



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**MARCADORES BIOQUÍMICOS PARA A COMPETÊNCIA  
OVOCITÁRIA EM BOVINOS**

**NAYARA RIBEIRO KUSSANO**

**BRASÍLIA, DF**

**2022**

**NAYARA RIBEIRO KUSSANO**

**MARCADORES BIOQUÍMICOS PARA A COMPETÊNCIA  
OVOCITÁRIA EM BOVINOS**

Tese submetida ao programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biologia Animal.

**Orientadora: Margot Alves Nunes Dode**

**BRASÍLIA, DF**

**2022**

**NAYARA RIBEIRO KUSSANO**

**MARCADORES BIOQUÍMICOS PARA A COMPETÊNCIA  
OVOCITÁRIA EM BOVINOS**

Tese submetida ao programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biologia Animal.

**Orientadora: Margot Alves Nunes Dode**

Banca examinadora:

Profa. Dra. Margot Alves Nunes Dode (Orientadora Embrapa/UnB)

Profa. Dra. Carolina Madeira Lucci (Membro interno /UnB)

Prof. Dr. Maurício Machaim Franco (Membro externo Embrapa/UFU)

Prof. Dr. José Felipe Warmling Sprícigo (Membro externo/UFG)

Suplente: Dr. Ivo Pivato (membro interno /UnB)

**BRASÍLIA, DF**

**2022**

*“Dizem que a vida é para quem sabe viver, mas ninguém nasce pronto. A vida é para quem é corajoso o suficiente para se arriscar e humilde o bastante para aprender.”*

**- Clarice Lispector**

## AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pela saúde e pelas oportunidades. Por sempre estar comigo.

À minha “MÃE” **MARINA**, aos meus **irmãos Marilyn e Thiago**, por sempre terem me apoiado e dado força nos meus sonhos. Obrigada por todo o incentivo, ajuda e compreensão, sem vocês nada disso seria possível!!!!

À minha orientadora **Dra. Margot Alves Nunes Dode**, pelos ensinamentos diários, pela paciência, pelos incentivos, pela amizade e pela confiança. SEREI SEMPRE GRATA POR TUDO!!!!

Ao **Dr. Maurício Machaim Franco**, por toda ajuda e ensinamentos na Molecular. Muito Obrigada!

À Ligiane por toda ajuda, amizade e ensinamentos dentro e fora do laboratório, Muito Obrigada!!

À Isabella Grisi (ISAAA), por toda ajuda dentro do laboratório, pela amizade leve, pelos conselhos, pelo cuidado e preocupação que sempre teve por mim. Muito Obrigada!!

Aos pesquisadores do LRA, alunos e funcionários da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia por toda a ajuda, pela amizade diária e pelos momentos de distração.

A TODOS os amigos feitos em Brasília, que serão sempre lembrados!

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CAPES, CnPQ, pelo apoio financeiro.

À Universidade de Brasília, e ao Instituto de Ciências Biológicas (IB), pelo curso oferecido.

## Índice

<b>Capítulos/subcapítulos</b>	<b>página</b>
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE FIGURAS	xv
LISTA DE ANEXOS	18
CAPÍTULO 1. Introdução e revisão de literatura	19
1. INTRODUÇÃO GERAL	20
1.1. Objetivos	22
1.1.1. Objetivo geral	22
1.1.2. Objetivos específicos	22
1.2. Hipóteses	22
2. REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1. Maturação e competência ovocitária	23
2.2. Ambiente folicular	25
2.3. Indicadores para a competência ovocitária:	26
2.3.1. Diâmetro folicular	26
2.3.2. Ovócito	27
2.3.3. Células do <i>cumulus</i> e células da <i>granulosa</i>	29
2.3.4. Líquido folicular	33
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
CAPÍTULO 2. Protein source in maturation media affects gene expression in cumulus cells and embryo development in cattle	51
1. RESUMO EXPANDIDO	52
1.1. Resumo	52
1.2. Introdução	52
1.3. Material e métodos	53
1.4. Resultados	53
1.5. Referências bibliográficas	54
2. ARTICLE 1. Protein source in maturation media affects gene expression in cumulus cells and embryo development in cattle	56
2.1. Abstract	56

2.2. Introduction	57
2.3. Material and methods	59
2.4. Experimental design	64
2.5 Statistical analysis	66
2.6. Results	67
2.7 Discussion	74
2.8. References	79
CAPÍTULO 3. Características bioquímicas do ambiente folicular para predizer a competência de ovócitos bovinos	88
RESUMO	89
ABSTRACT	91
1. INTRODUÇÃO	93
2. MATERIAL E MÉTODOS	95
2.1 Coleta e processamento das amostras	95
2.2 Maturação, fecundação e cultivo <i>in vitro</i>	97
2.3 Extração de RNA de células do <i>cumulus</i> e células da granulosa e síntese de cDNA	99
2.4 Extração e quantificação de cell-free DNA de líquido folicular	100
2.5 Dosagem de Progesterona e Estradiol	102
3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	102
3.1 Experimento 1: Quantificação de transcritos de genes candidatos a marcadores em células do <i>cumulus</i> e células da granulosa	103
3.2 Experimento 2: Quantificação de cell-free DNA presente no líquido folicular	103
3.3 Experimento 3: Dosagem de progesterona e estradiol do líquido folicular	104
4. Análise estatística	104
RESULTADOS	105
DISCUSSÕES	111
CONCLUSÕES	116
REREFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116
CONSIDERAÇÕES FINAIS	124

## RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar a associação de características bioquímicas do ambiente folicular com a capacidade do ovócito de formar embrião, identificando marcadores para selecionar ovócitos mais competentes. Inicialmente, foi avaliado se a fonte proteica (FP) utilizada durante a maturação *in vitro* (MIV) afetaria o perfil de expressão de genes candidatos a marcadores nas células do cumulus (CC) e no desenvolvimento embrionário. Complexos-cumulus-ovócitos (CCOs) foram maturados na presença de soro fetal bovino (SFB) ou albumina sérica bovina (BSA), sendo que biopsias de CC foram removidas antes e após a MIV. Os CCOs foram então fecundados e os embriões cultivados na presença de SFB ou BSA. As CCs foram então agrupadas em: CCs de CCOs imaturos e CCs de CCOs maturados que resultaram ou não em embriões. O efeito da FP durante a MIV foi determinado pela quantificação de transcritos dos genes GPC4, VCAN, GHR, PTGS2 e ALCAM. Os resultados mostraram que a FP somente afetou a produção de embriões quando SFB foi usado tanto na MIV quanto no CIV ( $P < 0,05$ ). Além disso, a FP durante a MIV afetou a expressão dos genes VCAN, GHR, PTGS2 e ALCAM nas CCs. O gene GHR foi único que apresentou relação ( $P < 0,05$ ) com a produção de embrião e somente quando o SFB foi usado na MIV. Posteriormente, foram avaliadas características bioquímicas de folículo contendo ovócitos capazes ou não de formar embrião. Folículos de 5-6mm foram dissecados e de cada folículo foram coletados individualmente amostras de líquido folicular (LF), células da granulosa (CG), CC imaturas e maturadas, e os CCOs foram utilizados para a produção de embriões. As amostras foram agrupadas em: CCOs que originaram embrião (EMB) e os que não originaram (NEMB). Nas CC imaturas e maduras e nas CGs foi quantificada, por qPCR, a expressão de 8 genes: CASP3, SERPINE2, VCAN, LUM, FSHR, EGFR, PGR e GHR. No LF foi avaliado DNA livre de células (cfDNA), por quantificação das sequências de ART2 e BOVTA por qPCR e a concentração de progesterona e estradiol por quimiluminescência e eletroquimioluminescência, respectivamente. Dos 8 genes avaliados, o gene GHR foi mais expresso em CCs imaturas de CCOs do grupo EMB e CASP3 mais expresso nas CC maduras do grupo NEMB ( $< 0,05$ ). Na avaliação do comportamento dos genes durante a MIV, observou-se que houve um aumento da expressão dos genes CASP3 e GHR nesse período apenas no grupo NEMB. Já o gene VCAN aumentou a expressão nas CC do grupo EMB ( $P < 0,05$ ). As

análises do LF, mostraram maior quantidade ( $P < 0,05$ ) de cfDNA do gene ART2 no LF do grupo NEMB comparado ao do EMB. Já para o gene BOVTA nenhuma diferença ( $P > 0,05$ ) foi encontrada entre os grupos. A concentração de progesterona no LF foi similar entre os grupos EMB (164,5ng/mL) e NEMB (152,8ng/mL), enquanto a de estradiol foi maior ( $P < 0,05$ ) no grupo EMB (33,14ng/mL) comparado ao grupo NEMB (3,73ng/mL). Quando a relação E2/P4 foi avaliada constatou-se que essa foi maior no grupo EMB ( $P < 0,05$ ). Conclui-se que a FP pode afetar o desenvolvimento embrionário quando o SFB é usado na MIV e CIV, e também influencia a expressão de genes nas CCs gene. Além disso, o maior nível de transcritos de GHR em CC imaturas, a menor expressão de CASP3 em CC maduras, menor nível do gene ART2, a concentração de Estradiol e a relação de E2/P4 no LF podem indicar ovócitos com maior potencial de desenvolvimento.

**Palavras-chave:** cell-free DNA, líquido folicular, embrião, células foliculares

## ABSTRACT

This study aimed to evaluate the association of biochemical characteristics of the follicular environment with the capacity of the oocyte to form an embryo, identifying markers to select more competent oocytes. Initially, it was evaluated whether the protein source (FP) used during in vitro maturation (IVM) would affect the expression profile of candidate genes in cumulus cells (CC) and the embryo development. Cumulus-oocyte complexes (COCs) were matured in the presence of fetal bovine serum (FBS) or bovine serum albumin (BSA), and CC biopsies were removed before and after IVM. The COCs were then fertilized and the embryos cultured in the presence of FBS or BSA. CCs were then grouped into: CCs from immature COCs and CCs from mature COCs that did or did not result in embryos. The effect of FP during IVM was determined by quantifying GPC4, VCAN, GHR, PTGS2 and ALCAM gene transcripts. Results showed that FP only affected embryo production when FBS was used in both IVM and IVC ( $P < 0.05$ ). Furthermore, FP during IVM affected the expression of VCAN, GHR, PTGS2 and ALCAM genes in CCs. The GHR gene was the only one that showed a relationship ( $P < 0.05$ ) with embryo production, but only when FBS was used in IVM. Subsequently, biochemical characteristics of follicle containing oocytes capable or not of forming an embryo were evaluated. Follicles of 5-6mm were dissected and from each follicle samples of follicular fluid (LF), granulosa cells (GC), immature and mature CC were collected individually, and the COCs were used for embryos production. Samples were grouped into: those that COCs originated an embryo (EMB) and those that did not (NEMB). In immature and mature CCs and in GCs, the expression of 8 genes was quantified by qPCR: CASP3, SERPINE2, VCAN, LUM, FSHR, EGFR, PGR and GHR. In LF, cell-free DNA (cfDNA) was evaluated by quantification of ART2 and BOVTA sequences by qPCR, and the concentration of progesterone and estradiol by chemiluminescence and electrochemiluminescence, respectively. Of the 8 genes evaluated, the GHR gene was more expressed in immature CCs from the EMB group and CASP3 was more expressed in the mature CCs from the NEMB group ( $< 0.05$ ). In evaluating the behavior of the genes during IVM, it was observed that during this period there was an increase in the expression of the CASP3 and GHR genes only in the NEMB group. The VCAN gene increased CC expression in the EMB group ( $P < 0.05$ ). The LF analyzes showed a greater amount ( $P < 0.05$ ) of cfDNA from the ART2 gene in the LF of the NEMB group compared to the EMB. As for the BOVTA gene, no

difference ( $P>0.05$ ) was found between the groups. The concentration of progesterone in LF was similar between the EMB (164.5ng/mL) and NEMB (152.8ng/mL) groups, while the estradiol concentration was higher ( $P<0.05$ ) in the EMB group (33.14ng/mL) compared to the NEMB group (3.73ng/mL). When the E2/P4 ratio was evaluated, it was found that it was higher in the EMB group ( $P<0.05$ ) than in the NEMB. It is concluded that FP can affect embryonic development when FBS in IVM and CIV, and also influences the expression of genes in CCs gene. In addition, the highest level of GHR transcripts in immature CCs, the lowest expression of CASP3 in mature CCs, the lowest level of the ART2 gene, the Estradiol concentration and the E2/P4 ratio in the LF may indicate oocytes with greater development potential.

**Keywords:** cell-free DNA, follicular fluid, embryo, follicular cells

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTB -  $\beta$ -Actina

ALCAM - *Activated leukocyte cell adhesion molecule*

BCB - *Brilliant Cresyl Blue*

BSA - Albumina sérica bovina

CASP3 - Caspase 3

CC - Células do *cumulus*

CCO - Complexo–*cumulus* -ovócito

CIV - Cultivo *in vitro*

CfDNA - *Cell free DNA*

CG - Células da granulosa

EDTA - Ácidoetilendiamino tetra-acético

EGFR - Receptor de fator de crescimento epidermal

E<sub>2</sub> - Estradiol

FSHR - Receptor de hormônio folículo estimulante

FIV - Fecundação *in vitro*

FP - Fonte proteica

GAPDH - *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*

GFP - *Green fluorescent protein*

GHR - Receptor do hormônio de crescimento

GPC4 - Glicana 4

LF - Líquido folicular

LUM - *Lumican*

MIV - Maturação *in vitro*

NaCl - Cloreto de Sódio

PBS - Solução salina em tampão fosfato

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PGR - Receptor de progesterona

PIVE - Produção *in vitro* de embriões

PPIA - *Peptidylprolylisomerase A*

P<sub>4</sub> - Progesterona

PTGS2 - Prostaglandin-endoperoxidase sintase 2

qPCR - Reação em cadeia pela polymerase quantitativa em tempo real

RNA - Ácido ribonucleico

RNase - Ribonuclease

SERPINE2 - Serpina pertencente à família E, membro 2

SFB - Soro Fetal Bovino

SOF - Fluido sintético de oviduto

TALP - *Tyrode's Albumin Lactate and Pyruvate*

TCM-199 - Meio de cultura de tecidos -199

TRAs - Tecnologias de reprodução assistida

VCAN - *Versican*

## LISTA DE TABELAS

Título	Página
<b>Capítulo 2:</b>	
<b>Table 1.</b> Primer sequences, annealing temperatures, amplicon sizes in base pairs (bp), and reference GenBank accession numbers.	63
<b>Table 2.</b> Embryo development of bovine oocytes that were allowed to undergo <i>in vitro</i> maturation (IVM) in the presence of fetal bovine serum (FBS) or bovine serum albumin (BSA) and were <i>in vitro</i> cultured in the presence of FBS up to day 8 of development.	66
<b>Table 3.</b> Embryo development of bovine oocytes that were allowed to undergo <i>in vitro</i> maturation (IVM) in the presence of fetal bovine serum (FBS) or bovine serum albumin (BSA) and were <i>in vitro</i> cultured in the presence of BSA up to day 8 of development.	66
<b>Table 4.</b> Sex of bovine embryos that originated from oocytes that were allowed to undergo <i>in vitro</i> maturation (IVM) in the presence of fetal bovine serum (FBS) or bovine serum albumin (BSA) and were <i>in vitro</i> cultured in the presence of FBS up to day 8 of development.	67
<b>Table 5.</b> Sex of bovine embryos that originated from oocytes that were allowed to undergo <i>in vitro</i> maturation (IVM) in the presence of fetal bovine serum (FBS) or bovine serum albumin (BSA) and were <i>in vitro</i> cultured in the presence of BSA up to day 8 of development.	67
<b>Capítulo 3:</b>	
<b>Tabela 1.</b> Sequência dos oligonucleotídeos, temperatura de anelamento e tamanho dos fragmentos em pares de base (pb) e referência de acesso ao <i>GenBank</i> .	99
<b>Tabela 2.</b> Sequência dos oligonucleotídeos, concentração do primer e tamanho dos fragmentos em pares de base (pb)	101

