

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

TRANSCRIPTOMA DAS CÉLULAS DA GRANULOSA
DURANTE O DESENVOLVIMENTO FOLICULAR EM
BOVINOS

HENRY DAVID MOGOLLÓN GARCÍA

Botucatu- SP
Dezembro 2021

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

TRANSCRIPTOMA DAS CÉLULAS DA GRANULOSA DURANTE O DESENVOLVIMENTO FOLICULAR EM BOVINOS

HENRY DAVID MOGOLLÓN GARCÍA

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

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Pinheiro
Ferreira

Coorientador: Prof. Dr. John Kastelic

Botucatu- SP
Dezembro 2021

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

Mogollón García, Henry David.

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

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: João Carlos Pinheiro Ferreira

Coorientador: John Kastelic

Capes: 50504002

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

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

Henry David Mogollón García

Data da defesa: 20/12/2021

COMISSÃO EXAMINADORA

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

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

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

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

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

DEDICATÓRIA

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SUMÁRIO

Capítulo 1.....	8
1. Introdução e justificativa.....	9
2. Revisão de literatura.....	12
2.1. Desenvolvimento folicular em bovinos.....	12
2.2. RNA-Seq e reprodução.....	12
2.3. Perfil transcriptômico durante o desenvolvimento folicular em outras espécies.....	13
2.4. Perfil transcriptômico durante o desenvolvimento folicular em bovinos.....	14
2.5. Genes de interesse durante o desvio folicular.....	16
3. Referências.....	18
Capítulo 2.....	24
Artigo “Transcriptomic analysis of bovine granulosa cells during follicular development”	25

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

RESUMO

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

Palavras chave: Vacas; foliculogênese; expressão gênica; ovário

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

ABSTRACT

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

Palavras chave: cows; folliculogenesis; gene expression; ovary

CAPÍTULO 1

1 Introdução e justificativa

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2 Revisão de literatura

2.1 Desenvolvimento folicular em bovinos

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

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

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

2.2 RNA-Seq e reprodução

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

GERSTEIN; SNYDER, 2009).

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

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

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

2.3 Perfil transcriptômico durante o desenvolvimento folicular em outras espécies

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

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

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

2.4 Perfil transcriptômico durante o desenvolvimento folicular em bovinos

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

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

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

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

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

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

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

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

2.5 Genes de interesse durante o desvio folicular

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

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

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

3 REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CAPÍTULO 2.

Artigo redigido nas normas da revista *Scientific Reports*. As figuras, tabelas e legendas, foram escritas em inglês para facilitar a elaboração do manuscrito.

Transcriptomic analysis of bovine granulosa cells during follicular development

immediate

ABSTRACT

Introduction: Os estudos que avaliam o desenvolvimento folicular em bovinos desde uma perspectiva molecular e, que incluam uma análise transcriptômica espaço temporal das diferentes fases foliculares são inexistentes. **Objective:** Neste estudo foi avaliada a sequência de mRNA de células da granulosa de vacas Holandesas não lactantes. As amostras foram colhidas *in vivo* de folículos classificados nos momentos: pré-desvio (PreDev; F1 ~ 7.0 mm); desvio -segundo maior folículo (DevF2 ~ 8.5 mm); desvio-maior folículo (DevF1 ~ 8.5 mm); pós-desvio (PostDev ~ 12.0 mm) e pré-ovulatório (PreOv ~ 14 mm). **Results:** A análise integrada da ontologia gênica (GO), enriquecimento de conjunto de genes (GSEA), interação proteína-proteína (PPI) e a topologia gênica, permitiu identificar genes diferencialmente expressos (DEGs) que, no folículo DevF2 e DevF1 estão envolvidos na esteroidogênese, proliferação celular e provável regulação vascular. No folículo PostDev e PreOv a expressão dos DEGs foi associada com uma resposta inflamatória, caracterizada pela forte ação de genes da família quinase. **conclusions:** Os nossos resultados indicaram as principais mudanças moleculares das células da granulosa durante as diferentes fases do desenvolvimento folicular. Do mesmo modo, foi revelada uma ampla gama de genes que poderão ser estudados em futuras pesquisas.

Introdução

O ovário é um órgão composto por células germinativas (oócitos) e somáticas (células da granulosa, da teca e do estroma)¹. Tanto o oócito como as células somáticas, após uma re-organização, convergem na formação dos folículos ovarianos que ao se desenvolverem exibem mudanças morfológicas (aumento de tamanho e multiplicação celular e aparecimento do antro folicular) e moleculares moduladas por mecanismos neuroendócrinos e fatores parácrinos e autócrinos². Durante o desenvolvimento, e acordo o seu diâmetro, os folículos antrais nas vacas *Bos taurus* são classificados como em estágio de pré-desvio (F1 ~ 7.0 mm), desvio (F1 ~ 8.5 mm), pós-desvio (F1 > 8.5 mm) ou pré-ovulatório (F1 > 12 mm)³⁻⁵. Reconhecer os principais mecanismos moleculares que coordenam o desenvolvimento folicular tem sido prioridade nos estudos de fisiologia ovariana. Esses estudos vem elucidando o papel individual de vários genes no desenvolvimento folicular, como os relacionados a transcrição dos receptores do hormônio luteinizante (LHR)⁶, de membros da família dos fatores de crescimento fibroblástico (FGFS)⁷, de fatores de crescimento semelhante a insulina (IGFs) e suas proteínas de ligação (IGFPBs), todos esses genes são relacionados com as atividades de proliferação e diferenciação celular⁸.

Contudo, o processo do desenvolvimento folicular é complexo, multifatorial e muitos agentes envolvidos ainda são desconhecidos. Na última década estudos que incorporaram análises transcriptômicas vêm permitindo identificar a miríade dos genes diferencialmente expressos no ovário de iaques⁹, ovelhas^{10,11}, cabras¹², e ratos¹³ bem como genes diferencialmente expressos nas células da granulosa de ovelhas¹⁴, porcas¹⁵ e éguas¹⁶ que estão relacionados a coordenação do desenvolvimento folicular. Em vacas, a comparação do transcriptoma das células da granulosa entre folículos pré-desvio e folículos no início do desvio, evidencia a expressão aumentada de genes associados com a esteroidogênese¹⁷. Nos folículos pós-desvio (> 10 mm) o transcriptoma das células da granulosa quando comparadas com as células da teca, células luteais pequena e células luteais grandes, caracteriza-se pelo aumento da expressão de genes agrupados nos termos de mitose, replicação de DNA, reparo e estrutura celular¹⁸. Outra análise realizada em folículos definidos como pequenos (3-5 mm) vs folículos grandes (> 9 mm) evidenciou a expressão de quatro genes (MGARP, GLDC, CHST8, GPX3) que foram considerados como potenciais marcadores das células da granulosa¹⁹. A análise transcriptômica de folículos grandes (> 10 mm) expôs como genes *upstream* o STAT e XBP1, o gene MGEA5 considerou-se como *upstream* nos folículos pequenos (< 5 mm); no mesmo estudo, o enriquecimento funcional dos folículos grandes associou-se com processos de orientação axonal, sinalização imunológica e rearranjo celular²⁰.

Os estudos que empregaram a análise do transcriptoma das células da granulosa não consideraram o acompanhamento da expressão dos genes durante as diferentes etapas do desenvolvimento folicular. Deste modo, o objetivo do presente estudo foi analisar a expressão gênica das células da granulosa nos folículos ovarianos nas fases de desvio, pós-desvio e pré-ovulatório de vacas Holandesas empregando-se a técnica de RNA-seq.

Resultados

Transcriptoma das células da granulosa. Foram identificados 27270 genes. Desses genes, 1805 (6.6%) foram diferencialmente expressos (DEGs). O total das reads por amostra encontra-se disponível nos dados suplementares ([Supplementary data](#)). Conforme os folículos foram se desenvolvendo, houve aumento no número de DEGs. No total, nos folículos DevF2, DevF1, PostDev e PreOv, foram observados, respectivamente, 11, 25, 283 e 1594 DEGs. O número de DEGs upregulated total foi de 1422 (DevF2 = 9; DevF1 = 11; PostDev = 273 e PreOv = 1129). Adicionalmente, o número total de DEGs downregulated observado foi de 491 (DevF2 = 2; DevF1 = 14; PostDev = 10 e PreOv = 465) (Fig. 1a-d). O top 10 dos DEGs upregulated e downregulated nos folículos foi estabelecido considerando o $\log_2[FC] > 1.5$ e valores de FDR < 0.0001 (Tabela. 1 e 2). A totalidade dos DEGs upregulated e downregulated para cada folículo foi incluída no arquivo de dados suplementares ([Supplementary data](#)). De acordo com o diagrama de Venn, os DEGs com presença exclusiva em cada categoria folicular foram: 4 (0.2%) para DevF2, 13 (0.7%) para DevF1, 190 (10.5%) para PostDev e 1493 (82.7%) para PreOv (Fig. 1e). Além disso, 105 DEGs foram conservados (DevF2 vs DevF1 3, DevF1 vs PostDev 1, PostDev vs PreOv 92, PreOv vs DevF1 5, PreOv vs DevF1 vs DevF2 3 e PreOv vs DevF2 1) (Fig. 1e).

