZ, M. F.; MOES, S.; TOSTADO, C.; FRANK, S.; SPIESS, M.; MARIANI, L.; JENÖ, P.; BOULAY, J. L.; HUTTER, G. Quantitative proteomics reveals reduction of endocytic machinery components in gliomas. **EBioMedicine**, Amsterdam, v. 46, p. 32-41, 2019. DOI: 10.1016/j.ebiom.2019.07.039.
- CLAGUE, M. J.; LIU, H.; URBÉ, S. Governance of endocytic trafficking and signaling by reversible ubiquitylation. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 23, n. 3, p. 457-467, 2012. DOI: 10.1016/j.devcel.2012.08.011.
- COLOMBO, M.; MOITA, C.; VAN NIEL, G.; KOWAL, J.; VIGNERON, J.; BENAROCHE, P.; MANEL, N.; MOITA, L. F.; THÉRY, C.; RAPOSO, G. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. **Journal of Cell Science**, London, v. 126, n. 24, p. 5553-5565, 2013. DOI: 10.1242/jcs.128868.
- CROWE, M. A.; MEIER, S.; BECK, N. F. G.; PERRY, G. A. Embryo survival and conceptus elongation are impaired in recipient cows carrying in vitro–produced embryos compared with those carrying embryos produced in vivo. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 107, n. 4, p. 3364-3377, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2023-23520>.
- CULLEN, P. J.; KORSWAGEN, H. C. Sorting nexins provide diversity for retromer-dependent trafficking events. **Nature Cell Biology**, London, v. 14, n. 1, p. 29-37, 2012. DOI: 10.1038/ncb2374.
- DAHARIYA, S.; PADDIBHATLA, I.; KUMAR, S.; RAGHUWANSHI, S.; PALLEPATI, A.; GUTTI, R. K. Long non-coding RNA: classification, biogenesis and functions in blood cells. **Molecular Immunology**, Oxford, v. 112, p. 82-92, 2019. DOI: 10.1016/j.molimm.2019.04.011.

DEMETRIO, D. G. B.; BENEDETTI, E.; DEMETRIO, C. G. B.; FONSECA, J.; OLIVEIRA, M.; MAGALHAES, A.; SANTOS, R. M. How can we improve embryo production and pregnancy outcomes of holstein embryos produced in vitro? (12 years of practical results at a California dairy farm). **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 17, n. 3, e20200053, p. 1-13, 2020. DOI: 10.1590/1984-3143-AR2020-0053.

DULEH, S. N.; WELCH, M. D. WASH and the Arp2/3 complex regulate endosome shape and trafficking. **Cytoskeleton**, Hoboken, v. 67, n. 3, p. 193-206, 2011. DOI: 10.1002/cm.20437.

EALY, A. D.; WOOLDRIDGE, L. K.; MCCOSKI, S. R. Board invited review: post-transfer consequences of in vitro-produced embryos in cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 97, n. 6, p. 2555-2568, 2019. DOI: 10.1093/jas/skz116.

FENG, K.; MA, R.; ZHANG, L.; LI, H.; TANG, Y.; DU, G.; NIU, D.; YIN, D. The role of exosomes in thyroid cancer and their potential clinical application. **Frontiers in Oncology**, Lausanne, v. 10, e596132, p. 1-12, 2020. DOI: 10.3389/fonc.2020.596132.

FERGUSON, S. M.; DE CAMILLI, P. Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 13, n. 2, p. 75-88, 2012. DOI: 10.1038/nrm3266.

FERRÉ, L. B.; KJELLAND, M. E.; STRØBECH, L. B.; HYTTEL, P.; MERMILLOD, P.; ROSS, P. J. Review: recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. **Animal**, London, v. 14, n. 5, p. 991-1004, 2020. DOI: 10.1017/S1751731119002775.

GALLO, A.; TANDON, M.; ALEVIZOS, I.; ILLEI, G. G. The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 3, e30679, p. 1-5, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0030679.