## LISTA DE FIGURAS

Título	Página
<b>Capítulo 2:</b>	
<b>Figure 1.</b> Transcript levels of glypican (GPC4), versican (VCAN), activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM), prostaglandin-endoperoxidase sintase 2 (PTGS2), and growth hormone receptor (GHR) genes were analyzed using RT-qPCR in cumulus cells (CCs) obtained from bovine cumulus-oocyte-complexes (COCs) of three groups: 1) Immature COCs (IMMATURE); 2) COCs matured in the presence of FBS (IVM FBS); 3) COCs matured in the presence of BSA (IVM BSA). Each group had four pools of CCs and each pool was analyzed in triplicate. Data have been expressed as mean±SD.	68
<b>Figure 2.</b> Transcript levels of glypican (GPC4), versican (VCAN), activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM), prostaglandin-endoperoxidase sintase 2 (PTGS2), and growth hormone receptor (GHR) genes analyzed using RT-qPCR in cumulus cells obtained from bovine cumulus-oocyte-complexes (COCs) of three groups: 1) Immature COCs (IMMATURE); 2) <i>In vitro</i> matured COCs that developed to the blastocyst stage (CCMEM); 3) <i>In vitro</i> matured COCs that did not develop to the blastocyst stage (CCMNEM). Data have been expressed as mean±SD.	69
<b>Figure 3.</b> Transcript levels of glypican (GPC4), versican (VCAN), activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM), prostaglandin-endoperoxidase sintase 2 (PTGS2), and growth hormone receptor (GHR) were analyzed using RT-qPCR in cumulus cells obtained from bovine cumulus-oocyte-complexes (COCs) of five groups: 1) Immature COCs (IMMATURE); 2) Mature COCs that formed expanded blastocysts on day 8 and were matured in the presence of FBS (CCMEFBS); 3) Mature COCs that formed expanded blastocysts on day 8 and were matured in the presence of BSA (CCMEBSA); 4) Mature COCs that did not reach the blastocyst stage and were matured in the presence of FBS (CCMNFBS); 5) Mature COCs that did not reach the blastocyst stage and were matured in the presence of BSA (CCMNBSA). Each group had four pools of samples and was evaluated in triplicate. The data have been expressed as mean±SD.	71
<b>Figure 4.</b> Transcript levels of glypican (GPC4), versican (VCAN), activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM), prostaglandin-endoperoxidase sintase 2 (PTGS2), and growth hormone receptor (GHR) were analyzed using RT-qPCR in cumulus cells obtained from bovine cumulus-oocyte-complexes (COCs) of four groups: 1) Immature COCs that formed expanded blastocysts on day 8 and were matured in the presence of FBS (CCIEFBS); 2) Immature COCs that formed expanded blastocysts on day 8 and were matured in the presence of BSA (CCIEBSA); 3) Immature COCs that did not reach the blastocyst stage and were matured in the presence of FBS (CCINFBS); 4) Immature COCs that did not reach the blastocyst stage and were matured in the presence of BSA (CCINBSA). Each group had four pools of samples and was evaluated in triplicate. The data have been expressed as mean±SD.	72
<b>Capítulo 3:</b>	
<b>Figura 1:</b> A: Ovário antes da dissecação. B: Folículos dissecados.	94

- Figura 2:** A/B: Líquido folicular coletado após ruptura individual do folículo. 95  
C:Complexo-cumulus-ovócito recuperado após ruptura do folículo.
- Figura 3:** A/B: Complexo-cumulus-ovócito recuperado após ruptura do 95  
folículo (A) e transferido para gota de meio para ser feita a biopsia de CC (B).  
C:Complexo-cumulus-ovócito após realização da biopsia das CC.
- Figura 4.** Cultivo individual de Complexos-cumulus-ovócitos em microgota de 97  
20 $\mu$ L.
- Figura 5:** Amostras individualmente coletadas e armazenadas de cada 97  
folículo manipulado: líquido folicular, células da granulosa (CG), células do  
cumulus (CC) imaturas e maturadas.
- Figura 6.** Nível de transcritos dos genes CASP3 (Caspase 3), SERPINE2 105  
(Serpina pertencente à família E, membro 2), VCAN (Versican), LUM  
(Lumican), FSHR (Receptor de hormônio folículo estimulante), EGFR  
(Receptor de fator de crescimento epidermal), PGR (Receptor de  
progesterona) e GHR (Receptor do hormônio de crescimento) em células do  
cumulus imaturas coletadas de complexos-cumulus-ovócitos (CCOs) que  
deram origem a embrião no D8 (CCI EMB) e de CCOs que clivaram, mas não  
chegaram ao estágio de Blastocisto (CCI NEMB). Para cada grupo foram  
utilizados quatro pools de amostras, avaliados em triplicata. Os dados são  
expressos como média $\pm$ desvio padrão.
- Figura 7** Nível de transcritos dos genes CASP3 (Caspase 3), SERPINE2 106  
(Serpina pertencente à família E, membro 2), VCAN (Versican), LUM  
(Lumican), FSHR (Receptor de hormônio folículo estimulante), EGFR  
(Receptor de fator de crescimento epidermal), PGR (Receptor de  
progesterona) e GHR (Receptor do hormônio de crescimento) em células do  
cumulus maturadas, coletadas de complexos-cumulus-ovócitos (CCOs) que  
deram origem a blastocisto no D8 (CCM EMB) e de CCOs que clivaram, mas  
não chegaram ao estágio de blastocisto (CCM NEMB). Para cada grupo foram  
utilizados quatro pools de amostras, avaliados em triplicata. Os dados foram  
expressos como média $\pm$ desvio padrão.
- Figura 8.** Nível de transcritos dos genes CASP3 (Caspase 3), SERPINE2 107  
(Serpina pertencente à família E, membro 2), VCAN (Versican), LUM  
(Lumican), FSHR (Receptor de hormônio folículo estimulante), EGFR  
(Receptor de fator de crescimento epidermal), PGR (Receptor de  
progesterona) e GHR (Receptor do hormônio de crescimento) em células do  
cumulus imaturas coletadas de complexos-cumulus-ovócitos (CCOs) que  
deram origem a embrião no D8 (CCI EMB), em células do cumulus maturadas,  
coletadas de CCOs que deram origem a embrião no D8 (CCM EMB), CC  
imaturas de CCOs que clivaram, mas não chegaram ao estágio de blastocisto  
(CCI NEMB) e CC maturadas de CCOs que clivaram, mas não chegaram ao  
estágio de blastocisto (CCM NEMB). Para cada grupo foram utilizados quatro  
pools de amostras, avaliados em triplicata. Os dados foram expressos como  
média $\pm$ desvio padrão.
- Figura 9.** Nível de transcritos dos genes CASP3, SERPINE2, VCAN, LUM, 108  
FSHR, EGFR, PGR e GHR em células da granulosa obtidas de folículos  
ovarianos de onde foram coletados complexos-cumulus-ovócitos (CCOs) que  
deram origem a embrião no D8 (CG EMB) e de CCOs que clivaram, mas não  
chegaram ao estágio de blastocisto (CG NEMB). Para cada grupo foram

utilizados quatro pools de amostras, avaliados em triplicata. Os dados foram expressos como média±desvio padrão.

**Figura 10.** Quantificação dos genes ART2 e BOVTA em amostras de líquido folicular onde foram coletados complexos-cumulus-ovócitos (CCOs) que se desenvolveram até embrião no D8 (EMB) e CCOs que clivaram, mas não chegaram ao estágio de blastocisto no D8 (NEMB). Cada grupo teve 30 amostras avaliadas. Os dados foram expressos como média± desvio padrão. 109

**Figura 11.** Concentração de Progesterona e Estradiol no líquido folicular, de folículos que continham complexo-cumulus-ovócitos (CCOs) que se desenvolveram até embrião no D8 (EMB) e CCOs que clivaram, mas não chegaram ao estágio de blastocisto no D8 (NEMB). E a relação entre Progesterona e Estradiol (E2/P4). Para cada grupo foram analisados quatro pools de 15 amostras. Os dados foram expressos como média± desvio padrão. 109

**LISTA DE ANEXOS**

Número	Título	Página
<b>1</b>	Protocolo de extração de RNA para células do <i>cumulus</i> e células da granulosa	127
<b>2</b>	Protocolo síntese de cDNA	130
<b>3</b>	Protocolo para preparo de reação de qPCR	131

## **CAPÍTULO 1**

### **INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA**

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotécnica reprodutiva, rotineiramente utilizada em bovinos. É uma técnica considerada bem estabelecida apresentando índices de produção de embriões e de gestação em torno de 40 a 50%, respectivamente. Apesar dos avanços obtidos nesta biotécnica, esses índices de produção têm se mantido estáveis nos últimos anos (KUSSANO et al., 2016; SANCHES et al., 2016; VIANA et al., 2017; LACERDA et al., 2020; KUSSANO et al., 2021). Um dos principais fatores responsáveis pela falta de incremento nessas taxas é a qualidade e/ou nível de competência dos ovócitos que são selecionados para serem utilizados na maturação *in vitro* (MIV). Isso porque os ovócitos imaturos obtidos pela aspiração folicular advêm de uma população heterogênea de folículos, que contêm ovócitos com diferentes graus de competência. E, somente aqueles mais competentes conseguem completar a maturação e ter um desenvolvimento embrionário normal (SIRARD et al., 2003; LONERGAN et al. 2003).

Após a aspiração os ovócitos recuperados são selecionados para a PIVE baseado apenas em critérios morfológicos. Entretanto, a avaliação morfológica é insuficiente para diferenciar os mais competentes dos menos competentes (LONERGAN et al., 2003, KRISHER 2004, COTOCCHIO et al., 2004). Portanto, para que se possa aumentar a eficiência da PIVE tanto em animais como em humanos, é fundamental buscar outros parâmetros além dos morfológicos, que indiquem com maior precisão os ovócitos com mais potencial de formar um embrião, permitindo uma seleção mais acurada.

Sabe-se que o crescimento do ovócito é influenciado pela atividade funcional das células somáticas adjacentes, e é durante o estágio de folículo pré-antral que ocorre a maior parte desse crescimento. Com a formação do antro folicular as células da granulosa (CG) se diferenciam em duas linhagens anatomicamente e funcionalmente distintas, as células do *cumulus* (CC) que possuem íntimo contato com o ovócito e as células da granulosa murais que se aderem à parede do folículo exercendo importante papel na esteroidogênese. As CC estão em contato direto com o ovócito através de projeções trans-zonais e junções gap, os quais permitem a transferências de moléculas que são necessárias para regular o ciclo meiótico, o crescimento e a maturação do ovócito (YEO et al., 2009). Portanto, um ambiente folicular saudável é fundamental para que o ovócito adquira a sua competência e,

conseqüentemente, tenha sucesso na fecundação e no desenvolvimento embrionário (BUCCIONE et al. 1990, EPPIG, 2001). Esse ambiente saudável depende da contribuição balanceada de vários componentes, tais como hormônios, fatores de crescimento, eletrólitos, metabolitos e proteínas. Desta forma, os componentes do ambiente folicular tais como o líquido folicular (LF) e as células foliculares podem refletir a qualidade do ovócito e são potenciais fontes de marcadores para a sua qualidade.

O LF é um fluido biológico complexo, com diferentes fatores tais como eletrólitos, RNAs, proteínas, aminoácidos, peptídeos, açúcares, hormônios, fatores de crescimento, metabolitos e vesículas extracelulares (VEs), sendo uma rota de comunicação autócrina e parácrina entre células da teca, CG, CC e ovócito (GOSDEN et al., 1988; REVELLI et al., 2009). Os compostos presentes neste fluido estão correlacionados com o estágio de crescimento folicular e o potencial de desenvolvimento do ovócito (REVELLI et al., 2009; SOHEL et al., 2013). Alguns componentes tais como Glicina, L-glutamato, L-alanina e as concentrações de estradiol e progesterona já foram identificados como sendo indicadores da qualidade dos ovócitos (MATOBA et al., 2014, TEISSIER, et al., 2000, BURATINI et al., 2005). E, mais recentemente, a presença e quantificação de *cell-free* DNA (cfDNA) e de microRNAs (miRNAs) específicos têm sido caracterizados e identificados (MORENO et al., 2015; ANDRADE et al., 2017; MACHTINGER et al., 2017; ICHIKAWA et al., 2019; LATIF et al., 2020; PAN et al., 2021).

Além do líquido folicular, as CC e células da parede folicular também fazem parte do ambiente folicular se comunicando direta ou indiretamente com os ovócitos. Essas, portanto, também podem refletir o *status* de saúde ou de desenvolvimento em que os ovócitos se encontram. Sendo assim, vários estudos têm focado em tentar identificar diferenças existentes entre ovócitos competentes e incompetentes, utilizando, por exemplo, a análise da expressão de genes em CC (CAIXETA et al., 2009; MATOBA et al., 2014; BUNEL et al., 2015; KUSSANO et al., 2016; MELO et al., 2017; RICHANI et al., 2021). De fato, vários genes já foram identificados como diferencialmente expressos em CC de ovócitos com diferentes níveis de competência, sendo considerados candidatos a marcadores moleculares para a competência ovocitária (CC) (CAIXETA et al. 2009; HAMEL et al., 2010; ASSIDI et al., 2011; LAGER et al., 2013; UYAR et al., 2013; MATOBA et al. 2014; BUNEL et al., 2015; KUSSANO et al., 2016; MELO et al., 2017). Já os estudos que utilizam as CG para identificação

de marcadores para competência ovocitária são escassos, entretanto essas células também são uma fonte potencial de marcadores (MAZZONI et al., 2017; LIU et al., 2022).

Apesar de vários estudos indicarem parâmetros relacionados com a qualidade dos ovócitos e, possíveis marcadores, ainda não existe nenhum índice, variável ou combinação de variáveis que possam ser utilizados para selecionar de forma mais segura os ovócitos mais competentes. Considerando que o ambiente folicular é essencial para a aquisição da competência, conhecer as diferenças entre folículos que contêm ovócitos com maior ou menor potencial de desenvolvimento poderá contribuir para melhorar as condições *in vitro* e para identificar marcadores para a competência. Portanto, este estudo visa identificar as características bioquímicas do ambiente folicular comparando componentes de folículos contendo ovócitos que são capazes ou não de formar embriões.

## **1.1 OBJETIVOS**

### **1.1.1 Objetivo Geral**

Avaliar características bioquímicas dos folículos ovarianos e associá-las à competência ovocitária.

### **1.1.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar se a fonte proteica usada durante a maturação *in vitro* altera a quantificação de transcritos das CC;
- Quantificar a expressão de genes relacionados com competência ovocitária em CG e CC de ovócitos com alta e baixa capacidade de produzir embriões *in vitro*;
- Determinar a concentração de Progesterona e Estradiol no LF de folículos contendo ovócitos com alta e baixa capacidade de produzir embriões *in vitro*;
- Caracterizar e quantificar a presença de cfDNA no LF dos folículos contendo ovócitos com alta e baixa capacidade de produzir embriões *in vitro*.