A diferenciação dos folículos considerando os DEGs foi avaliada pela análise de componentes principais (PCA). Os resultados mostraram uma clara separação das amostras pertencentes a categoria PreOv. Entretanto, os folículos de DevF2, DevF1 e PostDev não foram distintos entre si (Fig. 1d). Informação adicional da PCA entre os folículos é mostrada nos dados suplementares ([Supplementary data](#)). Os resultados da análise PCA foram reforçados com a hierarquização Euclidiana dos clusters no mapa de calor geral (Fig. 2). Adicionalmente, a variação intra-folicular e inter-folicular foi avaliada com correlação e análise da distância amostra-amostra ([Supplementary data](#)).

Ontologia gênica (GO).

O enriquecimento funcional dos folículos DevF1, PostDev e PreOv, foi realizado com G:Profiler e ilustrado com GOCircle. As anotações funcionais relacionadas a processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares são mostradas (Fig. 3). Todos os termos da GO associados a cada um dos folículos são mostrados no arquivo de dados suplementares ([Supplementary data](#)).

Enriquecimento de conjunto de genes (GSEA). Enriquecimento de conjunto de genes foi realizado considerando a configuração preranked do software GSEA. No folículo PostDev e PreOv foram enriquecidos (FDR $p < 0.05$) 5 e 16 gene sets, respectivamente. Todos os gene sets foram upregulated. O Normalized Enrichment Score (NES) permitiu correlacionar positivamente, no folículo PreOv, vias associadas à resposta imune (Fig. 4a, b).

Interação proteína-proteína (IPP) e Hub genes. A análise de interação proteína-proteína foi realizada com os DEGs utilizando o software String. A rede de IPP revelou 26 nodos e 43 arestas no folículo DevF2 (Fig. 5a), 28 nodos e 35 arestas no folículo DevF1 (Fig. 5b), 70 nodos e 70 arestas no folículo PostDev (Fig. 5c) e 169 nodos e 440 arestas no folículo PreOv (Fig. 5d). Baseados nos 12 métodos topológicos e na análise de interseção, seis Hub DEGs foram identificados no folículo PostDev (PTPRC, CSF1R, ITGB2, LYN, FN1, NFKBIA). No folículo PreOv foram 19 os Hub DEGs identificados (SYK, PTPRC, FYN, CD4, ZAP70, TNF, LCP2, CD3E, LYN, STAT3, CXCR4, JAK1, IL10, RAC2, CBLB, PIK3CD, LCK, CD28, STAT1). O top 10 dos Hub DEGs considerando o método de análise topológico para o folículo PostDev e PreOv foi incluído no arquivo de dados suplementares ([Supplementary data](#)). Por apresentarem um número reduzido de nodos e arestas na rede PPI, os folículos DevF2 e DevF1 não foram incluídos na análise para identificar os Hub DEGs. A associação dos Hub DEGs, para os folículos PostDev e PreOv, com os principais termos da GO é mostrada (Fig. 6a, b).

Discussão

Nos ovários existem folículos em várias fases de desenvolvimento, que são constituídos por oócitos rodeados pelas camadas da granulosa e da teca, células estas que emitem diferentes sinais moleculares fundamentais para o crescimento e desenvolvimento dos folículos^{20,22}. Apesar de serem amplamente conhecidas as funções das gonadotrofinas e dos esteroides sexuais em cada fase do desenvolvimento folicular, inexistem estudos que tenham avaliado as mudanças no transcriptoma das células da granulosa ao longo do desenvolvimento folicular colhidas em modelo bovino *in vivo*, com classificação e validação das categorias foliculares feitas por perfis morfológico (diâmetro) e hormonal, sendo este o diferencial deste estudo. Este modelo nos permitiu realizar uma análise de RNA-seq comparando o transcriptoma de folículos em fases de DevF2, DevF1, PostDev e PreOv, e assim identificar os genes e prováveis mecanismos moleculares que controlam o desenvolvimento folicular em bovinos.

Um total de 1805 DEGs foram identificados. Interessantemente, a alta ou a baixa expressão dos DEGs foram afetadas pelo estágio de desenvolvimento folicular. Autores relataram aumento na quantidade de DEGs ao longo do desenvolvimento folicular^{23,24}.

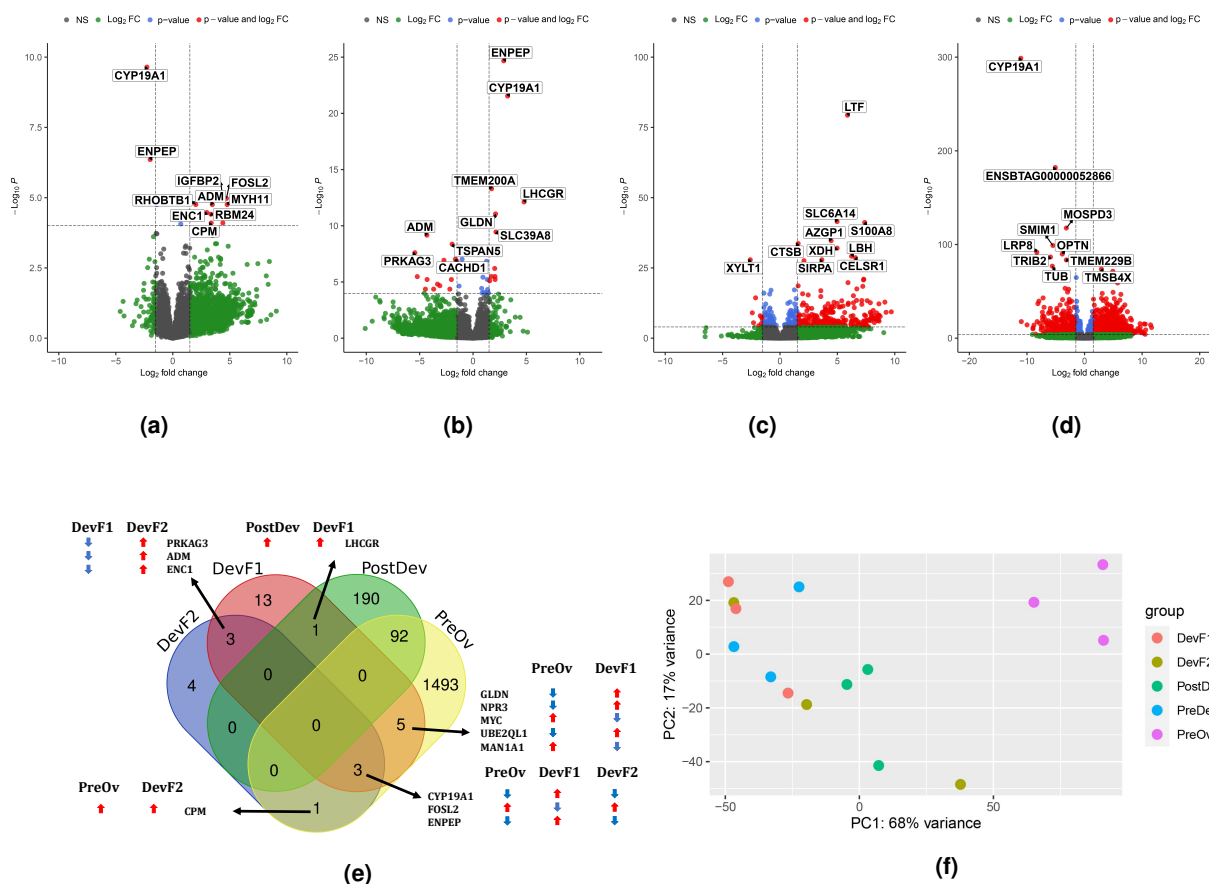


Figure 1. Volcano plot with top ten of DEGs at second largest follicle deviation (DevF2), largest deviation (DevF1), postdeviation (PostDev) and preovulatory (PreOv) follicular stage, (respectively, a - d); the horizontal dotted lines indicates the P-value and the vertical dotted lines indicates the Log2FC, the cutoff was, respectively, $P < 0.0001$ and $\text{Log}_2\text{FC} > 1.5$. In addition, the top 10 DEGs at each follicular stage were indicated by gene symbol. Distribution in Venn diagram of DEGs by follicular stages (e). The upregulated (red arrow) and downregulated (blue arrow) DEGs are shown. Principal component analysis (PCA) of DEGs from follicular stages. Points with the same color represent a follicular stage (f).