GATEA, A. O.; SMITH, M. F.; POHLER, K. G.; EGEN, T.; PEREIRA, M. H. C.; VASCONSELOS, J. L. M.; LAWRENCE, J. C.; GREEN, J. A. The ability to predict pregnancy loss in cattle with ELISAs that detect pregnancy associated glycoproteins is antibody dependent. **Theriogenology**, Los Altos, v. 108, p. 269-276, 2018. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2017.12.021.

GIFFORD, J. A. H.; GIFFORD, C. A. Role of reproductive biotechnologies in enhancing food security and sustainability. **Animal Frontiers**, Cary, v. 3, n. 3, p. 14-19, 2013. DOI: 10.2527/af.2013-0019.

GOH, L. K.; SORKIN, A. Endocytosis of receptor tyrosine kinases. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, Woodbury, v. 5, n. 5, ea017459, p. 1-17, 2013. DOI: 10.1101/cshperspect.a017459.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Pesquisa da Pecuária Municipal – PPM 2022**. Rio de Janeiro: IBGE, 2023. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html>. Acesso em: 21 jul. 2025.

KARLSSON, O.; BACCARELLI, A. A. Environmental health and long non-coding RNAs. **Current Environmental Health Reports**, Heidelberg, v. 3, n. 3, p. 178-187, 2016. DOI: 10.1007/s40572-016-0092-1.

LANGE-CONSIGLIO, A.; CAPRA, E.; MONFERINI, N.; CANESI, S.; BOSI, G.; CRETICH, M.; FRIGERIO, R.; GALBIATI, V.; BERTUZZO, F.; COBALCHINI, F.; CREMONESI, F.; GASPARRINI, B. Extracellular vesicles from seminal plasma to improve fertilizing capacity of bulls. **Reproduction and Fertility**, Bristol, v. 3, n. 4, p. 313-327, 2022. DOI: 10.1530/RAF-22-0037.

LI, C.; SHAH, S. Z. A.; ZHAO, D.; YANG, L. Role of the retromer complex in neurodegenerative diseases. **Frontiers in Aging Neuroscience**, Lausanne, v. 8, e42, p. 1-12, 2016. DOI: 10.3389/fnagi.2016.00042.

LI, X.; CORBETT, A. L.; TAATIZADEH, E.; TASNIM, N.; LITTLE, J. P.; GARNIS, C.; DAUGAARD, M.; GUNS, E.; HOORFAR, M.; LI, I. T. S. Challenges and opportunities in exosome research - perspectives from biology, engineering, and cancer therapy. **APL Bioengineering**, Melville, v. 3, n. 1, e11503, p. 1-21, 2019. DOI: 10.1063/1.5087122.

LIANG, J.; WANG, S.; WANG, Z. Role of microRNAs in embryo implantation. **Reproductive Biology and Endocrinology**, London, v. 15, n. 1, e90, p. 1-11, 2017. DOI: 10.1186/s12958-017-0309-7.

LIU, Y.; DING, W.; YU, W.; ZHANG, Y.; AO, X.; WANG, J. Long non-coding RNAs: biogenesis, functions, and clinical significance in gastric cancer. **Molecular Therapy Oncolytics**, Cambridge, v. 23, p. 458-476, 2021. DOI: 10.1016/j.omto.2021.11.005.

LUCY, M. C. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, n. 6, p. 1277-1293, 2001. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(01)70158-0.

MALHI, P. S.; ADAMS, G. P.; SINGH, J. Bovine model for the study of reproductive aging in women: follicular, luteal, and endocrine characteristics. **Biology of Reproduction**, New York, v. 73, n. 1, p. 45-53, 2005. DOI: 10.1095/biolreprod.104.038745.

MITCHELL, M. D.; PEIRIS, H. N.; KOBAYASHI, M.; KOH, Y. Q.; DUNCOMBE, G.; ILLANES, S. E.; RICE, G. E.; SALOMON, C. Placental exosomes in normal and complicated pregnancy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, New York, v. 213, p. S173-S181, 2015. Suplemento 4. DOI: 10.1016/j.ajog.2015.07.001.

MUGLIA, L. J.; BENHALIMA, K.; TONG, S.; OZANNE, S. Maternal factors during pregnancy influencing maternal, fetal, and childhood outcomes. **BMC Medicine**, London, v. 20, n. 1, e418, p. 1-5, 2022. DOI: 10.1186/s12916-022-02632-6.