## **1.2 HIPÓTESE**

A fonte proteica utilizada na maturação *in vitro* altera a expressão de genes nas células do cumulus e, as características bioquímicas do ambiente folicular podem ser utilizadas para prever o potencial de desenvolvimento de ovócitos bovinos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Maturação e Competência Ovocitária

A maturação ovocitária se refere aos eventos que ocorrem entre o pico pré-ovulatório de hormônio luteinizante (LH) e a ovulação e que preparam os ovócitos para a fecundação, incluindo a maturação nuclear e a maturação citoplasmática. Em fêmeas de mamíferos os ovócitos presentes nos folículos ovarianos estão retidos em diplóteno da prófase I da meiose I, cujo estágio é chamado de Vesícula Germinativa (VG) (DOMNS, 1993; SATHANANTHAN, 1994). Durante todo o desenvolvimento folicular o ovócito permanece retidos nesse estágio até que ocorra o pico pré-ovulatório de LH, que induzirá a retomada da meiose e o término da primeira divisão meiótica. O processo desde a retomada do primeiro bloqueio meiótico (prófase I), até o estágio da metáfase II (MII) é denominado de maturação nuclear. Portanto, a maturação nuclear envolve a quebra da vesícula germinativa (VGBD), a condensação da cromatina e progressão pelos estágios de metáfase I (MI), anáfase I (AI), telófase (TI) com liberação do primeiro corpúsculo polar contendo metade dos cromossomos homólogos (SIRARD, 2001). O ovócito então, imediatamente, progride para o estágio de MII, onde mais uma vez fica retido permanecendo nesse estágio até a fecundação.

Já a maturação citoplasmática envolve vários eventos celulares, tais como, a migração e reorganização de organelas como por exemplo o complexo de Golgi e as mitocôndrias, que se localizam na periferia e, durante a maturação migram para uma posição perinuclear. Além dessas, os grânulos corticais produzidos pelos complexos de Golgi inicialmente localizados no centro do ovócito migram para a periferia. Essas estruturas são muito importantes para a fecundação, pois a liberação de seu conteúdo induz modificações na zona pelúcida e na membrana plasmática que irão evitar polispermia (QUETGLAS, 2007; FERREIRA et al., 2009).

Outros eventos que ocorrem durante a maturação citoplasmática são alterações na síntese de algumas proteínas específicas, que estão ligadas com a regulação da retomada da meiose. Durante esse período ocorre aumento dos níveis de cálcio e da atividade de proteínas quinases e a degradação da adenosina monofosfato cíclico (AMPC). Sendo o fator promotor da maturação (MPF) o responsável pela correta progressão do ciclo celular e, portanto pelo início da maturação (KUBELKA et al., 2000). Além disso, alterações nas células somáticas que

circundam o ovócito também são observadas durante a maturação. A secreção e acúmulo de ácido hialurônico entre CC faz com que as mesmas fiquem suspensas em uma matriz gelatinosa ocorrendo a sua expansão (GONÇALVES et al., 2002). Esse processo é fundamental para a captação do ovócito pelas fimbrias da tuba uterina.

O potencial de um ovócito de ser maturado, fecundado e se desenvolver até o estágio de blastocisto é compreendido como competência ovocitária. Sendo que ovócitos maturados *in vivo* apresentam maior competência quando comparados aos maturados *in vitro* (DONNISON; PFEFFER, 2004; FARIN et al., 2007; VAN de LEEMPUT et al., 1999; RIZOS et al., 2002). Essa competência é adquirida progressivamente durante os estágios finais da ovogênese e foliculogênese, através de alterações celulares e moleculares que darão ao ovócito a capacidade de serem fecundados e darem origem a embriões viáveis (DODE, 2006).

Para adquirir competência tanto para maturação nuclear como para a citoplasmática o ovócito precisa completar toda sua fase de crescimento. No ovócito bovino o crescimento total ocorre quando esse atinge em torno de 120µm de diâmetro e, o folículo onde está inserido em torno de 3 mm de diâmetro (FAIR et al., 1995). Estudos observaram que apesar dos ovócitos de folículos a partir 6,0 mm apresentarem diâmetro semelhante aos oriundos de folículos menores que 6,0 mm, esses apresentam maior competência para o desenvolvimento embrionário (CAIXETA et al., 2009), sugerindo que outros fatores, além do tamanho do folículo, estão envolvidos na competência ovocitária.

Apesar da competência ser adquirida de forma gradativa durante o crescimento do ovócito, muitas das alterações que conferem ao ovócito a completa competência acontecem ainda na fase final do crescimento folicular (FAIR et al., 2003). Ovócitos provenientes de folículos pequenos (1,0-1,5 mm), por exemplo, retomam a meiose, mas, param em metáfase I, conseguem ativar a via do MPF, mas não a cascata de proteínas da via MAPK. Somente ovócitos que completaram o crescimento adquirem a competência para ativar as duas vias do ciclo celular, mas que nem sempre apresentam desenvolvimento embrionário normal após a fecundação (MIYANO, 2003; KANAYAMA et al., 2002; ADONA, 2006), pois necessitam ter armazenado todos os componentes necessários para passar a transição materno-zigótica e formar embrião viável (DONNISON & PFEFFER, 2004).

O acúmulo de proteínas e RNAs é fundamental para a competência ovocitária. Isso porque nos ovócitos, ao contrário do que se observa com qualquer outra célula

somática, as moléculas de RNA são armazenadas em uma forma quiescente para serem usadas ao longo da maturação e do desenvolvimento embrionário inicial (SIRARD, 2001). A eficiência do armazenamento e do uso dessas moléculas de RNA é que irá conferir a competência ao ovócito (PICTON et al., 1998). Sendo os estoques de RNAs fundamentais para as primeiras divisões celulares até que ocorra a ativação do genoma embrionário tanto *in vivo* como *in vitro* (FOULADI NASHTA, 1998; SIRARD, 2001; BREVINI et al., 2007).

## 2.2 Ambiente Folicular

Durante o desenvolvimento folicular em ovários de mamíferos, os ovócitos se desenvolvem e crescem em uma relação íntima e dependente com as células somáticas adjacentes. Maior parte do crescimento do ovócito ocorre durante a fase pré-antral do folículo, com grande proximidade das CG ainda indiferenciadas. Quando ocorre a formação do antro folicular essas células se diferenciam em duas linhagens anatômica e funcionalmente diferentes. Uma com papel importante na esteroidogênese e que se adere a parede do folículo, que são as CG, e outras em íntimo contato com o ovócito, as CC. As CC possuem projeções citoplasmáticas especializadas as projeções tranzonais (TZPs) que passam pela zona pelúcida e fazem o contato direto com o citoplasma do ovócito (CLARKE et al., 2018). Na porção final dessas TZP encontram-se as junções gap, que são canais intercelulares composto de proteínas transmembrana que permitem a troca de moléculas, formando então o complexo-cumulus-ovócito (ALBERTINI et al., 2001; YEO et al. 2009).

Essa comunicação bidirecional entre ovócito, CC e do CCO com o ambiente folicular, é essencial para o desenvolvimento e maturação do ovócito (YEO et al., 2009). A interdependência entre esses tipos celulares, pode ser exemplificada pela ação de fatores secretados pelo ovócito (OSF), como o Fator de Diferenciação de Crescimento 9 (GDF-9) e a Proteína Morfogenética de osso 15 (BMP-15), que agem estimulando as CC, regulando seu microambiente e seu crescimento. Por outro lado, o ovócito necessita dessa interação, pois as CCs fornecem produtos glicolíticos, como piruvato e aminoácidos essenciais para o seu crescimento (EPPIG, 2001; GILCHRIST et al., 2008). As CC são induzidas pelo LH pré-ovulatório a secretar ácido hialurônico que se deposita entre elas e, forma uma matriz viscoelástica e gelatinosa. Esse

processo é importante na captura do ovócito pelas fimbrias do oviduto durante a ovulação (DRAGOVICK et al., 2007; DIAZ et al., 2007).

Além do papel metabólico importante durante o crescimento e maturação ovocitária as CC também protegem o ovócito contra os efeitos nocivos do estresse oxidativo. Isso porque elas aumentam o nível de glutatona nos ovócitos, reduzindo cistina em cisteína e promovem a captação de cisteína nos ovócitos durante a maturação (TAKAHASHI et al., 1993; LIM et al., 1996; de MATOS et al., 1997; GESHI et al., 2000; TATEMOTO et al., 2000; FATEHI et al., 2005). São as CC que metabolizam a grande parte de glicose consumida pelo CCO, que supre o ovócito via glicólise com metabólitos intermediários, como por exemplo o piruvato (SUTTON-MCDOWALL et al., 2010). Outros substratos necessários para o crescimento do ovócito, como aminoácidos, são transportados das CG, CC e do ambiente folicular para o ovócito para que ocorra a síntese de suas macromoléculas.

Resumindo, cada tipo celular dentro do ambiente folicular desempenha um papel importante para manter o crescimento, maturação e aquisição da competência ovocitária. A comunicação intercelular permite que o ovócito determine o seu próprio destino por influenciar o ambiente folicular, que por sua vez fornece todas os mecanismos para atender as necessidades do ovócito. Portanto, dada a importância dessa comunicação e do próprio ambiente folicular, as alterações bioquímicas nas células ou nas suas secreções podem ser utilizados para a identificação de marcadores moleculares, permitindo prever a qualidade do ovócito de uma forma não invasiva.

## **2.3 Indicadores para a Competência Ovocitária:**

### **2.3.1 Diâmetro folicular**

O tamanho dos folículos de onde os ovócitos são recuperados também é utilizado como método de seleção. Existem muitos trabalhos que relatam existir uma relação entre a competência do ovócito e o tamanho do folículo de origem, sendo que ovócitos de folículos maiores possuem maior potencial de desenvolvimento do que os ovócitos de folículos menores (LONERGAN et al., 1994; BLONDIN & SIRARD, 1995; FENG et al., 2007; RACEDO et al., 2008; CAIXETA et al., 2009; BESSA et al., 2013).

Isso porque, os ovócitos precisam completar seu crescimento para que possam adquirir a competência para sofrer a maturação nuclear, sendo que a citoplasmática é adquirida mais tarde durante o desenvolvimento folicular ocorrendo em folículos a partir de 3mm (FAIR et al., 1995).

Estudos mostraram que ovócitos bovinos recuperados de folículos de 2-3mm de diâmetro apresentaram menor taxa de desenvolvimento embrionário comparado com ovócitos de folículos maiores de 6mm. Esses resultados sugerem que pode existir relação entre o tamanho do folículo e a competência para o desenvolvimento do ovócito, já que ovócitos recuperados de folículos antrais maiores apresentaram maior taxa de embrião (LEQUARRE et al., 2005; CAIXETA et al., 2009). Entretanto, essa relação não foi observada, em outros estudos os quais apresentaram resultados similares de produção de embrião quando comparam ovócitos recuperados de folículos maiores de 2mm até 8mm (PAVLOK et al., 1992), e ovócitos de folículos menores e maiores do que 4 mm (SENEDA et al., 2001).

A fase em que o folículo se encontra, o diâmetro do folículo e a fase do ciclo estral são fatores importantíssimos também que podem afetar a aquisição de competência do ovócito. E que apesar do diâmetro folicular ter influência, folículos com tamanhos parecidos podem se encontrar em estágios fisiológicos diferentes (HAGEMANN et al., 1999; VASSENA et al., 2003; SIRAD et al., 2006). Caixeta e colaboradores (2009) observaram que apesar dos ovócitos de folículos a partir 6,0 mm apresentarem diâmetro semelhante aos oriundos de folículos menores que 6,0 mm, esses apresentam maior competência para o desenvolvimento embrionário, sugerindo que outros fatores, além do tamanho do folículo, estão envolvidos na competência ovocitária.

### **2.3.2 Ovócito**

Vários grupos de pesquisa também tem focada a busca para marcadores de competência em características do próprio ovócito. Foi observado que, para bovinos, 120  $\mu\text{m}$  é o diâmetro mínimo para que um ovócito possa ser competente (FAIR et al., 2003), e que ovócitos oriundos de folículos maiores (>6mm) em sua maioria apresentam maior capacidade de desenvolvimento embrionário comparados a ovócitos de folículos menores (1-3mm) (CAIXETA et al., 2009). A relação entre tamanho de folículo e ovócito existe até o folículo atingir 3 mm, quando o ovócito atinge

seu crescimento, depois disso apenas o folículo cresce. Como já mostrado, ovócitos recuperados de folículos de 6 mm são melhores do que os recuperados de folículos de 3-5mm, apesar de terem o mesmo tamanho, o que demonstra que escolher ovócitos pelo diâmetro do folículo não funcionaria (CAIXETA et al., 2009).

O corante Brilliant Cresyl Blue (BCB) é outro método utilizado como forma de selecionar ovócitos mais competentes e homogêneos. Este corante detecta a atividade intracelular da glicose-6-fosfatodesidrogenase (G6PD). Essa enzima é sintetizada durante o crescimento ovocitário e sua atividade é reduzida em ovócitos completamente crescidos. É importante para a formação de ácidos graxos e síntese de nucleotídeos através do fornecimento de energia. Quando o ovócito possui baixa atividade da G6PD eles se coram de azul por não reduzirem o BCB a compostos incolores (RODRIGUES-GONZALES et al., 2002; PUJOL et al., 2004; BHOJWANI et al., 2007; GHANEM et al., 2007; WU et al., 2007; TORNER et al., 2008). Apesar do teste BCB ser utilizado para a seleção de ovócitos mais competentes para a PIVE, a competência de ovócitos positivos para BCB pode variar com a maturidade sexual, estimulação com gonadotrofinas e com o diâmetro do ovócito, uma vez que esse método seleciona apenas ovócitos que atingiram seu crescimento total, sendo isso apenas um dos vários fatores que envolvem a aquisição de competência ovocitária (RODRIGUES-GONZALES et al., 2002; PUJOL et al., 2004; WU et al., 2007; TORNER et al., 2008; CATALÁ et al., 2011; SU et al., 2012).

Considerando que ovócitos com diferentes graus de competência diferem com relação aos estoques de RNAm, vários autores tentaram identificar marcadores moleculares focando no armazenamento de RNAm que ocorre durante o desenvolvimento folicular (SIRARD, 2001). Vários genes candidatos a marcadores para qualidade e competência foram identificados em ovócitos, tais como o gene PTTG1 (MOUROT et al., 2006; GHANEM et al., 2007), GDF9 (LONERGAN et al., 2003; DONNISON & PFEFFER, 2004; PFEFFER et al., 2007), G6PDH (GHANEM et al., 2007), H2A (CAIXETA et al., 2009), HDAC2 (BESSA et al., 2013) e H1FOO (MOUROT et al., 2006, CAIXETA et al., 2009, BESSA et al., 2013). Esses achados fornecem importantes informações para o entendimento do processo de aquisição de competência. Entretanto, o processo de quantificação desses genes marcadores para competência no ovócito inviabiliza o uso posterior, e, portanto, não podem ser utilizados como marcadores.