Dentre os 105 DEGs conservados, três foram relevantes. PRKAG3, ADM e ENC1 apresentaram-se upregulated no folículo DevF2 quando comparados com o DevF1. Desses DEGs, destaca-se nas células da granulosa, a função da Adrenomedulina (ADM), um peptídeo vaso-relaxante, associado em ratos com a inibição do desenvolvimento folicular em cultivos nos quais foi aplicado FSH²⁵. O gene ADM sintetiza uma proteína do mesmo nome cuja função principal é a vasodilatação²⁶. Além disso, o gene ADM tem sido considerado como pleiotrópico, por possuir atividade em processos vasculares, angiogênicos, de desenvolvimento e crescimento celular, reprodutivos, renais, pulmonares, digestivos, ósseos, imunes e inflamatórios²⁷. A cascata molecular da ADM é mediada pela interação com o heterodímero do receptor semelhante à calcitonina (CLR) e a proteína modificadora da atividade do receptor tipo 2 (RAMP2) e 3 (RAMP3), que se acoplam à ADM 2 e 3, respectivamente. A seguir, o complexo ADM/RAMP2 ou 3/CLR ativa as vias da PI3K, PKA, cGMP e MAPK de forma estímulo dependente²⁸. Em cultivo de células da granulosa, a adição de FSH e FSH + hCG, diminuiu a expressão do gene ADM, porém, aumentou a expressão do gene LHCGR; resultados contrários foram observados com a não adição de FSH e FSH + hCG²⁵. No presente estudo, a expressão diferencial dos genes ADM e CYP19A1, respectivamente, no folículo DevF2 (upregulated e downregulated) e DevF1 (downregulated e upregulated), sugere um papel regulador relevante destes durante o desvio folicular. O mencionado acima, foi complementado pela relação E2:P4²⁹ que indicou ao folículo DevF2 como estrogênio inativo e ao folículo DevF1 como estrogênio ativo.

No folículo DevF1 os principais processos, determinados pela análise GO, estiveram associados com a atividade do receptor

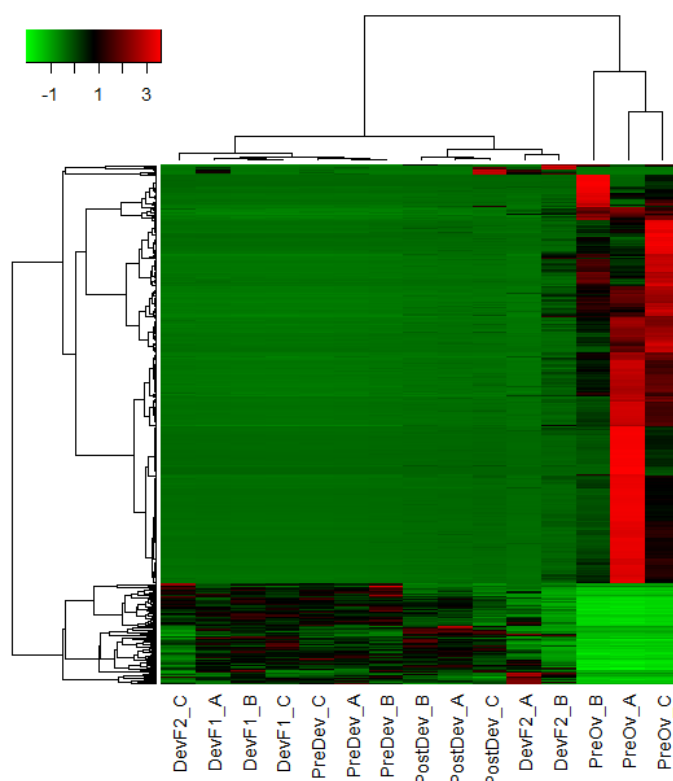
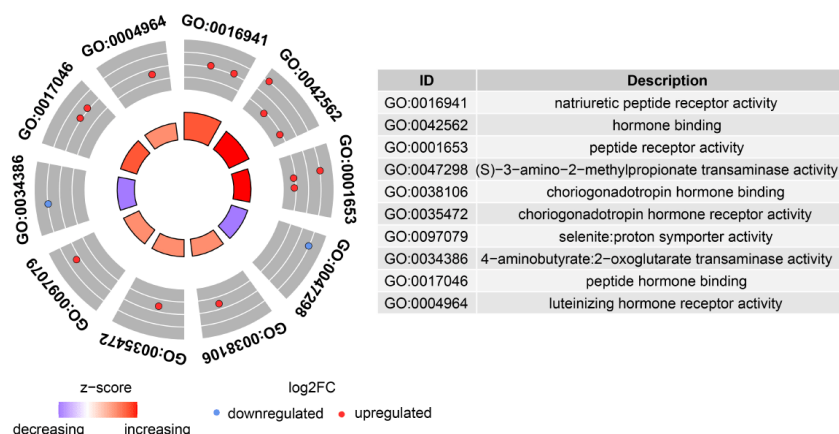


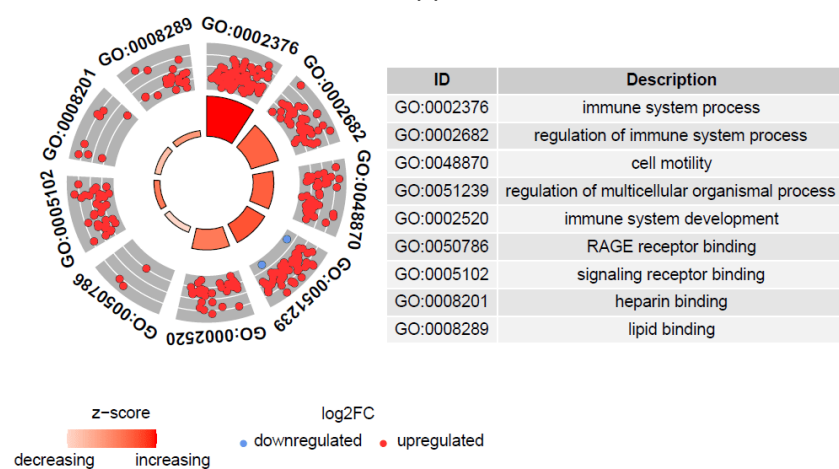
Figure 2. Hierarchical clustering heat map of DEGs (a). DEGs are shown in rows while columns represent samples for each follicular stage. For hierarchical clustering heat map color scale vary from red (higher than mean) to green (lower than mean).

do peptídeo natriurético (NPR1 e NPR3), receptor do hormônio luteinizante (LHCGR) e, por fim, uma associação desses DEGs no processo de união de hormônios (NPR1, NPR3 e LHCGR). Os peptídeos natriuréticos, classificados em peptídeo natriurético atrial (ANP em inglês), peptídeo natriurético cerebral (BNP em inglês) e o peptídeo natriurético C (CNP em inglês), desempenham funções de regulação da pressão arterial e dilatação dos vasos sanguíneos. O NPR1 cumpre funções catalisadoras a nível celular, dado que transforma o GTP em cGMP quando o complexo ANP,BNP-NPR1 é formado. O NPR3 dissipa os peptídeos natriuréticos ANP, BNP e CNP por internalização e posterior degradação³⁰. A função dos genes NPR1 e 3 no desenvolvimento folicular é pouco conhecida. Recentemente, tem sido relatado o aumento da expressão do gene NPR3 no dia do desvio folicular (F1 vs F2), o mesmo resultado foi acompanhado pelo aumento da expressão do NPR1 no dia subsequente ao desvio³¹. Abundância do mRNA de NPR1 decresceu em células da granulosa que receberam tratamento com inibidor do receptor de estradiol (Fulvestrant) após de 12 hrs da administração em folículos de 7-8 mm³¹; resultado relevante posto que o tratamento com Fulvestrant também promove diminuição na expressão de transcritos do gene relacionado com a esteroidogênese CYP19A1³². De acordo com os resultados apresentados acima, no presente estudo observou-se o aumento na expressão dos NPR1 e 3 no folículo DevF1, esses achados sugerem uma ação relevante nas células da granulosa do gene NPR1 e 3 durante o desenvolvimento folicular.

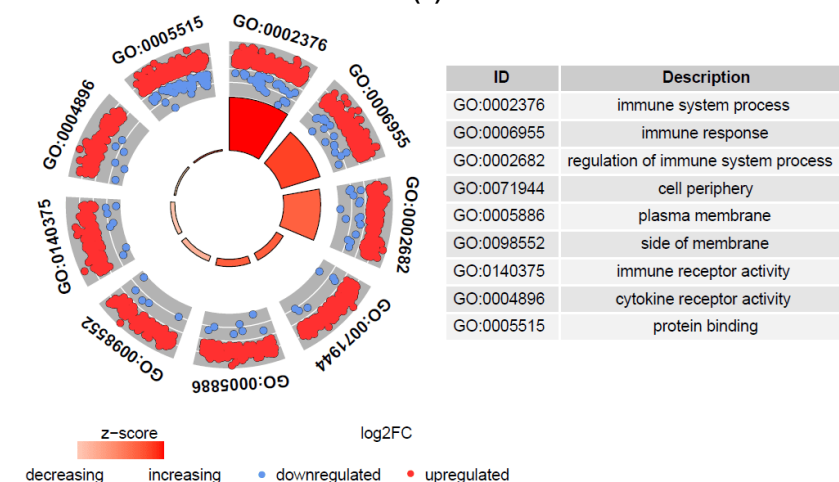
Ao comparar os resultados da GO entre o folículo DevF1 vs PostDev e PreOv foi observado que os processos relacionados ao sistema imune foram acentuados conforme o folículo se desenvolvia. O papel da via imune no desenvolvimento do folículo DevF1 ainda é pouco esclarecido. Alguns genes que cumprem funções relacionadas com as citocinas e receptores celulares (KIT, PDGFC, FGFR2, F2RL2, IL33, IL20RA e ANGPT2) têm sido destacados²⁰. Em contrapartida, em células da granulosa de folículos pre-ovulatórios de bubalinos, foi observado que as vias relacionadas à resposta imune (sinalização das quimiocinas, citotoxicidade mediada pelas células natural killer, fagossomo, e processamento e apresentação de antígenos) estavam enriquecidas com a maioria dos DEGs upregulated³³. Semelhante a esse relato, em nosso estudo, a maioria dos DEGs relacionados à resposta imune, apresentaram-se upregulated no momento da colheita das células da granulosa do folículo PostDev e PreOv. Após o pico de LH a expressão gênica nas células da granulosa é modificada e estimula alterações de endócrinos e moleculares³⁴; contudo, essas mudanças, apresentam variações espécie-específicas quanto a expressão de alguns genes, como por exemplo o PGHS-2, cuja expressão após a administração de gonadotrofina coriônica humana (hCG) acontece de 2-4 h em ratos³⁵, 18 h em vacas³⁶ e 30 h em éguas³⁷. Em síntese, os nossos resultados demonstraram que 24 h após a