PERRY, G. A.; SMITH, M. F.; LUCY, M. C.; GREEN, J. A.; PARKS, T. E.; MACNEIL, M. D.; ROBERTS, A. J.; GEARY, T. W. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 102, n. 14, p. 5268-5273, 2005. DOI: 10.1073/pnas.0501700102.

POLONI, J. F.; OLIVEIRA, F. H. S.; FELTES, B. C. Localization is the key to action: regulatory peculiarities of lncRNAs. **Frontiers in Genetics**, Lausanne, v. 15, e1478352, p. 1-14, 2024. DOI: 10.3389/fgene.2024.1478352.

PONS, V.; USTUNEL, C.; ROLLAND, C.; TORTI, E.; PARTON, R. G.; GRUENBERG, J. SNX12 role in endosome membrane transport. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 6, e38949, p. 1-8, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0038949.

RICHBURG, J. H.; MYERS, J. L.; BRATTON, S. B. The role of E3 ligases in the ubiquitin - dependent regulation of spermatogenesis. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, London, v. 30, p. 27-35, 2014. DOI: 0.1016/j.semcdb.2014.03.001

SANCHES, B. V.; ZANGIROLAMO, A. F.; SENEDA, M. M. Intensive use of IVF by large-scale dairy programs. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 16, n. 3, p. 394-401, 2019. DOI: 10.21451/1984-3143-AR2019-0058.

SANTOS, J. E. P.; THATCHER, W. W.; CHEBEL, R. C.; CERRI, R. L. A.; GALVÃO, K. N. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 82-83, p. 513-535, 2004. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2004.04.015.

TESFAYE, D.; GEBREMEDHN, S.; SALILEW-WONDIM, D.; HAILAY, T.; HOELKER, M.; GROSSE-BRINKHAUS, C.; SCHELLANDER, K. MicroRNAs: Tiny molecules with a significant role in mammalian follicular and oocyte development. **Reproduction**, Bristol, v. 155, n. 3, p. R121-R135, 2018. DOI: 10.1530/REP-17-0428.

VALADI, H.; EKSTRÖM, K.; BOSSIOS, A.; SJÖSTRAND, M.; LEE, J. J.; LÖTVALL, J. O. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Nature Cell Biology**, London, v. 9, n. 6, p. 654-659, 2007. DOI: 10.1038/ncb1596.

VIANA, J. Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. **Embryo Technology Newsletter**, Champaign, v. 42, n. 4, p. 1-15, 2023.

VIANA, J. H. Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. **Embryo Technology Newsletter**, Champaign, v. 40, n. 4, p. 22-40, 2022.

VIANA, J. H. M.; FIGUEIREDO, A. C. S.; GONÇALVES, R. L. R.; SIQUEIRA, L. G. B. A historical perspective of embryo-related technologies in South America. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 15, p. 963-970, 2018. Suplemento 1. DOI: 10.21451/1984-3143-AR2018-0016.

WILTBANK, M. C.; BAEZ, G. M.; GARCIA-GUERRA, A.; TOLEDO, M. Z.; MONTEIRO, P. L. J.; MELO, L. F.; OCHOA, J. C.; SANTOS, J. E. P.; SARTORI, R. Pivotal periods for pregnancy loss during the first trimester of gestation in lactating dairy cows. **Theriogenology**, New York, v. 86, n. 1, p. 239-253, 2016. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2016.04.037.

YUE, Q.; YU, Q.; YANG, Q.; XU, Y.; GUO, Y.; BLISSARD, G. W.; LI, Z. Distinct roles of cellular ESCRT-I and ESCRT-III proteins in efficient entry and egress of budded virions of autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 92, n. 1, e01636-17, p. 1-35, 2018. DOI: 10.1128/JVI.01636-17.

ZHANG, J.; LI, H.; FAN, B.; XU, W.; ZHANG, X. Extracellular vesicles in normal pregnancy and pregnancy-related diseases. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, Oxford, v. 24, n. 8, p. 4377-4388, 2020. DOI: 10.1111/jcmm.15144.