### 2.3.3 Células do Cumulus e Células da granulosa

Outras alternativas na busca de marcadores para a qualidade ovocitária foram voltadas para métodos não invasivos. Sendo que a alternativa com maior potencial e mais viável e, que tem sido extensivamente explorada para buscar marcadores, são as CC. São de fácil remoção, a partir de biopsias, tanto nas células imaturas como maturadas, onde já mostraram não afetar a qualidade e viabilidade dos CCOs para seu posterior uso na PIVE (KUSSANO et al., 2016; SPRICIGO et al., 2022), e em humanos, é de mais fácil acesso ainda, já que são retiradas completamente antes da realização da ICSI. Vários estudos foram realizados e, vários genes já foram identificados como candidatos a marcadores moleculares para a competência ovocitária utilizando CC, em bovinos (CAIXETA et al. 2009; MATOBA et al. 2014; BUNEL et al., 2015; KUSSANO et al., 2016; MELO et al., 2017) e em humanos (HAMEL et al., 2010; ASSIDI et al., 2011; LAGER et al., 2013; UYAR et al., 2013, SHEN et al., 2020).

A melhor forma de prospectar genes candidatos é utilizar metodologias de que permitem investigar milhares ou todos os genes simultaneamente. Esse tipo de metodologia tais como microarranjo e/ou análise do transcriptoma por sequenciamento de todo o RNA tem sido realizado em CC e CG. De fato, vários genes já foram identificados como possíveis marcados utilizando essa duas técnicas e identificando os genes diferencialmente expressos entre as populações de ovócitos mais e menos competentes para identificar os candidatos (DEVJAK et al., 2012; KHAN et al., 2016; MELO et al., 2017; WYSE et al., 2020). Alguns estudos em humanos, validaram possíveis candidatos a marcadores de qualidade, como SERPINE2 (DEVJAK et al., 2012; LI et al., 2015), PTX3 (HUANG et al., 2013; LI et al., 2015), sendo a maioria comparando pacientes com problemas reprodutivos, como a síndrome do ovário policístico.

Foram selecionados alguns genes candidatos a marcadores e de interesse do grupo de estudo, em CC e CG para serem avaliados, dentre eles, podemos citar: CASP3 (Caspase 3), SERPINE2 (Serpina pertencente à família E, membro 2), VCAN (Versican), LUM (Lumican), FSHR (Receptor de hormônio folículo estimulante), EGFR (Receptor de fator de crescimento epidermal), PGR (Receptor de progesterona) e GHR (Receptor do hormônio de crescimento).

Sabe-se que hormônios como FSH, EGF e GH exercem efeito benéfico na maturação *in vitro* de ovócitos bovinos e sua ação se dá através de ligações aos receptores localizados nas CC (SIMONE et al., 1997; BEVERS & IZADYAR, 2002; CONTI et al., 2006). O FSH é necessário para o desenvolvimento gonadal e maturação na puberdade e para a produção de gametas durante a fase fértil da vida do animal, sendo assim um hormônio central na reprodução de mamíferos. O FSH é importante na aquisição da competência em ovócitos bovinos, sendo esta função primariamente associada com seu efeito no crescimento folicular *in vivo* (SIRARD, et al. 2007). A expressão do receptor de FSH (FSHR) na fêmea é célula-específica e se restringe as células da granulosa (SIMONE et al., 1997). Melo e colaboradores (2017) encontraram menor expressão de FSHR em CCs de ovócitos oriundos de folículos de 1 a 3 mm comparado com os folículos maiores, o que reflete a variação no desenvolvimento da competência, também em células bovinas. Calder et al. (2003) observaram maior expressão de FSHR em CCOs de melhor qualidade, já Spricigo e colaboradores (2022) não encontraram tal relação. Devjak et al. (2012) encontraram em humanos, maior expressão em CCs de ovócitos imaturos comparado com ovócitos em MII, o mesmo comportamento foi mostrado em bovinos (SPRICIGO et al.,2022).

Além do FSHR, outros estudos em bovinos mostraram os genes GHR e EGFR como potenciais marcadores em CC, (ASSID et al., 2008; CAIXETA et al., 2009; ASSID et al., 2010; GEBHARDT, et al., 2011, KUSSANO et al., 2022). O receptor do EGFR, que age como mediador das ações do LH, incrementa os sinais que estimulam os EGF, relacionados com a indução da maturação (ASSIDI et al., 2010) e sua maior expressão foi associado com competência ovocitária em bovinos e humanos (ROBERT et al. 2001; HAMEL et al. 2008; ASSID et al., 2011).

Já o GH, durante a maturação pode acelerar a maturação nuclear, induz a expansão das CCs e melhora a taxa de blastocisto (IZADYAR et al., 1998; KOLLE et al., 1998; BEVERS AND IZADYAR, 2002; KOLLE et al., 2003). Caixeta et al., (2009), observaram que os genes EGFR e GHR foram diferencialmente expressos nas CC de CCO oriundos de diferentes tamanhos de folículos, e que seus níveis de transcritos aumentavam conforme aumentava o tamanho dos folículos. Expressão diferencial do GHR também foi detectada em estudo utilizando microarranjo para comparar CC de ovócitos de diferentes competências (MELO et al., 2017).

Kussano e colaboradores (2016), observaram uma maior quantidade de transcritos do gene GPC4 e GHR em CCs de ovócitos que deram origem a embrião

comparados com aqueles que não deram origem a embrião no final da PIVE. Recentemente, o mesmo grupo, confirmou mais uma vez, que uma maior quantidade de transcritos de GHR em CC imaturas, são encontradas em CCOs oriundos de folículos de 4-6mm e que se desenvolvem em embrião no final da PIVE, comparado com aqueles que não continuam seu desenvolvimento após as primeiras clivagens (KUSSANO et al., 2022).

Já os genes VCAN, SERPINE2 e LUM, estão na maioria dos estudos, ligados com a expansão das CC, mudança essa, de grande importância na maturação dos ovócitos. Versican é um gene essencial para ovulação e fecundação, proteoglicano que pode ligar ao ácido hialurônico, atua na expansão das CC e por fazer parte da matriz extracelular está envolvido na adesão celular, proliferação, migração e angiogênese, além de desempenhar um papel central na morfogênese e manutenção de tecidos (RUSSELL et al., 2003; VAN MONTFOORT et al., 2008). Estudos têm relatado a alta expressão do gene VCAN em células do *cumulus* relacionado com a competência ovocitária e capacidade de desenvolvimento de embriões em humanos (WATHLET et al. 2011; XU et al., 2015; SHEN et al., 2020) e em bovinos (MATOBA et al., 2014).

Assim como VCAN, o gene LUM também possui um papel muito importante na maturação e competência do ovócito, regulando a matriz extracelular e também é associado com a diferenciação, proliferação e migração celular (KAO et al., 2005). Mostrando esse efeito durante a MIV, estudos encontraram aumento do nível de transcritos após a MIV (MAMO et al., 2011; SPRICIGO et al., 2022). Já Bunel e colaboradores (2015), viram uma maior quantidade de transcritos em CC imaturas de CCO que não tiveram resultados positivos no desenvolvimento embrionário.

Já a caspase, que é um dos fatores pró-apoptóticos expressos em células foliculares, tem sido relatado como um potencial biomarcador. É uma cisteína protease, que causa inativação de componentes durante a apoptose em mudanças morfológicas e processos fisiológicos. A CASP3 e CASP7 apresentaram maiores níveis de expressão, principalmente em síndrome de ovário policístico e também correlacionadas de forma negativa com a qualidade embrionária (SALEHI et al., 2017).

Sabe-se que a apoptose é um processo presente nas funções normais dos ovários, como atresia e luteólise, desenvolvimento do folículo, e até na implantação do embrião (VARRAS et al., 2012) e que a CASP3 está altamente associada com a fragmentação de DNA, condensação de cromatina, protusão de membrana plasmática

(BRENTNALL et al., 2013), tendo estudos que demonstraram que a apoptose das CC tem relação negativa com a competência de desenvolvimento dos ovócitos, fragmentação de DNA e prejuízos no desenvolvimento embrionário (HOST et al., 2000; IKEDA et al., 2003).

É importante salientar que em humanos as CCs utilizadas para identificação de marcadores são CC obtidas de ovócitos maturados *in vivo*, diferente do de bovinos que utilizam células de cumulus de ovócitos imaturos. Essas diferenças no material utilizado podem ser responsáveis pela variação encontrada nos resultados da expressão dos genes candidatos e, precisam ser levadas em consideração quando se compara aos resultados da literatura. Além disso outros fatores como diferenças nos sistemas de cultivo também podem afetar os resultados relativos a expressão de genes marcadores. Essas diferenças na quantificação de genes devido a fatores externos foram recentemente demonstradas em estudo comparando diferentes fontes proteicas presentes durante a maturação *in vitro* (KUSSANO et al., 2022).

Outra opção para buscar marcadores não invasivos seria as CG, que fazem parte do folículo e estão em contato direto com o ambiente de desenvolvimento do ovócito. Grupos de pesquisa tem mostrado haver grande variação na expressão gênica entre CC e CG, mesmo elas tendo a mesma origem (BURNICK et al. 2015; KOKS et al., 2016). E, apesar de ser uma possível fonte de marcadores ainda são escassos os estudos que usam as CG como forma de identificar genes candidatos a marcadores de competência ovocitária. Matoba e colaboradores (2014) mostraram expressão aumentada de LHCGR em CG de ovócitos que chegaram a blastocisto comparados com aqueles que degeneraram durante seu cultivo *in vitro*. Já quando testaram a ausência de FSH como modelo de estudo, conseguiram identificar alterações em genes relacionados com apoptose e inflamação (KCNJ8 e ANRKD1), importância no crescimento folicular (IGF2, RELN, BMPR1B e NRP1) e relacionados com estresse oxidativo como VNN1, TF, GFPT2 (NIVET et al., 2013). Kordus e Lavoie (2017), fizeram uma extensa revisão sobre candidatos a marcadores em CGs, em humanos, e relatam que biomarcadores associados a gestação são mais comumente encontrados em CC do que em CG. Esses autores também apontaram que a grande variação de resultados e falta de repetibilidade no que se refere a quais genes devem ser considerados marcadores, pode ser devido as diferenças em sistemas de cultivo, nos protocolos de superestimulação, no perfil de idade e em outros fatores que podem afetar os resultados.

### 2.3.4 Líquido Folicular

Além das CC e CG, o LF também é uma fonte promissora para a identificação de compostos ou substância que possam predizer a saúde ou qualidade do ovócito. O LF é um exsudato do plasma sanguíneo, contendo várias substâncias tais como eletrólitos, RNAs, proteínas, aminoácidos, peptídeos, açúcares, hormônios, fatores de crescimento, metabolitos e vesículas extracelulares (VEs). O LF é rota de comunicação autócrina e parácrina entre células da teca, CG, CC e ovócito (GOSDEN et al., 1988; REVELLI et al., 2009) e, sua composição varia com o estágio de desenvolvimento do folículo e do ovócito (REVELLI et al., 2009; SOHEL et al., 2013). Por ser um composto de fácil recuperação no momento da aspiração folicular, principalmente na reprodução humana, onde os folículos são aspirados individualmente, e por apresentar grande fonte de substâncias é forte candidato para prover um possível marcador molecular.

Já se tem estudado algumas moléculas presentes no líquido folicular no intuito de encontrar possíveis marcadores para qualidade. GDF-9 e anfirregulina foram correlacionadas positivamente com qualidade ovocitária (GODE et al., 2011; LIU et al., 2012), assim como a queda nos níveis de IL-1 e IL-2 (MENDONZA et al., 2002; SARAPIK et al., 2012) e o aumento da quantificação dos fatores estimulantes de colônias de granulócitos (G-CSF) e de proteína morfogênica do osso 2 (BMP-2) (LEDEE et al., 2013; SUGIYAMA et al., 2010). Além de Glicina, L-glutamato, L-alanina terem sido mostradas por Matoba e colaboradores (2014) também terem relação com a competência do ovócito.

Os processos que envolvem a foliculogênese são bastante complexos, envolvendo diversos fatores de crescimento e hormônios, e muitos estudos mostram a importância dos esteroides no desenvolvimento folicular e maturação do ovócito. Portanto as concentrações de estradiol e progesterona podem refletir a qualidade do folículo e do ovócito. Estudos com suínos mostraram diferenças no perfil de esteroides no LF, comparando folículos menores que 5mm com maiores que 5mm, e encontraram maior concentração de E2 no LF, melhor qualidade de ovócitos e maior abundância de nível de transcritos de genes relacionados com esteroidogênese ovariana em folículos maiores que 5mm (COSTERMANS et al., 2019). Tem sido bem demonstrado que o aumento de E2 no LF e o aumento na razão E2/P4 está associado com maior possibilidade de prenhez em humanos (TEISSER et al., 2000;

CARPINTERO et al., 2014, PIZARRO et al., 2020), mas outros estudos não confirmam essa assertiva (WALTERS et al., 2019).

E, recentemente, foi relatada uma nova alternativa para identificar marcadores que é a presença e quantidade de cfDNA no LF. CfDNA são fragmentos de DNA, com comprimento médio de 40 a 200 pares de base (pb) (MOULIERE et al., 2018; KUSTANOVICH et al., 2019). Que podem estar em vesículas extracelulares como também em livre circulação (KLUMP et al., 2018). Por serem de fácil acesso e possuírem alta estabilidade se tornaram candidatos a biomarcador em várias áreas da medicina, como estudo de várias patologias, principalmente câncer (BARRETT et al., 2014; KIM et al., 2014; SPINDLER et al., 2015; OLSEN et al., 2016).

Sabe-se que os cfDNA, são materiais genéticos liberados por células apoptóticas e necróticas, mas também já demonstrado ser liberado por células vivas, podendo atuar na sinalização de comunicações entre células (STROUN et al., 2001; LI et al., 2009; SURAJ et al., 2017). O cfDNA foi descrito em vários fluidos biológicos, plasma, urina, saliva e outros (DING et al., 2019; REN et al., 2020), e tem muitas aplicações em diagnóstico e prognóstico principalmente de câncer. Na área da reprodução, especialmente em humanos, tem sido estudado em plasma seminal e LF (WU et al., 2013; SCALICI et al., 2014; LATIF et al., 2020). No que se refere a LF, a presença de cfDNA tem sido relacionada a qualidade dos ovócitos, sucesso em gestação, e problemas reprodutivos (MBAYE et al., 2019; SCALICI et al., 2014; LATIF et al., 2020; TRAVER et al., 2015; GUAN et al., 2017; LIU et al., 2019; PAN et al., 2021). Estudos tem mostrado que alto conteúdo de cfDNA no LF está associado com a baixa qualidade de ovócitos, altas taxas de fragmentação de DNA, baixa taxa de clivagem e gestação em humanos (TRAVER et al., 2015; GUAN et al., 2017; LIU et al., 2019). Além disso, tem sido relatada uma correlação entre a baixa quantificação de cfDNA no líquido folicular com a qualidade embrionária (SCALICI et al., 2014; LATIF et al., 2020), até sua quantificação no meio de cultivo de embriões como uma possível alternativa para uma melhor seleção embrionária (PAN et al., 2021).

Ichikawa et al., (2019), em estudos com suínos, associaram a apoptose de CG com o conteúdo de cfDNA presente no LF, onde a alta quantidade de cfDNA no LF estava relacionada a baixa capacidade de desenvolvimento dos ovócitos. Outros grupos de estudo, observaram que nos cultivos de ovócitos suínos, existia uma forte correlação da quantidade de cfDNA com o número de morte celular e observaram que a baixa quantidade de cfDNA mitocondrial, baixo conteúdo de glicose e alta

concentração de lactato no meio de cultivo desses ovócitos estavam relacionados com a adequada maturação e desenvolvimento desses ovócitos suínos (MUNAKATA et al.,2019). Em amostras de LF de mulheres em processo de tratamentos de reprodução assistida, Liu et al., (2019) mostraram efeito negativo da quantidade de cfDNA mitocondrial com a produção de embriões e que essa concentração estava relacionada também com a idade da mulher.