(a)



(b)



(c)

Figure 3. GOCircle visualization of DEGs at largest follicle deviation (DevF1), postdeviation (PostDev) and preovulatory (PreOv) follicular stage, respectively (a – c). The functional annotations included molecular function, biological process and cellular complement. For each DEGs Log2FC is represented by dots in each GO term, rings allocated outside show expression levels to Log2FC. Blue dots indicate downregulated genes and red dots indicate upregulated genes. The height in internal ring represent the adjust P-value for each GO term. Z-score is show, blue represent an decrease and red an increase.

Follicular stage	Gene symbol	Gene name	Log2FC	P adjust
DevF2	MYH11	myosin heavy chain 11	4.8	2E-05
	FOSL2	FOS like 2, AP-1 transcription factor subunit	4.7	1E-05
	PRKAG3	protein kinase AMP-activated non-catalytic subunit gamma 3	4.4	8E-05
	IGFBP2	insulin like growth factor binding protein 2	4.4	1E-05
	ADM	adrenomedullin	3.5	2E-05
	CPM	carboxypeptidase M	3.4	8E-05
	RBM24	RNA binding motif protein 24	3.3	4E-05
	ENC1	ectodermal-neural cortex 1	3.0	3E-05
	RHOBTB1	Rho related BTB domain containing 1	2.0	2E-05
DevF1	LHCGR	luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor	4.8	8E-13
	CYP19A1	cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1	3.2	3E-22
	ENPEP	glutamyl aminopeptidase	2.9	2E-25
	SLC39A8	solute carrier family 39 member 8	2.1	4E-10
	GLDN	gliomedin	2.1	9E-12
	NPR1	natriuretic peptide receptor 1	2.1	6E-06
	NPR3	natriuretic peptide receptor 3	2.1	3E-06
	NABP1	nucleic acid binding protein 1	2.0	6E-07
	TMEM200A	transmembrane protein 200A	1.7	5E-14
	EIF4EBP1	eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1	1.7	3E-06
PostDev	ENSBTAG00000052981	uncharacterized	9.7	4E-10
	AQP5	aquaporin 5	9.2	6E-10
	KRT5	keratin 5	9.1	1E-13
	EDAR	ectodysplasin A receptor	8.7	2E-08
	BPIFB1	BPI fold containing family B member 1	8.6	9E-07
	ENSBTAG00000025920	uncharacterized	8.6	7E-09
	NTS	neurotensin	8.6	6E-13
	C25H16orf89	chromosome 25 C16orf89 homolog	8.6	7E-09
	IVL	involucrin	8.6	3E-07
PreOv	LY6G6C	lymphocyte antigen 6 family member G6C	8.5	5E-07
	CLEC10A	C-type lectin domain containing 10A	11.6	4E-12
	AQP9	aquaporin 9	11.5	6E-15
	SCN2A	sodium voltage-gated channel alpha subunit 2	10.6	2E-09
	CSRP3	cysteine and glycine rich protein 3	10.5	1E-15
	FFAR2	free fatty acid receptor 2	10.5	6E-05
	TNC	tenascin C	10.4	6E-16
	ENSBTAG00000053740	uncharacterized	10.2	4E-06
	PTX3	pentraxin 3	10.0	1E-07
	GPR50	G protein-coupled receptor 50	9.9	1E-06
	CEBPE	CCAAT enhancer binding protein epsilon	9.7	2E-08

Table 1. Top ten (Log2FC) of DEGs upregulated at each follicular stage. Only nine upregulated DEGs were observed in the DevF2 follicular stage.

administração de GnRH, o perfil transcriptômico do folículo PreOv, considerando a análise de GO, já apresentava acentuação das vias relacionadas à resposta imune e inflamatória, análogo do observado em estudo do nosso laboratório que estudando o perfil proteômico, demonstrou que as vias inflamatórias e relacionadas ao sistema imune ainda estavam upregulated nos momentos PostDev e PreOv²⁹.

No folículo PostDev, a análise de GO, revelou o receptor de produtos finais de glicação avançada (RAGE receptor binding) como um dos processos notáveis do enriquecimento funcional. Os DEGs S100A12, S100A8 e S100A4 foram associados ao RAGE. Após uma reação não enzimática da glicose com proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, são formados produtos finais de glicação avançada (AGEs)³⁸. A presença de AGEs tem sido associada com doenças renais³⁹, cardíacas⁴⁰, reprodutivas⁴¹ e diabetes⁴². Os AGEs afetam a viabilidade celular ao unirem-se aos RAGE. O complexo AGE-RAGE induz inflamação celular mediante a ativação das Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)⁴³ que, subsequentemente, induzem a apoptose⁴⁴. Tem sido

Follicular stage	Gene symbol	Gene name	Log2FC	P adjust
DevF2	CYP19A1	cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1	-2.3	2E-10
	ENPEP	glutamyl aminopeptidase	-2.0	4E-07
DevF1	PRKAG3	protein kinase AMP-activated non-catalytic subunit gamma 3	-5.4	2E-08
	LRRC17	leucine rich repeat containing 17	-5.2	3E-06
	FOSL2	FOS like 2, AP-1 transcription factor subunit	-4.5	4E-05
	ADM	adrenomedullin	-4.3	7E-10
	CDH10	cadherin 10	-4.3	6E-06
	SLC22A16	solute carrier family 22 member 16	-3.7	4E-05
	MAN1A1	mannosidase alpha class 1A member 1	-3.3	2E-05
	ENC1	ectodermal-neural cortex 1	-3.1	2E-05
	MYC	MYC proto-onco, bHLH transcription factor	-2.7	1E-07
	PLXDC2	plexin domain containing 2	-2.2	4E-05
	XYLT1	xylosyltransferase 1	-2.6	1E-28
PostDev	AP3B2	adaptor related protein complex 3 subunit beta 2	-2.4	9E-10
	ADAMTS9	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 9	-2.3	3E-06
	CPXM1	carboxypeptidase X, M14 family member 1	-2.1	4E-15
	PKD2L1	polycystin 2 like 1, transient receptor potential cation channel	-1.9	4E-05
	KCNE5	potassium voltage-gated channel subfamily E regulatory subunit 5	-1.7	1E-08
	ARMH4	armadillo like helical domain containing 4	-1.6	7E-06
	GUCA1A	guanylate cyclase activator 1A	-1.6	8E-05
	ADAM23	ADAM metalloproteinase domain 23	-1.6	4E-08
	SRGN	serglycin	-1.5	2E-07
	CYP19A1	cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1	-11.1	2E-299
PreOv	CALB2	calbindin 2 [Source:VGNC Symbol]	-11.0	2E-18
	GRM8	glutamate metabotropic receptor 8 [Source:NCBI gene]	-10.0	6E-15
	FAM110D	family with sequence similarity 110 member D	-9.0	1E-10
	SLC5A11	solute carrier family 5 member 11	-8.9	9E-12
	ENSBTAG00000051408	uncharacterized	-8.8	1E-14
	GP2	glycoprotein 2	-8.5	4E-05
	LRP8	LDL receptor related protein 8	-8.3	2E-92
	NPR3	natriuretic peptide receptor 3	-8.2	2E-18
	CHST8	carbohydrate sulfotransferase 8	-8.1	1E-37

Table 2. Top ten (Log2FC) of DEGs downregulated at each follicular stage. Only two downregulated DEGs were observed in the DevF2 follicular stage.

demonstrado que a expressão imunofluorescente do RAGE em células da granulosa diminui conforme o folículo aumenta de diâmetro⁴⁵. Um outro mecanismo de resposta celular associada com a expressão do complexo AGE-RAGE é a migração leucocitária⁴⁶ que é orquestrada pela ativação do fator de transcrição NFκB⁴⁷. Em nosso estudo, os DEGs incluídos no termo RAGE foram upregulated no folículo PostDev que precede ao folículo pre-ovulatório. O papel do RAGE no folículo PostDev de nosso estudo, pode ser explicado devido à resposta inflamatória aguda, resposta que inclui leucócitos e, que aumenta, quando o folículo esta próximo à ovulação⁴⁸.