Com isso, ainda existem muitos pontos a serem explorados no LF e no ambiente folicular em si, que podem ajudar na busca por marcadores confiáveis para a seleção de ovócitos mais competentes.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTINI, D.F.; COMBELLES, C.M.; BENECCHI, E.; CARABATSOS, M.J. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Reproduction**. 2001;121(5):647-53.

ALGRIANY, O., BEVERS, M., SCHOEVERS, E., COLENBRANDER, B., DIELEMAN, S. Follicle size-dependent effects of sow follicular fluid on in vitro cumulus expansion, nuclear maturation and blastocyst formation of sow cumulus oocytes complexes. **Theriogenology**. 2004 Nov;62(8):1483-97. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.02.008. PMID: 15451257.

ADONA, P.R.; LEAL, C.L.V. Effect of concentration and exposure period to butyrolactone I on meiosis progression in bovine oocytes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 354-359, 2006.

ANDRADE, G.; MEIRELLES, F.; PERECIN, F.; SILVEIRA, J. Cellular and extracellular vesicular origins of miRNAs within the bovine ovarian follicle. **Reproduction in Domestic Animals**. p.1-10, 2017.

ARTINI, P.G.; TATONE, C.; SPERDUTI, S.; D'AURORA, M.; FRANCHI, S.; DI EMIDIO, G.; CIRIMINNA, R.; VENTO, M.; DI PIETRO, C.; STUPPIA, L.; GATTA, V.; Italian Society of embryology, Reproduction and Research (SIERR). Cumulus cells surrounding oocytes with high developmental competence exhibit down-regulation of phosphoinositol 1,3 kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) signalling genes involved in proliferation and survival. **Human Reproduction**. 2017 Dec 1;32(12):2474-2484. doi: 10.1093/humrep/dex320. PMID: 29087515; PMCID: PMC5850344.

ASSIDI, M.; DIELEMAN, S. J.; SIRARD, M. A. Cumulus cells gene expression following the LH surge in bovine preovulatory follicles: Potential early markers of oocyte competence. **Reproduction**, v. 140, p. 835–852, 2010.  
ASSIDI, M.; MONTAG, M.; VAN DER VEN, K.; SIRARD, M.A. Biomarkers of human oocyte developmental competence expressed in cumulus cells before ICSI: a

preliminary study. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics** 2011; 28:173–88.

ASSOU, S.; HAOUZI, D.; DECHAUD, H.; GALA, A.; FERRIERES, A.; HAMAMAH, S. 2013 Comparative gene expression profiling in human cumulus cells according to ovarian gonadotropin treatments. **Biomed Research International** 2013 354582. (doi:10.1155/2013/354582)

BARCELÓ-FIMBRES, M.; CAMPOS-CHILLÓN, L.F.; MTANGO, N.R.; ALTERMATT, J.; BONILLA, L.; KOPPANG, R.; VERSTEGEN, J.P. Improving in vitro maturation and pregnancy outcome in cattle using a novel oocyte shipping and maturation system not requiring a CO<sub>2</sub> gas phase. **Theriogenology**, v.84, p. 109-117, 2015.

BARTEL, D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell** 2004, v.116, p.281-297.

BARRETT, A.N.; THADANI, H.A.; LAUREANO-ASIBAL, C.; PONNUSAMY, S.; CHOOLANI, M. Stability of cell-free DNA from maternal plasma isolated following a single centrifugation step. **Prenat Diagn.** 2014;34(13):1283–8.

BENKHALIFA, M.; MADKOUR, A.; LOUANJLI, N.; BOUAMOUD, N.; SAADANI, B.; KAAROUCHE, I. et al. From global proteome profiling to single targeted molecules of follicular fluid and oocyte: contribution to embryo development and IVF outcome. **Expert review of proteomics**. 2015;12(4):407-23.

BESSA, I.R.; NISHIMURA, R.C.; FRANCO, M.M.; DODE, M.A.N. Transcription Profile of Candidate Genes for the Acquisition of Competence During Oocyte Growth in Cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, p. n/a-n/a, 2013.

BIASE, F.H.; EVERTS, R.E.; OLIVEIRA, R.; SANTOS-BIASE, W.K.; FONSECA MERIGHE, G.K.; SMITH, L.C.; MARTELLI, L.; LEWIN, H.; MEIRELLES, F.V. Messenger RNAs in metaphase II oocytes correlate with successful embryo development to the blastocyst stage. **Zygote** 2014; **22**:69–79.

BRENTNALL, M., RODRIGUEZ-MENOCAL, L., DE GUEVARA, R. L., CEPERO, E., AND BOISE, L. H. (2013). Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. **BMC Cell Biol.** 14:32. doi: 10.1186/1471-2121-14-32

BREVINI-GANDOLFI, T.A.L.; GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology**, v. 55, p. 1255-1276, 2001.

BREVINI, T.A.L.; CILLO, F.; ANTONINI, S.; GANDOLFI, F. Cytoplasmic remodeling and the acquisition of developmental competence in pig oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 98, p. 23–38, 2007.

BURNIK PAPLER, T.; VRTACNIK BOKAL, E.; MAVER, A.; KOPITAR, A.N.; LOVRECIC, L. Transcriptomic Analysis and Meta-Analysis of Human Granulosa and Cumulus Cells. **PLoS One**. 2015;10(8):e0136473.

BUCCIONE, R.; SCHROEDER, A.C.; EPPIG, J.J. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. **Biology of Reproduction**. 1990;43(4):543–7.

BUNEL, A.; JORSSEN, E.P.; MERCKX, E.; LEROY, J.L.; BOLS, P.E.; SIRARD, M.A. Individual bovine in vitro embryo production and cumulus cell transcriptomic analysis to distinguish cumulus-oocyte complexes with high or low developmental potential. **Theriogenology** 2015;83:228– 37.

BURATINI, JR. J.; TEIXEIRA, A.B.; COSTA, I.B.; GLAPINSKI, V.F.; PINTO, M.G.L.; GIOMETTI, I.C.; BARROS, C.M.; CAO, M.; NICOLA, E.S.; PRICE, C.A. Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors, fibroblast growth factor receptor-3c and -4 in bovine antral follicles. **Reproduction**, v.130, p.343-350, 2005

CAIXETA, E.S.; RIPAMONTE, P.; FRANCO, M.M.; JUNIOR, J.B.; DODE, M.A.N. Effect of follicle size on RNAm expression in cumulus cells and oocytes of *Bos Taurus indicus*: an approach to identify markers genes for developmental competence. **Reproduction Fertility and Development** 2009;21:655–64.

CALDER, M. D.; CAVENEY, A. N.; SMITH, L. C.; WATSON, A. J. Responsiveness of bovine cumulus-oocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and Cx43 marker gene mRNAs during maturation in vitro. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.1, p.1-12, 2003.

CATALA, M.G.; IZQUIERDO, D.; UZBEKOVA, S.; MORATO, R.; ROURA, M.; ROMAGUERA, R.; PAPIILLIER, P.; PARAMIO, M.T. Brilliant Cresyl Blue stain selects largest oocytes with highest mitochondrial activity, maturation-promoting factor activity and embryo developmental competence in prepubertal sheep. **Reproduction**, v.142, p.517–527, 2011.

CARPINTERO, N.L., SUAREZ, O.A., MANGAS, C.C., VAREA, C.G., RIOJA, R.G. Follicular steroid hormones as markers of oocyte quality and oocyte development potential. **Journal of Human Reproductive Sciences**. 2014;7(3):187-193.

CHEN, H.; LIU, C.; JIANG, H.; GAO, Y.; XU, M.; WANG, J.; LIU, S.; FU, Y.; SUN, X.; XU, J.; ZHANG, J.; DAI, L. Regulatory Role of miRNA-375 in Expression of BMP15/GDF9 Receptors and its Effect on Proliferation and Apoptosis of Bovine Cumulus Cells. **Cell Physiol Biochem** 2017;41:439-450

CLARKE, H.J. Regulation of germ cell development by intercellular signaling in the mammalian ovarian follicle. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2018 Jan;7(1):10.1002/wdev.294. doi: 10.1002/wdev.294. Epub 2017 Sep 11. PMID: 28892263; PMCID: PMC5746469.

CONTI, M.; HSIEH, M.; PARK, J.Y.; SU, Y.Q. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. **Molecular Endocrinology**, v.20, p. 715-723, 2006.

COTICCHIO, G.; SERENI, E.; SERRAO, L.; MAZZONE, S.; IADAROLA, I.; BORINI, A. What criteria for the definition of oocyte quality? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1034, p. 132-144, 2004.

COSTERMANS, N G J.; SOEDE, N M F.; VAN TRICHT, BLOKLAND, M.; KEMP, B.; KEIJER, J.; TEERDS, K J. Follicular fluid steroid profile in sows: relationship to follicle size and oocyte quality, **Biology of Reproduction**, Volume 102, Issue 3, March 2020, Pages 740–749.

DE LACERDA, I. P.; DODE, M. A. N.; LIMA, M. M. S.; GUERRA, B. F.; COSTA, E. S.; MOREIRA, G. R.; CARVALHO, J. de O. Cattle breed affects in vitro embryo production in a large-scale commercial program on dairy farms. **Livestock Science JCR**, v. 240, p. 104135, 2020.

DEVJAK, R., FON TACER, K., JUVAN, P., VIRANT KLUN, I., ROZMAN, D., VRTAČNIK BOKAL, E. Cumulus cells gene expression profiling in terms of oocyte maturity in controlled ovarian hyperstimulation using GnRH agonist or GnRH antagonist. **PLoS One**. 2012;7(10):e47106. doi: 10.1371/journal.pone.0047106. Epub 2012 Oct 17. PMID: 23082142; PMCID: PMC3474825.

DIAZ, F.J.; WIGGLESWORTH, K.; EPPIG, J.J. Oocytes determine cumulus cell lineage in mouse ovarian follicles. **Journal of Cell Science**, v. 120, 1330-1340, 2007.

DING, S.; SONG, X.; GENG, X.; LIU, L.; MA, H.; WANG, X.; WEI, L.; XIE, L.; SONG, X. Saliva-derived cfDNA is applicable for EGFR mutation detection but not for quantitation analysis in non-small cell lung cancer. **Thoracic Cancer**, 10(10), 1973–1983, 2019.

DODE, M.A.N.; DUFORT, I.; MASSICOTTE, L.; SIRARD, M.A. Quantitative expression of candidate genes for developmental competence in bovine two-cell embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, p. 288-297, 2006.

DONNISON, M.; PFEFFER, P.L. Isolation of genes associated with developmentally competent bovine oocytes and quantitation of their levels during development. **Biology of Reproduction** 2004; **71**:1813–1821.

DRAGOVIC, R.A.; RITTER, L.J.; SCHULTZ, S.J.; AMATO, F.; ARMSTRONG, D.T.; GILCHRIST, R.B. Secreted factor activation of SMAD 2/3 signaling enables initiation of mouse cumulus cell expansion. **Biology of Reproduction**, v. 76, p. 848- 857, 2007.

DU, X.; ZHANG, L.; LI, X.; PAN, Z.; LIU, H.; LI, Q. TGF-beta signaling controls FSHR signaling-reduced ovarian granulosa cell apoptosis through the SMAD4/miR-143 axis. **Cell death & disease**. 2016;7:e2476.

DUMESIC, D.A.; MELDRUM, D.R.; KATZ-JAFFE, M.G.; KRISHER, R.L.; SCHOOLCRAFT, W.B. Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. **Fertility and sterility**. 2015;103(2):303-16.

EPPIG, J.J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**. 2001;122(6):829–38.

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

FARIN, C.E.; RODRIGUEZ, K.F.; ALEXANDER, J.E.; HOCKNEY, J.E.; HERRICK, J.R.; KENNEDY-STOSKOPF, S. The role of transcription in EGF- and FSH-mediated oocyte maturation *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v.98, p.97-112, 2007.

FATEHI, A.N.; ROELEN, B.A.J.; COLENBRANDER, B. Presence of *cumulus* cells during *in vitro* fertilization protects the bovine oocyte against oxidative stress and improves first cleavage but does not affect further development. **Zygote**, v.13, p.177-185, 2005.

FENG, C.; LI, J.; RUAN, J.; DING, K. MicroRNA-125a inhibits cell growth by targeting glypican-4. **Glycoconjugate journal**. 2012;29:503-11.

FOULADI NASHTA, A.A.; WADDINGTON, D.; CAMPBELL, K.H.S. Maintenance of bovine oocytes in meiotic arrest and subsequent development *in vitro*: a comparative evaluation of antral follicle culture with other methods. **Biology of Reproduction**. v. 59, p. 255-262, 1998

FERREIRA, E.M.; VIREQUE, A.A.; ADONA, P.R.; MEIRELLES, F.V.; FERRIANI, R.A.; NAVARRO, P.A. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*. 2009 Mar 15;71(5):836-48. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.10.023. Epub 2009 Jan 3. Erratum in: **Theriogenology**. 2010 May;73(8):1164. PMID: 19121865.

GESHI, M.; TAKENOUCHE, N.; YAMAUCHI, N.; NAGAI, T. Effects of sodium pyruvate in nonserum maturation medium on maturation, fertilization, and subsequent development of bovine oocytes with or without cumulus cells. **Biology of Reproduction**, v.63, n.6, p.1730-1734, 2000.

GERARD, N.; FAHIMINIYA, S.; GRUPEN, C.G.; NADAL-DESBARATS, L. Reproductive physiology and ovarian folliculogenesis examined via <sup>1</sup>H-NMR metabolomics signatures: a comparative study of large and small follicles in three mammalian species (*Bos taurus*, *Sus scrofa domestica* and *Equus ferus caballus*). **Omics : a journal of integrative biology**. 2015;19(1):31-40.

GHANEM, N.; HOLKER, M.; RINGS, F.; JENNEN, D.; THOLEN, E.; SIRARD, M.A.; TORNER, H.; KANITZ, W.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Alterations in transcript abundance of bovine oocytes recovered at growth and dominance phases of the first follicular wave. **BMC Dev Biol** 2007; 7:90

GILCHRIST, R.B.; LANE, M.; THOMPSON, J.G. Oocyte-secreted factors: regulators of *cumulus* cell function and oocyte quality. **Human Reproduction Update**, v. 14, p. 159-177, 2008.

GODE, F., GULEKLI, B., DOGAN, E., KORHAN, P., DOGAN, S., BIGE, O., CIMRIN, D., ATABEY, N. Influence of follicular fluid GDF9 and BMP15 on embryo quality.

**Fertility and Sterility.** 2011 Jun;95(7):2274-8. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.03.045. Epub 2011 Apr 15. PMID: 21496799.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal.** São Paulo: Varela, 2002. 340p.

GOSDEN, R.G.; HUNTER, R.H.; TELFER, E.; TORRANCE, C.; BROWN, N. Physiological factors underlying the formation of ovarian follicular fluid. **Journal of Reproduction and Fertility** 1988; 82:813–825.

GUAN, Y.; ZHANG, W.; WANG, X.; CAI, P.; JIA, Q.; ZHAO, W. Cell-free DNA induced apoptosis of granulosa cells by oxidative stress. **Clin Chim Acta** 2017; **473**: 213–217.

HAGEMANN U.; WEILERT, L.L.;BEAUMONT, S.E.;TERVIT, H.R. Development of bovine embryos in single *in vitro* production (sIVP) systems. **Molecular Reproduction and Development**, v.51, p.143-147, 1998.

HAMEL, M.;DUFORT, I.; ROBERT, C.;GRAVEL, C.; LEVEILLEM. C.;LEADER, A. &SIRARD, M. A. 2008. Identification of differentially expressed markers in human follicular cells associated with competent oocytes. **Human Reproduction**, v. 23, p. 1118–1127, 2008.

HAMEL, M.; DUFORT, I.; ROBERT, C.; LEVEILLE, M.C.; LEADER, A.; SIRARD, M.A. Genomic assessment of follicular marker genes as pregnancy predictors for human IVF. **Molecular Human Reproduction** 2010;16:87–96.

HØST, E., MIKKELSEN, A.L., LINDENBERG, S., SMIDT-JENSEN, S. Apoptosis in human cumulus cells in relation to maturation stage and cleavage of the corresponding oocyte. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2000 Nov;79(11):936-40. PMID: 11081676.

HWANG, H.W.; MENDELL, J.T.: MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *Br J Cancer* 2007, 96(Suppl):R40-44.

HUANG, X., HAO, C., SHEN, X., ZHANG, Y., LIU, X. RUNX2, GPX3 and PTX3 gene expression profiling in cumulus cells are reflective oocyte/embryo competence and potentially reliable predictors of embryo developmental competence in PCOS patients. **Reproductive Biology and Endocrinology.** 2013 Nov 26;11:109. doi: 10.1186/1477-7827-11-109. PMID: 24279306; PMCID: PMC4222840.

ICHIKAWA, K.; SHIBAHARA, H.; SHIRASUNA, K.; KUWAYAMA, T.; IWATA, H. Cell-free DNA content in follicular fluid: A marker for the developmental ability of porcine oocytes. **Reproductive Medicine and Biology.** 2019 Dec 21;19(1):95-103. doi: 10.1002/rmb2.12309. PMID: 31956291; PMCID: PMC6955585.

IKEDA, S., IMAI, H., YAMADA, M. (2003) Apoptosis in cumulus cells during *in vitro* maturation of bovine cumulus-enclosed oocytes. **Reproduction** 125(3):369–376.

IZADYAR, F.; HAGE, W.J.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M.M. The promontory effect of growth hormone on the developmental competence of *in vitro* matured bovine

oocytes is due to improved cytoplasmic maturation. **Molecular Reproduction and Development**, v.49, p.444-453, 1998.

KANAYAMA, N.; MIYANO, T.; LEE, J. Acquisition of meiotic competence in growing pig oocytes correlates with their ability to activate Cdc2 Kinase and MAP kinase. **Zygote**, v. 10, p. 261-270, 2002.

KAO, W.W., FUNDERBURGH, J.L., XIA, Y., LIU, C.Y., CONRAD, G.W. Focus on molecules: Lumican. *Exp Eye Res.* 2006 Jan;82(1):3-4. doi: 10.1016/j.exer.2005.08.012. Epub 2005 Oct 5. PMID: 16213485; PMCID: PMC2876311.

KHAN, D.R.; LANDRY, D.A.; FOURNIER, É.; VIGNEAULT, C.; BLONDIN, P.; SIRARD, M.A. Transcriptome meta-analysis of three follicular compartments and its correlation with ovarian follicle maturity and oocyte developmental competence in cows. **Physiol Genomics**. 2016 Aug 1;48(8):633-43. doi: 10.1152/physiolgenomics.00050.2016. Epub 2016 Jul 8. PMID: 27401219; PMCID: PMC5005457.

KIDDER, G.M.; VANDERHYDEN, B.C. Bidirectional communication between oocytes and follicle cells: ensuring oocyte developmental competence. **Can J Physiol Pharmacol**. 2010;88(4):399–413. doi:10.1139/y10-009.

KIM, K., SHIN, D.G., PARK, M.K., BAIK, S.H., KIM, T.H., KIM, S, et al. Circulating cell-free DNA as a promising biomarker in patients with gastric cancer: diagnostic validity and significant reduction of cfDNA after surgical resection. **Ann Surg Treatment Res**. 2014;86(3):136–42.

KLUMP, J., PHILLIPP, U., FOLLO, M., EREMIN, A., LEHMANN, H., NESTEL, S., VON BUBNOFF, N., NAZARENKO, I. Extracellular vesicles or free circulating DNA: where to search for BRAF and cKIT mutations? **Nanomedicine**. 2018 Apr;14(3):875-882. doi: 10.1016/j.nano.2017.12.009. Epub 2017 Dec 27. PMID: 29288729.

KOKS, S.; VELTHUT, A.; SARAPIK, A.; ALTMAE, S.; REINMAA, E.; SCHALKWYK, L.C., et al. The differential transcriptome and ontology profiles of floating and cumulus granulosa cells in stimulated human antral follicles. **Molecular Human Reproduction**. 2010;16(4):229-40.

KOLLE, S.; SINOWATZ, F.; BOIE, G.; LINCOLN, D. Developmental changes in the expression of the growth hormone receptor messenger ribonucleic acid and protein in the bovine ovary. **Biology of Reproduction**, v.59, p.836-842, 1998.

KOLLE, S.; STOJKOVIC, M.; BOIE, G.; WOLF, E.; SINOWATZ, F. Growth hormonerelated effects on apoptosis, mitosis, and expression of Connexin 43 in bovine in vitro maturation cumulus-oocyte complexes. **Biology of Reproduction**, v.68, p.1584-1589, 2003.

KORDUS, R.J., LAVOIE, H.A. Granulosa cell biomarkers to predict pregnancy in ART: pieces to solve the puzzle. **Reproduction**. 2017 Feb;153(2):R69-R83. doi: 10.1530/REP-16-0500. Epub 2016 Nov 4. PMID: 27815559.

KUSSANO, N.R.; LEME, L.O.; GUIMARÃES, A.L.S.; FRANCO, M.M.; DODE, M.A.N. Molecular markers for oocyte competence in bovine cumulus cells. **Theriogenology**, v. 85, p. 1167-1176, 2016.

KUSSANO, N.R.; LEME, L.O.; DODE, M.A.N. (2021): Protein source in maturation media affects gene expression in cumulus cells and embryo development in cattle, **Animal Biotechnology**, DOI: 10.1080/10495398.2021.2019755

KUSTANOVICH, A., SCHWARTZ, R., PERETZ, T., GRINSHPUN, A. Life and death of circulating cell-free DNA. **Cancer Biol Ther**. 2019;20(8):1057– 67.

KRISHER, R. L. The effect of oocyte quality on development. **Journal of Animal Science**, v. 82 (Suppl. E):E14–E23, 2004.

KUBELKA, M.; MOTLIK, J.; SCHULTZ, R.M.; PAVLOK, A. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, without influencing chromosome condensation activity. **Biology of Reproduction**, v.62, p.292-302, 2000.

LAGER, A.E.; KOCABAS, A.M.; OUT, H.H.; RUPPEL, P.; LANGERVELD, A.; SCHNARR, P.; et al. Identification of a novel gene set in human cumulus cells predictive of an oocyte's pregnancy potential. **Fertility and Sterility** 2013;99: 745–52.

LABRECQUE, R.; FOURNIER, E.; SIRARD, M.A. Transcriptome analysis of bovine oocytes from distinct follicle sizes: insights from correlation network analysis. **Molecular Reproduction and Development** 2016; **83**:558–569.

LATIF KHAN, H.; BHATTI, S.; LATIF KHAN, Y.; ABBAS, S.; MUNIR, Z.; RAHMAN KHAN SHERWANI, I.A.; SUHAIL, S.; HASSAN, Z.; AYDIN, H.H. Cell-free nucleic acids and melatonin levels in human follicular fluid predict embryo quality in patients undergoing in-vitro fertilization treatment. **Journal Gynecology Obstet Human Reproduction**. 2020 Jan;49(1):101624. doi: 10.1016/j.jogoh.2019.08.007. Epub 2019 Aug 28. PMID: 31472269.

LEQUARRE, A.S., VIGNERON, C., RIBAUCCOUR, F., HOLM, P., DONNAY, I., DALBIÈS-TRAN, R., CALLESEN, H., MERMILLOD, P. Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. **Theriogenology**. 2005 Feb;63(3):841-59. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.05.015. PMID: 15629802.

LI, S.H., LIN, M.H., HWU, Y.M., LU, C.H, YEH, L.Y., CHEN, Y.J., LEE, R.K. Correlation of cumulus gene expression of GJA1, PRSS35, PTX3, and SERPINE2 with oocyte maturation, fertilization, and embryo development. **Reproductive Biology Endocrinology**. 2015 Aug 16;13:93. doi: 10.1186/s12958-015-0091-3. PMID: 26276571; PMCID: PMC4537566.

LIM, J.M.; HANSEL, W. Roles of growth factors in the development of bovine embryos fertilized *in vitro* and cultured singly in a defined medium. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 8, p.1199-1205, 1996.

LIU, Y.; SHEN, Q.; ZHAO, X.; ZOU, M.; SHAO, S.; LI, J.; REN, X.; ZHANG, L. Cell-free mitochondrial DNA in human follicular fluid: a promising bio-marker of blastocyst

developmental potential in women undergoing assisted reproductive technology. **Reproductive Biology Endocrinology**. 2019 Jul 10;17(1):54. doi: 10.1186/s12958-019-0495-6. PMID: 31291946; PMCID: PMC6621940.

LIU, J.; TU, F.; YAO, W.; LI, X.; XIE, Z.; LIU, H.; LI, Q.; PAN, Z. Conserved miR-26b enhances ovarian granulosa cell apoptosis through HAS2-HA-CD44-caspase-3 pathway by targeting HAS2. *Sci. Rep.* **2016**, 6, 21197.

LIU, X., MAI, H., CHEN, P., ZHANG, Z., WU, T., CHEN, J., SUN, P., ZHOU, C., LIANG, X., HUANG, R. Comparative analyses in transcriptome of human granulosa cells and follicular fluid micro-environment between poor ovarian responders with conventional controlled ovarian or mild ovarian stimulations. **Reproductive Biology Endocrinology**. 2022 Mar 21;20(1):54. doi: 10.1186/s12958-022-00926-1. PMID: 35313911; PMCID: PMC8935846.

LÉDÉE, N., GRIDELET, V., RAVET, S., JOUAN, C., GASPARD, O., WENDERS, F., THONON, F., HINCOURT, N., DUBOIS, M., FOIDART, J.M., MUNAUT, C, PERRIER D'HAUTERIVE, S. Impact of follicular G-CSF quantification on subsequent embryo transfer decisions: a proof of concept study. **Human Reproduction**. 2013 Feb;28(2):406-13. doi: 10.1093/humrep/des354. Epub 2012 Dec 6. PMID: 23223438; PMCID: PMC3545637.

LI, H.G.; HUANG, S.Y.; ZHOU, H.; LIAO, A.H.; XIONG, C.L. Quick recovery and characterization of cell-free DNA in seminal plasma of normozoospermia and azoospermia: implications for non-invasive genetic utilities. **Asian Journal of Andrology**. 11(6):703-9, 2009.

LIU, N. N. et al. Comparison of follicular fluid amphiregulin and EGF concentrations in patients undergoing IVF with different stimulation protocols. **Endocrine**, v. 42, n. 3, p. 708-716, Dec. 2012.

LONERGAN, P.;MONAGHAN, P.;RIZOS,D.; BOLAND, M.P.;GORDON, I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 37, p. 48-53,1994.

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

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

MBAYE, M.; KHALFI, B.; LOUANJLI, N.; SAADANI, B.; KAAROUCH, I.; MADKOUR, A.; SOUKRI, A. Seminal Cell-Free DNA Test for the Management of Male Infertility. **Annual Research & Review in Biology**, 30(5): 1-10, 2019.

MACHADO, G.M.; CARVALHO, J.O.; FILHO, E.S.; CAIXETA, E.S.; FRANCO, M.M.; RUMPF, R. et al. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**. 2009;71:1289-97.

MACHTINGER, R.; RODOSTHENOUS, R.S.; ADIR, M.; MANSOUR, A.; RACOWSKY, C.; BACCARELLI, A.A.; et al. Extracellular microRNAs in follicular fluid and their potential association with oocyte fertilization and embryo quality: an exploratory study. **Journal of assisted reproduction and genetics**. 2017;34:525-33.

MAMO, S. et al. Sequential analysis of global gene expression profiles in immature and in vitro matured bovine oocytes: potential molecular markers of oocyte maturation. **BMC Genomics**, v.12, p.151-165, 2011.

MATOBA, S.; BENDER, K.; FAHEY, A.G.; SOLOMON, M.; BRENNAN, L.; LONERGAN, P.; et al. Predictive value of bovine follicular components as markers of oocyte developmental potential. **Reproduction Fertility and Development** 2014;26:337–45.

MAZZONI, G.; SALLEH, S.M.; FREUDE, K.; PEDERSEN, H.S.; STROEBECH, L.; CALLESEN, H.; et al. (2017) Identification of potential biomarkers in donor cows for *in vitro* embryo production by granulosa cell transcriptomics. **PLoS ONE** 12(4): e0175464. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175464>

MELO, E. O.; CORDEIRO, D. M.; PELLEGRINO, R.; WEI, Z.; DAYE, Z. J.; NISHIMURA, R. C.; DODE, M. A. N. (2017), Identification of molecular markers for oocyte competence in bovine cumulus cells. **Anim Genet**, 48: 19–29. doi:10.1111/age.12496

MENDOZA, C. et al. Follicular fluid markers of oocyte developmental potential. **Human Reproduction**, v. 17, n. 4, p. 1017-1022, Apr. 2002.

MIYANO, T. Bringing up small oocytes to eggs in pigs and cows. **Theriogenology**, v. 59, p. 61-72, 2003.

MORENO, J.M.; NÚÑEZ, M.J.; QUIÑONERO, A.; MARTÍNEZ, S.; DE LA ORDEN, M.; SIMÓN, C.; et al. Follicular fluid and mural granulosa cells microRNA profiles vary in in vitro fertilization patients depending on their age and oocyte maturation stage. **Fertility and sterility**. 2015;104:1037-46. e1.

MOUROT, M.; DUFORT, I.; GRAVEL, C.; ALGRIANY, O.; DIELEMAN, S.; SIRARD, M.A. The influence of follicle size, FSH-enriched maturation medium, and early cleavage on bovine oocyte maternal mRNA levels. **Molecular Reproduction and Development** 2006;73:1367–79.

MOULIERE, F., CHANDRANANDA, D., PISKORZ, A.M., et al. Enhanced detection of circulating tumor DNA by fragment size analysis. *Sci Transl Med*. 2018 Nov 7;10(466):eaat4921. doi: 10.1126/scitranslmed.aat4921. PMID: 30404863; PMCID: PMC6483061.

MUNAKATA, Y.; SHIRASUNA, K.; KUWAYAMA, T.; IWATA, H. Cell-free DNA in medium is associated with the maturation ability of in vitro cultured oocytes. **Journal of Reproduction and Development**. 2019;65(2):171-175. doi:10.1262/jrd.2018-123

NIVET, A.L.; VIGNEAULT, C.; BLONDIN, P.; SIRARD, M.A. Changes in granulosa cells' gene expression associated with increased oocyte competence in bovine. **Reproduction**. 2013;145(6):555-65.

OLSEN, J.A., KENNA, L.A., TIPON, R.C., SPELIOSMG, STECKERMM, AKIRAV, E.M. A minimally-invasive blood-derived biomarker of oligodendrocyte cell-loss in multiple sclerosis. *EBioMedicine*. 2016;10: 227–35.