A análise topológica da rede PPI no folículo PostDev revelou como Hub os DEGs PTPRC, CSF1R, ITGB2, LYN, FN1 e NFKBIA. Todos esses DEGs foram upregulated e, de acordo com as suas funções, caracterizaram uma resposta imune e de motilidade celular. O gene PTPRC mostrou ser um gene com destacada ação central na rede PPI e interagiu de forma direta com os genes CSF1R e LYN. O gene PTPRC estimula a produção da proteína tipo receptor-tirosina fosfatase C que modula a resposta imune ao se ligar ao dipeptidil peptidase 4 (DPP4) e ativar as células T⁴⁹. Uma outra modulação imune que, é estendida à inflamação, pode ser associada com a expressão do gene CSF1R, que é estimulado pelas citocinas pró-inflamatórias seguido da liberação de IL34 e o Fator 1 de liberação de colônias de macrófagos (CSF1), essa sequência de eventos moleculares permitem a produção, diferenciação e função dos macrófagos, importantes estes, no desenvolvimento folicular⁵⁰⁻⁵². Em machos, a mutação do gene CSF1, resultou em indivíduos com menor produção de testosterona circulante e intratesticular⁵³. Defeitos também foram observados em fêmeas (camundongos), as quais apresentaram menor taxa de prenhes e de ovulação⁵⁴.

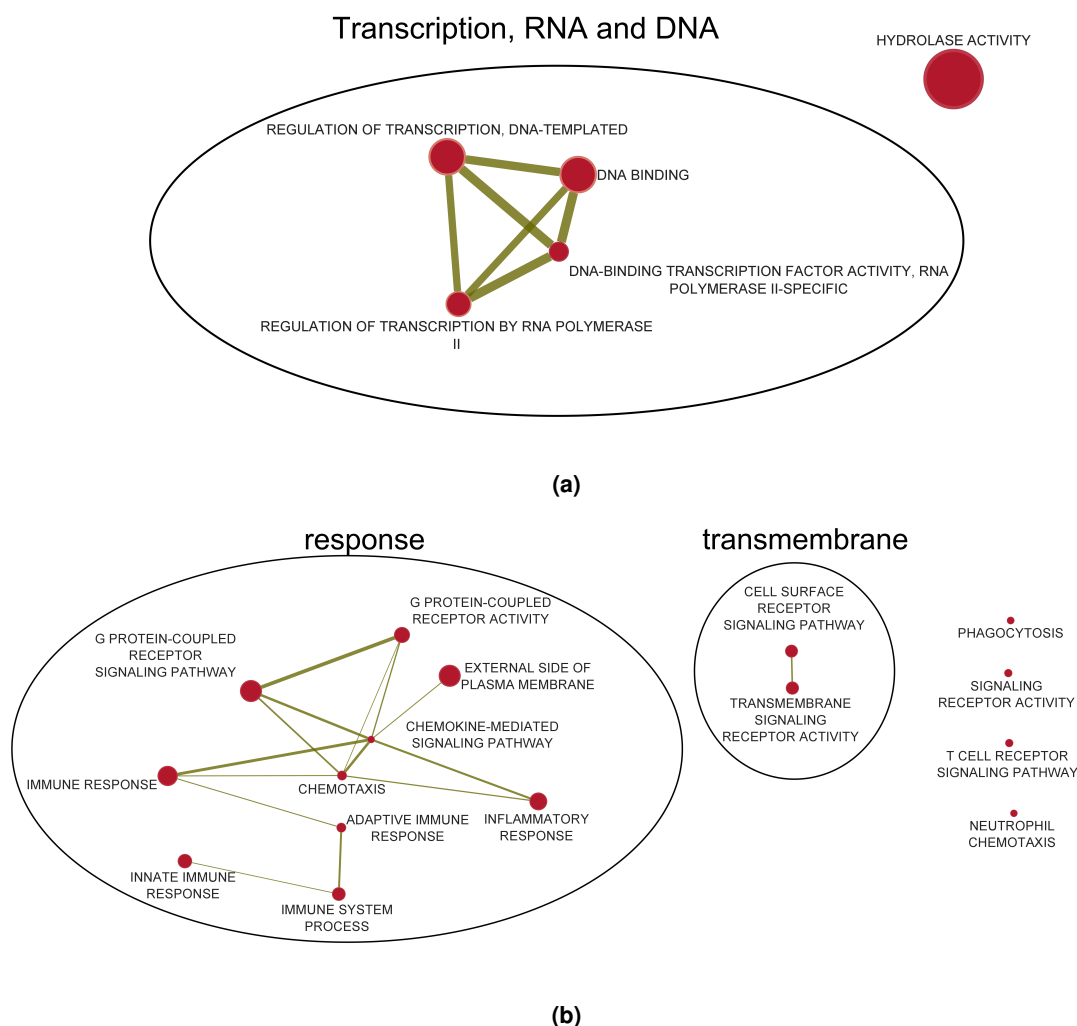


Figure 4. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) plot for postdeviation (PostDev) and preovulatory (Preov) follicular stage, respectively (a, b). The enrichment analysis was performed using the Enrichment Map plugin of Cytoscape²¹. Nodes indicate the gene set enriched. The size of the nodes represents the number of genes associated with the enriched gene set and the red color of the nodes represents a positive correlation. The overlap of genes shared among nodes is indicated by lines. Autoannotate plugin (Cytoscape) was used to encircled grouped gene sets.

A ausência do gene CSF1 leva a um recrutamento deficiente de macrófagos que se associa com um deficiente pico de estradiol no soro demonstrando um efeito na esteroidogênese e, consequentemente, na ovulação⁵². Outro Hub DEG relevante foi o Integrin Subunit Beta 2 (ITGB2), membro da família das integrinas. Compete às integrinas funções de adesão, migração e manutenção da integridade celular⁵⁵. Em aves, relatos prévios mostraram que patos com postura superior apresentam um aumento da abundância de transcritos do gene ITGB2⁵⁶. Do mesmo modo, em porcos, o tamanho do folículo foi associado com a presença de algumas integrinas, entre essas, o ITGB2⁵⁷. Em bovinos, foi observada a diminuição na expressão do gene ITGB2 em células da teca interna de folículos atresícos quando comparado com folículos saudáveis (5 mm)²⁰. O DGEs LYN também foi identificado em nosso estudo. Em ovelhas, a expressão do gene LYN manteve estreita relação com as funções de regulação da via de sinalização do receptor de células B, regulação negativa da ativação celular e regulação da imunidade mediada por leucócitos⁵⁸.

No folículo PreOv, a análise da topologia genica da rede PPI, identificou como os principais Hub DEGs a SYK, PTPRC,

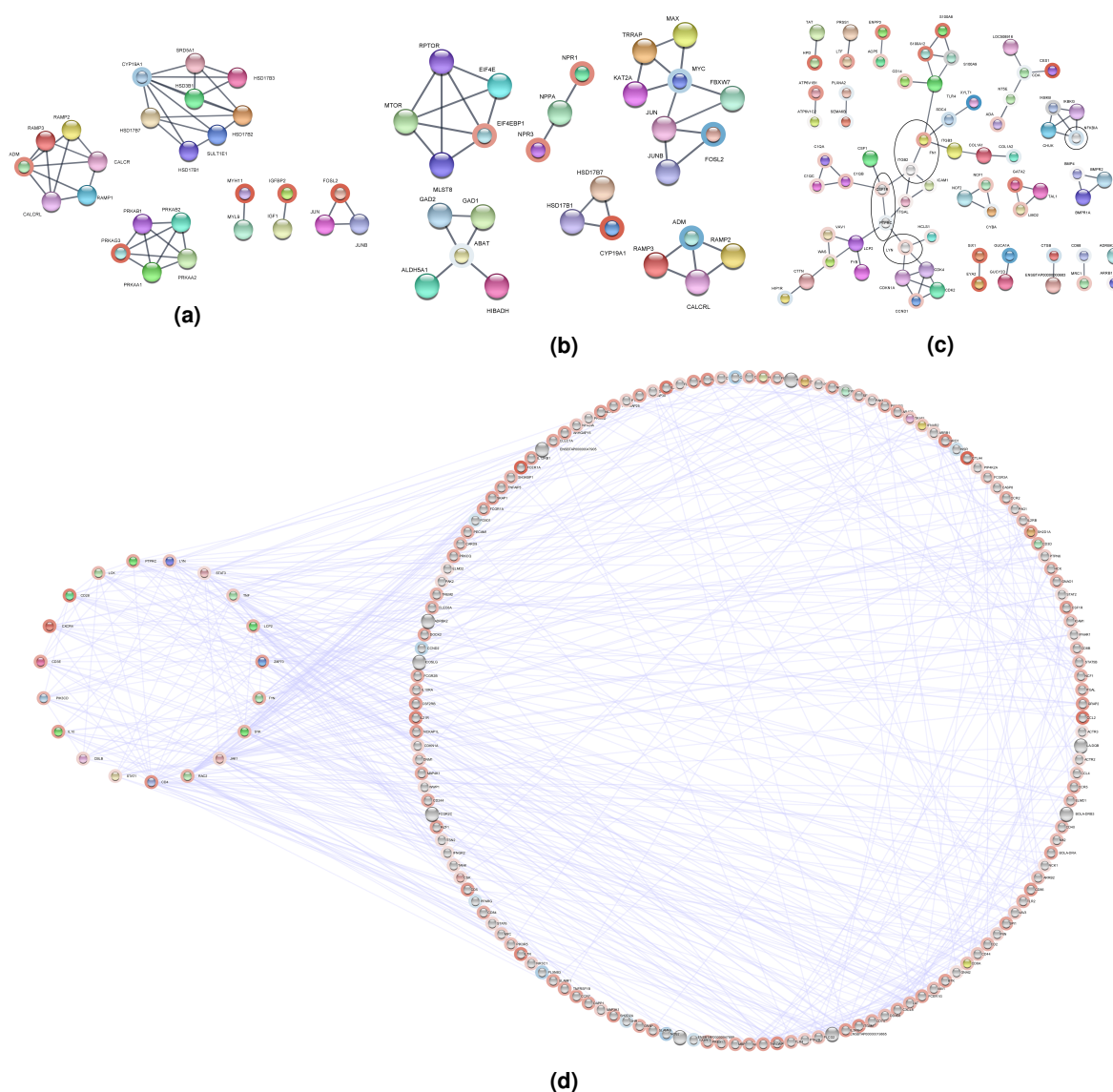


Figure 5. Protein-protein interaction (PPI) and Hub DEGs at second largest deviation follicle (DevF2), largest deviation follicle (DevF1), postdeviation (PostDev) and preovulatory (PreOv) follicular stages, respectively (a - d). For each follicular stage, topological analysis was performed using the cytoHubba plugin set with 12 methods. DEGs were identified by a red (upregulated) or blue (downregulated) border.

FYN, CD4, ZAP70, TNF, LCP2, CD3E, LYN, STAT3, CXCR4, JAK1, IL10, RAC2, CBLB, PIK3CD, LCK, CD28 e STAT1. A família das proteínas tirosina quinases, formada pelos DEGs SYK, PTPRC, FYN, ZAP70, JAK1, PIK3CD e LCK, possui ampla associação com doenças, dentro das quais destaca-se o câncer⁵⁹. Adicionalmente, as proteínas tirosina quinases, catalisam processos celulares que estimulam a diferenciação celular, crescimento, adesão, motilidade, apoptose e respostas inflamatórias.^{59,60} Em ovelhas e, comparando o transcriptoma de folículos pequenos em fase folicular e luteal (3 mm), foi demonstrado um perfil inflamatório semelhante ao observado no presente estudo, apesar de ser resultado do transcriptoma do folículo PreOv⁶⁰. Os DEGs que foram identificados no folículo pequeno (3 mm) de ovelhas e no presente estudo, no folículo PreOv, foram CD4, FYN, SYK e CD28; em estudos esses genes foram sobre expressos e relacionados com a sinalização da resposta inflamatória⁶⁰. Em nosso trabalho, apesar do folículo PreOv ser estrogênio inativo (E2:P4 0.14)²⁹ a resposta celular avaliada pela expressão dos genes, demonstrou não ser diferente do folículo PostDev, uma vez que em ambos os folículos, preponderou uma resposta imune mediada por fatores inflamatórios.

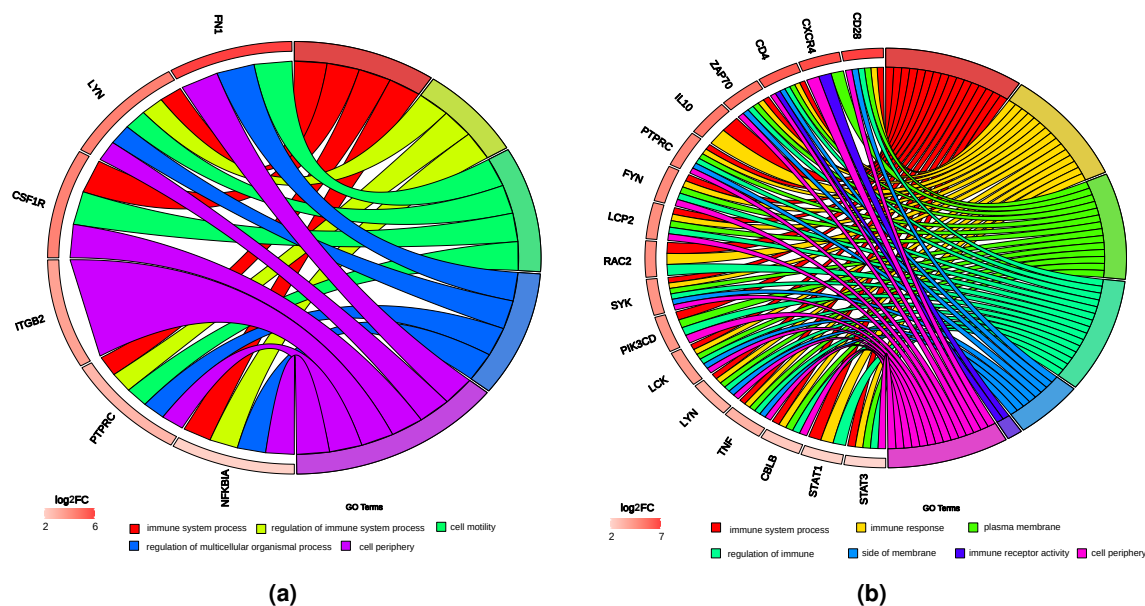


Figure 6. Circular plot of GO in PostDev (a) and PreOv (b) follicle stage. The Hub DEGs are linked to GO terms. For each Hub DEGs the log2FC is shown.

Conclusões

A análise do transcriptoma das células da granulosa de bovinos, permitiu compreender as principais mudanças moleculares através da identificação dos Hub genes envolvidos no desenvolvimento folicular que, caracterizaram uma mediação vascular (DevF1) e inflamatória (PostDev e PreOv). Por fim, os resultados do nosso estudo constituem uma ampla variedade de biomarcadores genéticos que poderão ser empregados em pesquisas futuras que abordem o desenvolvimento folicular em bovinos.

Métodos

Animais e delineamento experimental. Dezoito vacas multíparas da raça Holandesa, com idade entre 3 e 7 anos e escore corporal 3.5⁶¹, foram utilizadas no estudo. O plano nutricional foi baseado em pastagem livre (*Brachiaria decumbens*), ração total, suplementação mineral e água *ad libitum*.

A sincronização da ovulação foi realizada empregando-se o protocolo Ovsynch⁶² acompanhado da colocação de um dispositivo intravaginal de progesterona (Sincrogest, Ourofino, Cravinhos, Brazil). Das 18 vacas, 10 ovularam e foram incluídas no estudo. A partir da detecção da ovulação pós sincronização, foi realizada ultrassonografia ovariana transretal a cada 12 horas (MyLab30 equipped with a 7.5 MHz linear array transducer, Esaote, Genova, Italy) com o objetivo de determinar a emergência da nova onda folicular. O desenvolvimento dos folículos foi acompanhado e no momento esperado para a ocorrência do pré-desvio (PreDev; F1 ~ 7.0 mm)³ os folículos foram aspirados; imediatamente após, todos os demais folículos foram ablados. O desenvolvimento de uma nova onda foi acompanhado e o folículo caracterizado como o maior no desvio (DevF1 ~ 8.5 mm)⁴ e segundo maior no desvio (DevF2) foram individualmente aspirados. Imediatamente após, todos os demais folículos foram ablados. Novamente, a desenvolvimento de uma nova onda folicular monitorado e o F1 aspirado logo após alcançar um diâmetro compatível com a aquisição de capacidade ovulatória (PostDev) (F1 ~ 12.0 mm)⁵. A seguir as vacas foram novamente submetidas ao protocolo de sincronização já descrito, sendo que desta vez 13 ovularam. A onda folicular emergente após o protocolo foi novamente acompanhada; quando o F1 alcançou o diâmetro de ~ 14 mm (PreOv) foi realizada a administração intramuscular de 50 µg de GnRH (Gestran Plus, São Paulo, Brasil) sendo o mesmo aspirado 24 h depois.

Os procedimentos de aspiração folicular, dosagem e manuseio das amostras foram realizados segundo o descrito²⁹. O fluido folicular foi submetido à centrifugação a 2000 g a 4°C/10 min, sendo a seguir armazenados separadamente o sobrenadante e o pellet (células da granulosa) a -80°C. Antes do armazenamento, as células da granulosa foram acondicionadas em criotubos contendo 350 µL de Tampão de Lise (RNEasy). No fluido folicular (DevF2, DevF1, PostDev e PreOv) foi determinada a concentração de progesterona e estradiol empregando-se a técnica de ELISA.

Sequenciamento de RNA. Para a análise RNAseq das células da granulosa foram selecionadas apenas amostras provenientes de fluidos foliculares que cumpriram os seguintes critérios: ausência de sangue, relação de E2/P4 > 1 nos DevF1 (n = 3), PostDev (n = 3) e < 1 para Dev F2 (n = 3) e PreOv (n = 3)⁶³. O sequenciamento de RNA das amostras foi realizado usando o TruSeq RNA Sample Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA) seguindo as instruções do fabricante no Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD), parte da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Brevemente, 2 µg de RNA total de cada amostra de células da granulosa foi usado para preparação da biblioteca. A concentração e pureza do RNA foi medida usando NanoDrop™ (Thermo Scientific, Waltham, MA) e a integridade foi avaliada pelo Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA). O RNAm foi primeiro enriquecido a partir do RNA total utilizando esferas magnéticas oligo dT e, em seguida, o RNA poli (A) foi fragmentado e o cDNA sintetizado. Reparação final do cDNA foi realizada. Os finais 3' foram adenilados e os adaptadores de código de barras universais foram ligados aos fragmentos de cDNA para executar uma fase sólida de PCR e produzir a biblioteca de sequenciamento. A biblioteca de sequenciamento foi avaliada e quantificada utilizando Agilent 2100 Bioanalyzer e PCR quantitativo com a KAPA Biblioteca Quantificação kit (KAPA Biosystems, Foster City, CA, EUA). Finalmente, as bibliotecas foram reunidas para executar o sequenciamento de multiplexação usando HiSeq SBS v4 High Output Kit. A geração de cluster e o sequenciamento foram realizados no Illumina HiSeq 2500. Foram produzidos 2 × 125 pb reads pair-end.