PAN, M.; SHI, H.; LIU, Z.; DONG, J.; CAI, L.; GE, Q. The integrity of cfDNA in follicular fluid and spent medium from embryo culture is associated with embryo grade in patients undergoing in vitro fertilization. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**. 2021 Dec;38(12):3113-3124. doi: 10.1007/s10815-021-02357-0. Epub 2021 Nov 24. PMID: 34820723; PMCID: PMC8666408.

PAVLOK, A., LUCAS-HAHN, A., NIEMANN, H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Molecular Reproduction and Development**. 1992 Jan;31(1):63-7. doi: 10.1002/mrd.1080310111. PMID: 1562328.

PICTON, H.M.; BRIGGS, D.; GOSDEN, R.G. The molecular basis of oocyte growth and development. [Review]. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 145, n. (1-2), p. 27-37, 1998.

PIZARRO, B.M., CORDEIRO, A., REGINATTO, M.W., CAMPOS, S.P.C., MANCEBO A.C.A., AREAS, P.C.F., ANTUNES, R.A., SOUZA, M.D.C.B., OLIVEIRA, K.J., BLOISE F.F., BLOISE, E., FORTUNATO, R.S., ORTIGA-CARVALHO, T.M. Estradiol and Progesterone Levels are Related to Redox Status in the Follicular Fluid During *in vitro* Fertilization. *J Endocr Soc*. 2020 Jun 1;4(7):bvaa064. doi: 10.1210/jendso/bvaa064. PMID: 32666010; PMCID: PMC7326473.

PFEFFER, P.L.; SISCO, B.; DONNISON, M.; SOMERS, J.; SMITH, C. Isolation of genes associated with developmental competency of bovine oocyte. **Theriogenology** 2007;68:S84–90.

PUJOL, M.; LÓPEZ-BÉJAR, M.; PARAMIO, M.T. Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. **Theriogenology**, v. 61, p.735-44, 2004.

QUETGLAS, M. D. **Efeito do bloqueio meiótico na expressão, atividade e distribuição do fator promotor da meiose (MPF) e da proteína cinase ativada por mitose (MAPK) em oócitos bovinos**. Pirassununga: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, 2007. 90p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, 2007.

RACEDO, S.E.; WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; SALAMONE, D.; NIEMANN, H. Effects of follicle size and stages of maturation on mRNA expression in bovine *in vitro* matured oocytes. **Molecular Reproduction and Development** 2008;75: 17–25.

REN, S.; REN, X.D.; GUO, L.F.; QU, X.M.; SHANG, M.Y.; DAI, X.T.; HUANG, Q. Urine cell-free DNA as a promising biomarker for early detection of non-small cell lung cancer. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**. 13: e23321, 2020.

REVELLI, A.; DELLE PIANE, L.; CASANO, S.; MOLINARI, E.; MASSOBRIO, M.; RINAUDO, P. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. **Reproductive Biology and Endocrinology** 2009; 7:40.

RICHANI, D., DUNNING, K.R., THOMPSON, J.G., GILCHRIST, R.B. Metabolic co-dependence of the oocyte and cumulus cells: essential role in determining oocyte developmental competence. **Human Reproduction Update**. 2021 Jan 4;27(1):27-47. doi: 10.1093/humupd/dmaa043. PMID: 33020823.

RIZOS, D.; LONERGAN, P.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M.P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implication for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, p.234-248, 2002.

ROBERT, C.; BARNES, F.L.; HUE, I.; SIRARD, M.A. Subtractive hybridization used to identify mRNA associated with the maturation of bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.57, p. 167-175, 2000.

ROBERT, C.; GAGNE, D.; BOUSQUET, D.; BARNES, F. L.; SIRARD, M-A. Differential display and suppressive subtractive hybridization used to identify granulosa cell messenger RNA associated with bovine oocyte developmental competence. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1812-1820, 2001.

RODGERS, R.J.; IRVING-RODGERS, H.F. Formation of the ovarian follicular antrum and follicular fluid. **Biology of Reproduction**, 2010; 82:1021–1029.

RODRÍGUEZ-GONZÁLES, E.; LÓPEZ-BÉJAR, M.; VELILLA, E.; PARAMIO, M.T. Selection of prepubertal goat oocytes using the brilliant cresyl blue test. **Theriogenology**, v.57, p. 1397-409, 2002.

ROMAR, R.; DE SANTIS, T.; PAPILLIER, P.; PERREAU, C.; THELIE, A.; DELL' AQUILA, M.E. et al. Expression of maternal transcripts during bovine oocyte *in vitro* maturation is affected by donor age. **Reproduction in Domestic Animals** 2011;46:e23–30.

RUSSELL, D.L., OCHSNER, S.A., HSIEH, M., MULDER, S., RICHARDS, J.S. Hormone-regulated expression and localization of versican in the rodent ovary. **Endocrinology**, v. 144, n.3, p. 1020-1031, 2003.

RUSSELL, D. L.; SALUSTRI, A. Extracellular matrix of the cumulus-oocyte complex. **Seminars in Reproductive Medicine**, Sep., v. 24, n.4, p. 217-227, 2006.

SANCHES, B.V.; LUNARDELLI, P.A.; TANNURA, J.H.; CARDOSO, B.L.; PEREIRA, M.H.C.; GAITKOSKI, D.; BASSO, A.C.; ARNOLD, D.R.; SENEDA, M.M. A new direct transfer protocol for cryopreserved IVF embryos. **Theriogenology**, v.85, p. 1147-1151, 2016.

SARAPIK, A. et al. Follicular proinflammatory cytokines and chemokines as markers of IVF success. **Clinical & Developmental Immunology**, v. 2012, art. 606459, p. 1-10, 2012.

SATHANANTHAN, A. H. Ultrastructurak changes during meiotic maturation in mammalian oocytes: unique aspects of the human oocyte. **Microscopy Research and Technique**, v. 27, p. 145-164, 1994.

SALEHI, E., AFLATOONIAN, R., MOEINI, A., YAMINI, N., ASADI, E., KHOSRAVIZADEH, Z., TARZJANI, M.D., HARAT, Z.N., ABOLHASSANI, F. Apoptotic biomarkers in cumulus cells in relation to embryo quality in polycystic ovary syndrome. **Arch Gynecol Obstet**. 2017 Dec;296(6):1219-1227. doi: 10.1007/s00404-017-4523-5. Epub 2017 Oct 7. PMID: 28988321.

SCALICI, E.; TRAVER, S.; MOLINARI, N.; MULLET, T.; MONFORTE, M.; VINTEJOUX, E.; HAMAMAH, S. Cell-free DNA in human follicular fluid as a biomarker of embryo quality. **Human Reproduction**. 2014 Dec;29(12):2661-9. doi: 10.1093/humrep/deu238. Epub 2014 Sep 29. PMID: 25267787.

SHEN. Q.; CHEN, M.; ZHAO, X.; LIU, Y.; REN, X.; ZHANG, L. Versican expression level in cumulus cells is associated with human oocyte developmental competence. *Syst Biol Reprod Med*. 2020 Jun;66(3):176-184. doi: 10.1080/19396368.2020.1725685. Epub 2020 Mar 6. PMID: 32138539.

SENEDA, M.M., ESPER, C.R., GARCIA, J.M., OLIVEIRA, J.A., VANTINI, R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**. 2001 Jul 3;67(1-2):37-43. doi: 10.1016/s0378-4320(01)00113-0. PMID: 11408112.

SIMONI, M.; GROMOLL, J.; NIESCHLAG, E. The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. **Endocrine Reviews**, v.18, p.739-773, 1997.

SIRARD, M.A. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v. 55, p. 1241-1254, 2001.

SIRARD, M. A.; DUFORT, I.; COENEN, K.; TREMBLAY, K.; MASSICOTTE, L.; ROBERT, C. The use of genomics and proteomics to understand oocyte and early embryo functions in farm animals. **Reproduction**, suppl. 61, p. 117-129, 2003.

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

SIRARD, M.A.; DESROSIER, S.; ASSIDI, M. In vivo and in vitro effects of FSH on oocyte maturation and developmental competence. **Theriogenology**, v.68, p.71-76, 2007.

SOHEL, M.M.; HOELKER, M.; NOFERESTI, S.S.; SALILEW-WONDIM, D.; THOLEN, E.; LOOFT, C.; RINGS, F.; UDDIN, M.J.; SPENCER, T.E.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Exosomal and non-exosomal transport of extra-cellular microRNAs in follicular fluid: implications for bovine oocyte developmental competence. **PLoS One** 2013; 8:e78505.

SPINDLER, K.L., PALLISGAARD, N., ANDERSEN, R.F., BRANDSLUND, I., JAKOBSEN, A. Circulating free DNA as biomarker and source for mutation detection in metastatic colorectal cancer. **PLoS One**. 2015 Apr 13;10(4):e0108247. doi: 10.1371/journal.pone.0108247. PMID: 25875772; PMCID: PMC4395277.

SPRÍCIGO, J.F.W., GUIMARÃES, A.L.S., CUNHA, A.T.M., LEME, L.O., CARNEIRO, M.C., FRANCO, M.M., DODE, M.A.N. Using Cumulus Cell Biopsy as a Non-Invasive Tool to Access the Quality of Bovine Oocytes: How Informative Are They? *Animals (Basel)*. 2022 Nov 11;12(22):3113. doi: 10.3390/ani12223113. PMID: 36428341.

STROUN, M.; LYAUTEY, J.; LEDERREY, C.; OLSON-SAND, A.; ANKER, P. About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. **Clinica Chimica Acta**. 313(1-2):139-42, 2001.

SURAJ, S.; DHAR, C.; SRIVASTAVA, S. Circulating nucleic acids: An analysis of their occurrence in malignancies. **Biomedical reports**. 6(1): 8–14, 2017.

SUTTON-MCDOWALL, M.L.; GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. **Reproduction**, v. 139, p.685–95, 2010.

SU, Y.Q.; SUGIURA, K.; EPPIG, J.J. Mouse oocyte control of granulosa cell development and function: paracrine regulation of cumulus cell metabolism. **Seminars in Reproductive Medicine**, v.27, p. 32–42, 2009.

SUGIYAMA, R., FUZITOU, A., TAKAHASHI, C., AKUTAGAWA, O., ITO, H., NAKAGAWA, K., SUGIYAMA, R., ISAKA, K. Bone morphogenetic protein 2 may be a good predictor of success in oocyte fertilization during assisted reproductive technology. **Human Cell**. 2010 Aug;23(3):83-8. doi: 10.1111/j.1749-0774.2010.00088.x. Epub 2010 Oct 4. PMID: 20973833.

TAKAHASHI, M.; NAGAI, T.; HAMANO, S. et al. Effect of thiol compounds on in vitro development and intracellular glutathione content of bovine embryos. **Biology of Reproduction**, v. 49, n.2, p.228-232, 1993.

TATEMOTO, H.; SAKURAI, N.; MUTO, N. Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during in vitro maturation: role of cumulus cells. **Biology of Reproduction**, v.63, p.805-810, 2000.

TEISSIER, M.P.; CHABLE, H.; PAULHAC, S.; AUBARD, Y.: Comparison of follicle steroidogenesis from normal and polycystic ovaries in women undergoing IVF: relationship between steroid concentrations, follicle size, oocyte quality and fecundability. **Human Reproduction** 2000, 15:2471-2477.

TESARIK, J.; MENDOZA, C.: Direct non-genomic effects of follicular steroids on maturing human oocytes: oestrogen versus androgen antagonism. **Human Reproduction Update** 1997, 3:95-100

TRAVER, S.; SCALICI, E.; MULLET, T.; MOLINARI, N.; VINCENS, C.; ANAHORY, T.; HAMAMAH, S. Cell-free DNA in Human Follicular Microenvironment: New Prognostic Biomarker to Predict in vitro Fertilization Outcomes. **PLoS One**. 2015 Aug 19;10(8):e0136172. doi: 10.1371/journal.pone.0136172. PMID: 26288130; PMCID: PMC4545729.

TORNER, H.; GHANEM, N.; AMBROS, C.; HOLKER, M.; TOMEK, W.; PHATSARA, C.; et al. Molecular and subcellular characterization of oocytes screened for their developmental competence based on glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. **Reproduction**, v. 135, p.197- 212, 2008.

UYAR, A.; TORREALDAY, S.; SELI, E. Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality. **Fertility and Sterility** 2013;99:979–97.

VARRAS, M., POLONIFI, K., MANTZOURANI, M. *et al.* Expression of antiapoptosis gene survivin in luteinized ovarian granulosa cells of women undergoing IVF or ICSI and embryo transfer: clinical correlations. **Reproductive Biology and Endocrinology** 10, 74 (2012). <https://doi.org/10.1186/1477-7827-10-74>

VAN DE LEEMPUT, E.E.; VOS, P.L.A.M.; ZEINSTRA, E.C.; BEVERS, M.M.; VAN DERWEIJDEN, G.C.; DIELEMANA, S.J. Improvement of in vitro embryo development using in vivo matured oocytes from heifers treated for superovulation with a controlled preovulatory LH surge. **Theriogenology**, v.52, p.335-349, 1999.

VAN MONTFOORT, A. P.; GERAEDTS, J.P.; DUMOULIN, J.C. STASSEN, A.P.M.; EVERS, J.L.H.; AYOUBI, T.A.Y. Differential gene expression in cumulus cells as a prognostic indicator of embryo viability: a microarray analysis. **Molecular Human Reproduction**, Mar, v. 14, n.3, p. 157-168, 2008.

VIANA, J. H. M. et al. Brazilian embryo industry in context: pitfalls, lessons, and expectations for the future. **Animal Reproduction** [S.I.], v. 14, n. 3, p. 476-81, Sept 2017.

XU, X.; CHEN,D.; ZHANG, Z.; WEI, Z.; CAO,Y. Molecular signature in human cumulus cells related to embryonic developmental potential. **Reproductive Sciences**, v.22, n.2, p.173-180, 2015.

YEO, C.; GILCHRIST, R.B.; LANE, M. Disruption of bidirectional oocyte-cumulus paracrine signaling during in vitro maturation reduces subsequent mouse oocyte developmental competence. **Biology of Reproduction**, v. 80, p. 1072-1080, 2009.

WALTERS, K.A., EID, S., EDWARDS, M.C, et al. Steroid profiles by liquid chromatography-mass spectrometry of matched serum and single dominant ovarian follicular fluid from women undergoing IVF. *Reprod Biomed Online*. 2019;**38**(1):30-37.

WATHLET, S.; ADRIAENSSENS, T.; SEGERS, I.; VERHEYEN, G.; VAN DE VELDE, H.; COUCKE, W.; et al. Cumulus cell gene expression predicts better cleavage-stage embryo or blastocyst development and pregnancy for ICSI patients. **Human Reproduction**, v.26, p.1035-1051, 2011.

WU, J.; TIAN, Q. Role of follicle stimulating hormone and epidermal growth factor in the development of porcine preantral follicle in vitro. **Zygote**, v.15, p.233–240, 2007.

WYSE, B.A.; FUCHS WEIZMAN, N.; KADISH, S.; BALAKIER, H.; SANGARALINGAM, M.; LIBRACH, C.L. Transcriptomics of cumulus cells - a window into oocyte maturation in humans. **J Ovarian Res**. 2020 Aug 12;13(1):93. doi: 10.1186/s13048-020-00696-7. PMID: 32787963; PMCID: PMC7425158.

## CAPÍTULO 2

### ARTIGO 1

#### **Protein source in maturation media affects gene expression in cumulus cells and embryo development in cattle**

Nayara Ribeiro Kussano<sup>1</sup>; Ligiane de Oliveira Leme<sup>2</sup>; Margot Alves Nunes Dode<sup>1, 3\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biology, University of Brasilia, Brasília-DF, 70910-900, Brazil.