Indexação e alinhamento do genoma. A indexação do genoma de referência (*Bos taurus* ARS-UCD1.2), assim como, o alinhamento das leituras com o genoma indexado, foi realizada empregando-se o STAR⁶⁴. O número de leituras por gene foi determinado com a configuração quantMode and twopassMode do pacote STAR.

Estatística e análise bioinformática. Após obtenção das leituras, os grupos foram analisados usando o script do programa DESeq2, pacote do R/Bioconductor, R programming language (v 4.0.2). Após a normalização dos dados. Os transcritos cujas amostras tinham as contagens normalizadas médias inferiores a 5 foram removidos. Sobre o teste foi aplicada a correção de FDR Benjamini para múltiplos testes a fim de evitar o erro tipo I. Os genes foram considerados DEGs quando o valor de log2fold change foi > 1.5 e FDR foi < 0.0001. A comparação do transcriptoma entre os folículos foi estabelecida gradativamente (PreDev vs DevF2; DevF2 vs DevF1; DevF1 vs PostDev e PostDev vs PreOv). A comparação do transcriptoma PreDev vs DevF1 não foi considerada nas análises devido à presença de um único DEG. O diagrama de Venn incluiu os DEGs não conservados e conservados nos diferentes folículos. O mapa de calor e a análise de componentes principais (PCA) foram realizados, respectivamente, utilizando o pacote Heatmap3 e plotPCA R programming language (v 4.0.2).

Ontologia gênica (GO) e a análise de enriquecimento de conjunto de genes (GSEA). Análise de enriquecimento funcional foi realizada utilizando [g:Profiler](#). Apenas genes com anotações foram considerados, o teste estatístico foi Benjamini-Hochberg FDR com significância $p < 0.05$. Os termos da GO foram organizados e ilustrados com o pacote [GOpilot](#). O software [GSEA](#) foi usado para realizar o enriquecimento de conjunto de genes (GSEA). A GSEA foi realizada com os DEGs dos folículos PostDev e PreOv com a configuração preranked ajustada para um número de permutações de 1000, estatística de enriquecimento weighted e tamanho mínimo e máximo de 15 e 500 genes. O p valor e o FDR Q estabelecidos, foram $p < 0.05$ e $p < 0.1$, respectivamente. A similaridade foi determinada com o coeficiente de sobreposição com constata combinada de 0.5. Após a conclusão da GSEA, o plugin Enrichment map foi utilizado e a rede desenhada no [Cytoscape](#). Os folículos DevF1 e PostDev não foram incluídos nos resultados devido a que análise previa as vias apresentaram valores FDR $P > 0.05$.

Interação proteína-proteína e Hub genes. Para cada folículo foi gerada uma rede de interações proteína-proteína (PPI) utilizando o software [String](#) versão 11.5. As configurações da rede incluíram comunicação dos nodos baseada em evidências, fontes de interação (textmining, experiments, databases, co-expression) e escore de interação de 0.900. Uma vez criada a rede foi exportada a [Cytoscape](#) e os DEGs Hub determinados utilizando o pacote [cytohubba](#)⁶⁵. Para cada figura da PPI foram considerados os métodos topológicos: Maximal clique centrality (MCC), density of maximum neighborhood component (DMNC), maximum neighborhood component (MNC), degree, edge percolated component (EPC), bottleneck (BN), eccentricity, closeness, radiality, betweenness, stress e clustering coefficient. O top 20 dos DEGs em cada método foram selecionados e, após uma análise de intersecção, os DEGs que foram identificados em pelo menos cinco métodos foram definidos como Hub DEGs. A análise da GO dos Hub DEGs no folículo PostDev e PreOv foi realizada empregando-se o pacote [GOpilot](#)⁶⁶.

References

1. Richards, J. S., Pangas, S. A. *et al.* The ovary: basic biology and clinical implications. *The J. clinical investigation* **120**, 963–972 (2010).
2. Aerts, J. & Bols, P. Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. part i: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. *Reproduction domestic animals* **45**, 171–179 (2010).

3. Kulick, L., Bergfelt, D., Kot, K. & Ginther, O. Follicle selection in cattle: follicle deviation and codominance within sequential waves. *Biol. reproduction* **65**, 839–846 (2001).
4. Ginther, O. The theory of follicle selection in cattle. *Domest. animal endocrinology* **57**, 85–99 (2016).
5. Sartori, R., Fricke, P. M., Ferreira, J. C., Ginther, O. & Wiltbank, M. C. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biol. Reproduction* **65**, 1403–1409 (2001).
6. Beg, M., Bergfelt, D., Kot, K., Wiltbank, M. & Ginther, O. Follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. *Biol. reproduction* **64**, 432–441 (2001).
7. Buratini Jr, J. *et al.* Expression and function of fibroblast growth factor 10 and its receptor, fibroblast growth factor receptor 2b, in bovine follicles. *Biol. reproduction* **77**, 743–750 (2007).
8. Portela, V. M. *et al.* Expression and function of fibroblast growth factor 18 in the ovarian follicle in cattle. *Biol. reproduction* **83**, 339–346 (2010).
9. Lan, D. *et al.* Rna-seq analysis of yak ovary: improving yak gene structure information and mining reproduction-related genes. *Sci. China Life sciences* **57**, 925–935 (2014).
10. Hernández-Montiel, W., Collí-Dula, R. C., Ramón-Ugalde, J. P., Martínez-Núñez, M. A. & Zamora-Bustillos, R. Rna-seq transcriptome analysis in ovarian tissue of pelibuey breed to explore the regulation of prolificacy. *Genes* **10**, 358 (2019).
11. Chen, H. Y. *et al.* Differential gene expression in ovaries of qira black sheep and hetian sheep using rna-seq technique. *PloS one* **10**, e0120170 (2015).
12. Liu, Y. *et al.* Identification of transcriptome differences in goat ovaries at the follicular phase and the luteal phase using an rna-seq method. *Theriogenology* **158**, 239–249 (2020).
13. Bian, X. *et al.* Transcriptional changes of mouse ovary during follicle initial or cyclic recruitment mediated by extra hormone treatment. *Life Sci.* **264**, 118654 (2021).
14. Puttabyatappa, M. *et al.* Developmental programming: Sheep granulosa and theca cell-specific transcriptional regulation by prenatal testosterone. *Endocrinology* **161** (2020).
15. Yang, M. *et al.* Transcriptional analysis of deoxynivalenol-induced apoptosis of sow ovarian granulosa cell. *Reproduction Domest. Animals* **55**, 217–228 (2020).
16. Donadeu, F. X. *et al.* Transcriptome profiling of granulosa and theca cells during dominant follicle development in the horse. *Biol. reproduction* **91**, 111–1 (2014).
17. Li, P. *et al.* Transcriptome analysis of bovine ovarian follicles at predeviation and onset of deviation stages of a follicular wave. *Int. journal genomics* **2016** (2016).
18. Romereim, S. M. *et al.* Gene expression profiling of bovine ovarian follicular and luteal cells provides insight into cellular identities and functions. *Mol. cellular endocrinology* **439**, 379–394 (2017).
19. Hatzirodos, N., Hummitzsch, K., Irving-Rodgers, H. F. & Rodgers, R. J. Transcriptome comparisons identify new cell markers for theca interna and granulosa cells from small and large antral ovarian follicles. *PLoS One* **10**, e0119800 (2015).
20. Hatzirodos, N. *et al.* Transcriptome profiling of granulosa cells of bovine ovarian follicles during growth from small to large antral sizes. *BMC genomics* **15**, 1–19 (2014).
21. Merico, D., Isserlin, R., Stueker, O., Emili, A. & Bader, G. D. Enrichment map: a network-based method for gene-set enrichment visualization and interpretation. *PloS one* **5**, e13984 (2010).
22. Dalanezi, F. M. *et al.* Extracellular vesicles of follicular fluid from heat-stressed cows modify the gene expression of in vitro-matured oocytes. *Animal reproduction science* **205**, 94–104 (2019).
23. Li, Q. *et al.* mrna and mirna transcriptome profiling of granulosa and theca layers from geese ovarian follicles reveals the crucial pathways and interaction networks for regulation of follicle selection. *Front. genetics* **10**, 988 (2019).
24. Skinner, M. K., Schmidt, M., Savenkova, M. I., Sadler-Riggelman, I. & Nilsson, E. E. Regulation of granulosa and theca cell transcriptomes during ovarian antral follicle development. *Mol. reproduction development* **75**, 1457–1472 (2008).
25. Abe, K. *et al.* Expression and effect of adrenomedullin on rat granulosa cell. *Endocrinology* **139**, 5263–5266 (1998).
26. Kitamura, K. *et al.* Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem. biophysical research communications* **192**, 553–560 (1993).
27. Patel, P. *et al.* Adrenomedullin: a novel peptide hormone. a review. *J Pharmacogn Phytochem.* **6**, 2068–2073 (2017).

28. Ihara, M., Washida, K., Yoshimoto, T. & Saito, S. Adrenomedullin: a vasoactive agent for sporadic and hereditary vascular cognitive impairment. *Cereb. Circ. Behav.* 100007 (2021).
29. Ferrazza, R. d. A. *et al.* Quantitative proteomic profiling of bovine follicular fluid during follicle development. *Biol. reproduction* **97**, 835–849 (2017).
30. Kato, J. Natriuretic peptides. (2014).
31. De Cesaro, M. *et al.* Natriuretic peptide system regulation in granulosa cells during follicle deviation and ovulation in cattle. *Reproduction domestic animals* **53**, 710–717 (2018).
32. Rovani, M. T. *et al.* Expression and molecular consequences of inhibition of estrogen receptors in granulosa cells of bovine follicles. *J. ovarian research* **7**, 1–9 (2014).
33. Li, J. *et al.* Transcriptome studies of granulosa cells at different stages of ovarian follicular development in buffalo. *Animal reproduction science* **187**, 181–192 (2017).
34. Gilbert, I., Robert, C., Dieleman, S., Blondin, P. & Sirard, M.-A. Transcriptional effect of the lh surge in bovine granulosa cells during the peri-ovulation period. *Reproduction* **141**, 193–205 (2011).
35. Sirois, J., Simmons, D. & Richards, J. Hormonal regulation of messenger ribonucleic acid encoding a novel isoform of prostaglandin endoperoxide h synthase in rat preovulatory follicles. induction in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.* **267**, 11586–11592 (1992).
36. Sirois, J. Induction of prostaglandin endoperoxide synthase-2 by human chorionic gonadotropin in bovine preovulatory follicles in vivo. *Endocrinology* **135**, 841–848 (1994).
37. Boerboom, D. & Sirois, J. Molecular characterization of equine prostaglandin g/h synthase-2 and regulation of its messenger ribonucleic acid in preovulatory follicles. *Endocrinology* **139**, 1662–1670 (1998).
38. Piperi, C., Adamopoulos, C., Dalagiorgou, G., Diamanti-Kandarakis, E. & Papavassiliou, A. G. Crosstalk between advanced glycation and endoplasmic reticulum stress: emerging therapeutic targeting for metabolic diseases. *The J. Clin. Endocrinol. & Metab.* **97**, 2231–2242 (2012).
39. Bohlender, J. M., Franke, S., Stein, G. & Wolf, G. Advanced glycation end products and the kidney. *Am. J. Physiol. Physiol.* **289**, F645–F659 (2005).
40. Yan, S. F., Ramasamy, R. & Schmidt, A. M. The receptor for advanced glycation endproducts (rage) and cardiovascular disease. *Expert. reviews molecular medicine* **11** (2009).
41. Diamanti-Kandarakis, E., Piperi, C., Kalofoutis, A. & Creatsas, G. Increased levels of serum advanced glycation end-products in women with polycystic ovary syndrome. *Clin. endocrinology* **62**, 37–43 (2005).
42. Unoki, H. & Yamagishi, S.-i. Advanced glycation end products and insulin resistance. *Curr. Pharm. Des.* **14**, 987–989 (2008).
43. Huang, Y. *et al.* Inflamm-aging: a new mechanism affecting premature ovarian insufficiency. *J. immunology research* **2019** (2019).
44. Merhi, Z., Buyuk, E. & Cipolla, M. Advanced glycation end products alter steroidogenic gene expression by granulosa cells: an effect partially reversible by vitamin d. *MHR: Basic science reproductive medicine* **24**, 318–326 (2018).
45. Goldsammmler, M., Merhi, Z., Thornton, K., Charron, M. & Buyuk, E. Ovarian rage expression changes with follicular development and superovulation. *Fertility Steril.* **110**, e122 (2018).
46. Chavakis, T. *et al.* The pattern recognition receptor (rage) is a counterreceptor for leukocyte integrins a novel pathway for inflammatory cell recruitment. *The J. experimental medicine* **198**, 1507–1515 (2003).
47. Bierhaus, A. *et al.* Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kb. *Diabetes* **50**, 2792–2808 (2001).
48. Townson, D. H. & Liptak, A. R. Chemokines in the corpus luteum: implications of leukocyte chemotaxis. *Reproductive biology endocrinology* **1**, 1–7 (2003).
49. Wu, L., Fu, J. & Shen, S.-H. Skap55 coupled with cd45 positively regulates t-cell receptor-mediated gene transcription. *Mol. cellular biology* **22**, 2673–2686 (2002).
50. Garcia, S. *et al.* Colony-stimulating factor (csf) 1 receptor blockade reduces inflammation in human and murine models of rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy* **18**, 1–14 (2016).

51. Lin, W. *et al.* Function of csf1 and il34 in macrophage homeostasis, inflammation, and cancer. *Front. immunology* **10** (2019).
52. Brännström, M. u. & Norman, R. Involvement of leukocytes and cytokines in the ovulatory process and corpus luteum function. *Hum. Reproduction* **8**, 1762–1775 (1993).
53. Cohen, P. E., Chisholm, O., Arceci, R. J., Richard Stanley, E. & Pollard, J. W. Absence of colony-stimulating factor-1 in osteopetrotic (csfmop/csfmop) mice results in male fertility defects. *Biol. reproduction* **55**, 310–317 (1996).
54. Cohen, P. E., Zhu, L. & Pollard, J. W. Absence of colony stimulating factor-1 in osteopetrotic (csfmop/csfmop) mice disrupts estrous cycles and ovulation. *Biol. reproduction* **56**, 110–118 (1997).
55. Goldfinger, L. Integrin signaling. In Lennarz, W. J. & Lane, M. D. (eds.) *Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition)*, 608–612, DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00447-3> (Academic Press, Waltham, 2013), second edition edn.
56. Sun, Y. *et al.* Identification of differentially expressed genes and signalling pathways in the ovary of higher and lower laying ducks. *Br. Poult. Sci.* **61**, 609–614 (2020).
57. Antosik, P. *et al.* Expression of integrins and gdf9 mrnas is associated with ovarian follicle size and donor puberty status in pigs. *Med Weter* **72**, 750–754 (2016).
58. Talebi, R., Ahmadi, A. & Afraz, F. Analysis of protein-protein interaction network based on transcriptome profiling of ovine granulosa cells identifies candidate genes in cyclic recruitment of ovarian follicles. *J. animal science technology* **60**, 1–7 (2018).
59. Robinson, D. R., Wu, Y.-M. & Lin, S.-F. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* **19**, 5548–5557 (2000).
60. Talebi, R. *et al.* Transcriptome analysis of ovine granulosa cells reveals differences between small antral follicles collected during the follicular and luteal phases. *Theriogenology* **108**, 103–117 (2018).
61. Edmonson, A., Lean, I., Weaver, L., Farver, T. & Webster, G. A body condition scoring chart for holstein dairy cows. *J. dairy science* **72**, 68–78 (1989).
62. Pursley, J., Mee, M. & Wiltbank, M. Synchronization of ovulation in dairy cows using pgf2 α and gnrrh. *Theriogenology* **44**, 915–923 (1995).
63. Ireland, J. & Roche, J. Development of antral follicles in cattle after prostaglandin-induced luteolysis: changes in serum hormones, steroids in follicular fluid, and gonadotropin receptors. *Endocrinology* **111**, 2077–2086 (1982).
64. Dobin, A. *et al.* Star: ultrafast universal rna-seq aligner. *Bioinformatics* **29**, 15–21 (2013).
65. Chin, C.-H. *et al.* cytohubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome. *BMC systems biology* **8**, 1–7 (2014).
66. Walter, W., Sánchez-Cabo, F. & Ricote, M. Gplot: an r package for visually combining expression data with functional analysis. *Bioinformatics* **31**, 2912–2914 (2015).

Acknowledgements (not compulsory)

This work was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP), Brazil (grant number 2012/18297-7) and doctoral fellowship to the first author (Student Program-Postgraduate Agreement - PEC-PG; grant number 190043/2017-2)

The authors thank for the support of the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Brazil (financing code 001).

Author contributions statement

HDMG: conducted experiment, conceptualization, methodology, investigation, software, data curation, writing, bioinformatic analysis, review and editing. **RAF:** conducted experiment, conceptualization, methodology, investigation, software, data curation, writing, review and editing. **FFA:** methodology, review and editing and bioinformatic analysis. **RSF:** conceptualization, writing and review and editing. **PMV:** methodology and bioinformatic analysis. **JCPF:** Conceptualization, methodology, investigation, writing and review and editing.

Additional information

To include, in this order: **Accession codes** (where applicable); **Competing interests** (mandatory statement).

The corresponding author is responsible for submitting a [competing interests statement](#) on behalf of all authors of the paper. This statement must be included in the submitted article file.

Supplementary Information

[Supplementary data](#)