<sup>2</sup>Federal University of Espírito Santo, Animal Science, Vitoria-ES, 29075-073, Brazil.

<sup>3</sup>Laboratory of Animal Reproduction, Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, Brasília-DF, 70770-900, Brazil.

**Artigo publicado na revista *Animal Biotechnology*, 29 Dec 2021**

**DOI:** <https://doi.org/10.1080/10495398.2021.2019755>

## **Fonte de proteína no meio de maturação afeta expressão gênica em células do cumulus e o desenvolvimento embrionário em bovinos**

### **1.1 RESUMO**

Um dos fatores responsáveis pela falta de repetibilidade dos resultados na identificação de marcadores de competência ovocitária em células do *cumulus* (CC), pode ser a fonte proteica (FP) utilizada durante a maturação *in vitro* (MIV). Sendo assim, o objetivo foi avaliar se as alterações na FP durante a MIV afetam o sexo / desenvolvimento do embrião e o perfil de quantificação de transcritos em CC. Os resultados mostraram que a FP pode afetar o desenvolvimento embrionário se o soro for usado tanto na MIV quanto no CIV. No entanto, quando o embrião é cultivado em BSA, o uso de BSA ou SFB durante a MIV não afeta o desenvolvimento embrionário. Além disso, a FP durante a MIV também influencia a quantidade de transcritos em CC e deve ser considerado quando marcadores de qualidade ovocitária são estudados.

Palavras-chave: ovócitos, soro fetal bovino, albumina sérica bovina, marcadores moleculares, expressão gênica

### **1.2 Introdução**

A produção *in vitro* de embriões bovinos é uma técnica de reprodução assistida bem estabelecida e utilizada rotineiramente. Entretanto, apesar de todos os avanços nos sistemas de produção na última década, as taxas de embriões produzidos e prenhez ainda permanecem estáveis, em torno de 40% (VIANA et al., 2017; LACERDA et al., 2020; KUSSANO et al., 2021). Onde a qualidade e competência dos ovócitos imaturos utilizados são um dos principais fatores pela falta de incremento desses índices.

Portanto, é essencial que se busque parâmetros que possam indicar de forma mais precisa a qualidade dos ovócitos a serem usados para a maturação *in vitro*. A busca por biomarcadores de competência ovocitária, de fato, tem sido o objetivo de muitos pesquisadores. A maioria dos estudos tem focado, principalmente, no perfil de expressão gênica em células do cumulus (CC), avaliando o transcriptoma ou apenas

alguns genes candidatos. Apesar de vários trabalhos sugerirem vários genes candidatos a marcadores moleculares (KUSSANO et al., 2016; MATOBA et al., 2014; HAMEL et al., 2008; MELO et al., 2017), o consenso entre esses achados é muito limitado (KORDUS et al., 2017).

Vários fatores podem ser responsáveis pela falta de repetibilidade dos resultados na identificação de marcadores de competência ovocitária em CC, dentre eles pode-se citar os protocolos de superestimulação ovariana, as características das doadoras e o sistema de maturação. No que se refere ao sistema de maturação, além da tensão de oxigênio, outros fatores tais como os suplementos e a fonte proteica, podem ser importantes e afetar o resultado final. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar se as alterações na FP durante a MIV afetam o desenvolvimento do embrião e o perfil de quantificação de transcritos em CC.

### **1.3 Material e Métodos**

Inicialmente foi avaliado o efeito do FP durante a MIV no desenvolvimento e sexo do embrião. Ovócitos bovinos foram maturados na presença de SFB ou BSA e cultivados na presença de SFB. O segundo experimento foi semelhante ao primeiro; apenas a etapa do cultivo que foi realizada na presença de BSA e não de SFB como no anterior. Em ambos os experimentos, a determinação do sexo dos embriões foi realizada em 30 blastocistos/grupo usando PCR e a taxa de blastocistos foi avaliada no dia 8 de desenvolvimento. Finalmente, o efeito de FP durante a MIV nos perfis de quantificação de transcritos dos genes GPC4, VCAN, GHR, PTGS2 e ALCAM nas CC foi avaliado usando RT-qPCR. Uma biópsia de CC foi removida antes e depois da MIV na presença de SFB ou BSA. Após a biópsia, os CCO foram fecundados e cultivados *in vitro*. As CC foram agrupadas de acordo com os resultados de desenvolvimento dos CCO nos grupos: CC de CCO imaturos, CC de CCO que resultam ou não em embriões (SFB e BSA).

### **1.4 Resultados**

Os resultados mostraram que quando o cultivo *in vitro* (CIV) foi realizado na presença de SFB, a taxa de blastocisto foi maior ( $P < 0,05$ ) nos ovócitos que maturaram em SFB (64,8%), em comparação com aqueles que maturaram em BSA

(50,5%). No entanto, quando os embriões foram cultivados com BSA, nenhum efeito ( $P > 0,05$ ) de FP durante a MIV foi observado na taxa de blastocisto (BSA = 37,3%; FBS = 41,1%). A FP usada durante a MIV não afetou o sexo dos embriões ( $P > 0,05$ ). A análise da expressão gênica mostrou que o FP mudou os perfis de transcritos dos genes VCAN, GHR, PTGS2 e ALCAM durante a maturação. No entanto, quando a quantificação do gene foi comparada entre os grupos de CC imaturas e maturadas, nenhum dos genes foi diferencialmente expresso em CC que resultaram ou não em embriões. O gene GHR, foi o único gene diferencialmente expresso ( $P < 0,05$ ) em CC imaturas que deram ou não embrião. Somente quando SFB foi usado em MIV. Esse gene, portanto, pode ser considerado um marcador de competência ovocitária.

Em conclusão, a FP pode afetar o desenvolvimento embrionário se o soro for usado tanto na MIV quanto no CIV. No entanto, quando o embrião é cultivado em BSA, o uso de BSA ou SFB durante a MIV não afeta o desenvolvimento embrionário. Além disso, a FP durante a MIV também influencia a quantidade de transcritos em CC e deve ser considerado quando da prospecção de marcadores moleculares.

### 1.5 Referências Bibliográficas

KUSSANO NR, LEME LO, GUIMARÃES AL, FRANCO MM, DODE MA. Molecular markers for oocyte competence in bovine cumulus cells. **Theriogenology**. 2016;85:1167-76.

SANCHES BV, LUNARDELLI PA, TANNURA JH, CARDOSO BL, PEREIRA MH, GAITKOSKI D, et al. A new direct transfer protocol for cryopreserved IVF embryos. **Theriogenology**. 2016;85:1147-51.

VIANA J, SILVA DE FIGUEIREDO AC, SIQUEIRA L. Brazilian embryo industry in context: Pitfalls, lessons, and expectations for the future. **Animal Reproduction**. 2017;14:476-81.

SIRARD MA, DUFORT I, COENEN K, TREMBLAY K, MASSICOTTE L, ROBERT C. The use of genomics and proteomics to understand oocyte and early embryo functions in farm animals. **Reproduction** (Cambridge, England) Supplement. 2003;61:117-29.

LONERGAN P, RIZOS D, GUTIERREZ-ADAN A, FAIR T, BOLAND MP. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns.

**Reproduction in domestic animals** = Zuchthygiene. 2003;38:259-67.

KRISHER RL. The effect of oocyte quality on development. **Journal of animal science**. 2004;82 E-Suppl:E14-23.

MATOBA S, BENDER K, FAHEY AG, MAMO S, BRENNAN L, LONERGAN P, et al. Predictive value of bovine follicular components as markers of oocyte developmental potential. *Reproduction, fertility, and development*. 2014;26:337-45.

HAMEL M, DUFORT I, ROBERT C, GRAVEL C, LEVEILLE MC, LEADER A, et al. Identification of differentially expressed markers in human follicular cells associated with competent oocytes. **Human reproduction**. 2008;23:1118-27.

ASSIDI M, MONTAG M, VAN DER VEN K, SIRARD MA. Biomarkers of human oocyte developmental competence expressed in cumulus cells before ICSI: a preliminary study. **Journal of assisted reproduction and genetics**. 2011;28:173-88.

UYAR A, TORREALDAY S, SELI E. Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality. **Fertility and sterility**. 2013;99:979-97.

BUNEL A, JORSSEN EP, MERCKX E, LEROY JL, BOLS PE, SIRARD MA. Individual bovine in vitro embryo production and cumulus cell transcriptomic analysis to distinguish cumulus-oocyte complexes with high or low developmental potential.

**Theriogenology**. 2015;83:228-37.

MELO EO, CORDEIRO DM, PELLEGRINO R, WEI Z, DAYE ZJ, NISHIMURA RC, et al. Identification of molecular markers for oocyte competence in bovine cumulus cells.

**Animal genetics**. 2017;48:19-29.

## ARTICLE 1

### **Protein source in maturation media affects gene expression in cumulus cells and embryo development in cattle**

Nayara Ribeiro Kussano<sup>1</sup>; Ligiane de Oliveira Leme<sup>2</sup>; Margot Alves Nunes Dode<sup>1, 3\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biology, University of Brasilia, Brasília-DF, 70910-900, Brazil.

<sup>2</sup>Federal University of Espírito Santo, Animal Science, Vitoria-ES, 29075-073, Brazil.

<sup>3</sup>Laboratory of Animal Reproduction, Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, Brasília-DF, 70770-900, Brazil.

#### **2.1 Abstract**

We aimed evaluate if protein source (PS) alterations during IVM affect embryo sex/development and gene expression profile in cumulus cells (CCs). Bovine oocytes were matured and cultured in the presence of FBS or BSA. Then, PS effect during IVM on gene expression (GPC4, VCAN, GHR, PTGS2, and ALCAM) was determined. CC biopsy was removed before and after IVM treatments. After fertilization and cultured, CCs were grouped according their fate into: CCs from immature COCs, CCs from COCs that did or did not result in embryos (according to PS). Results showed that when culture was performed in FBS presence, blastocyst rate was higher ( $P < 0.05$ ) than BSA. However, when embryos were cultured with BSA, no effect ( $P > 0.05$ ) of PS during IVM was observed. PS used during IVM did not affect embryos sex ( $P > 0.05$ ) but changed VCAN, GHR, PTGS2, and ALCAM genes expression. No differences ( $P > 0.05$ ) were observed between immature and mature CCs groups in gene expression, regardless their fate. Only GHR gene was related to embryo production but just with FBS on IVM. In conclusion, PS can affect embryo development when using serum on IVM and IVC, influences CCs gene expression, and has to be considered when studying oocyte quality markers.

**Keywords:** oocytes, fetal bovine serum, bovine serum albumin, molecular markers, gene expression

## 2.2 Introduction

*In vitro* embryo production (IVP) is a well-established assisted reproductive technique that is routinely used in various countries for humans and domestic animals. Despite all the advances achieved in IVP systems in the last decade, the embryo and pregnancy rates in the bovine have remained around 40-50% [1-3]. One of the main factors responsible for the lack of improvement in these rates is the quality and/or competence level of the immature oocytes used. First, the oocytes obtained for IVP using ovum pick-up are removed prematurely from their follicles and many of them are not fully competent. Second, only the competent ones can complete maturation and have normal embryonic development [4, 5].

Selection of the best quality oocytes for IVP still relies mainly on morphological criteria. However, morphological evaluation is insufficient to differentiate competent oocytes from less competent ones [5, 6]. Therefore, it is essential to search for other parameters that can indicate oocyte quality, enabling a more accurate selection that can lead to an increase in the efficiency of IVP in animals and humans. Indeed, the search for non-invasive biomarkers of oocyte competence has been a goal for many researchers, especially, in the human area.

Several studies have identified potential biomarkers in follicular fluid [7, 8], maturation media, granulosa cells (GCs) and cumulus cells (CCs) [9-12]. These markers involve hormones, proteins, lipids, RNAs, microRNA, and cell free DNA, among others. However, till date none of those markers have made it into clinical

practice because the results of studies carried out on them remain controversial and therefore, require further validation.

The most promising and investigated subject in this area is the use of gene expression profiles in CCs, either evaluating the entire transcriptome or only a few candidate genes. Although several genes have already been identified as candidate molecular markers for oocyte competence using CCs [1, 7, 13-17] there is limited consensus between the findings of different studies [18]. A possible explanation for the lack of consensus on candidate genes that can serve as markers for oocyte competence is that IVP outcomes can be affected by various factors, such as ovarian stimulation protocols, patient characteristics, and *in vitro* maturation (IVM) systems, which leads to variability among results.

Related to maturation system, besides oxygen tension and media supplements, other important factors include the protein source (PS), which has not been given its due attention in studies searching for biomarkers. The PS was a big concern a few years ago, but related to embryo culture and not the maturation system. It is well known that the use of fetal bovine serum (FBS) or bovine serum albumin (BSA) during the *in vitro* culture (IVC) of bovine embryos affects their quality and development [19, 20]. The most affected parameters are blastocyst rates, total cell numbers, percentage of apoptotic cells, metabolism, cryotolerance, and gene expression. However, little is known about the effect of use of BSA during maturation on the gene expression profiles in CCs and embryo production in domestic animals. The elucidation of this effect can contribute significantly to studies that aim to identify markers in CCs and those that aim to exclude serum from the culture systems for IVP in cattle.

In the present study, we selected five genes that have already been reported as candidate genes and evaluated if their potential as markers for oocyte competence changes according to the stage of maturation and the PS used during IVM. Genes selected were: Glypican 4 (GPC4), a heparan sulfate proteoglycan that is associated with the cell surface and is involved in several biological processes [1]; Versican (VCAN), a proteoglycan that binds to hyaluronic acid in the expanded cumulus matrix [16]; Growth Hormone Receptor (GHR), required to mediate the actions of growth hormone [21]; Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM), mediates cell-to-cell interactions and is involved in CC expansion [22]; Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2 (PTGS2), is the key enzyme in prostaglandin biosynthesis [23]. In addition, we evaluated if the PS during IVM also affects embryo development.

### **2.3 Materials and methods**

Unless otherwise indicated, the reagents and chemicals used in this study were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

#### **Oocyte recovery**

Ovaries from Nelore females were collected from local abattoirs immediately after slaughter and transported in saline solution (0.9% NaCl) supplemented with antibiotics (100 IU/mL penicillin G and 100 µg/mL of streptomycin) at 32-35°C. The time between ovaries collection at slaughterhouse until the end of processing and maturation of oocytes was no longer than 4 h.

The follicles were dissected using scalpels, tweezers, and scissors at room temperature [21]. During dissection, the follicles were kept in washing medium (TCM-199 with Hank's salts supplemented with 0.4% BSA) on a hot plate maintained at 36°C.

The follicles were measured using a graduated eyepiece (OSM-4, Olympus, Tokyo, Japan) and only cumulus-oocyte-complexes (COCs) from 4-6 mm diameter-sized follicles, with a homogenous cytoplasm, and at least four layers of CCs were used.

### **Biopsies of cumulus cells**

Immediately after selection, immature COCs were individually placed in 50  $\mu$ L drops of follicular fluid (previously centrifuged at 700 g for 5 min). A small fragment of the CCs was removed using a needle (26G), and the COCs were immediately placed in maturation media and transferred to the incubator. After the maturation period, a new biopsy was performed on each COC to remove a small fragment of the matured CCs using a needle (26G). The individual immature and mature biopsies were washed twice with 50  $\mu$ L drops of phosphate-buffered saline (PBS), identified, and stored in RNAlater (Ambion<sup>®</sup> Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) at -80°C until further use.

### ***In vitro* maturation**

COCs were matured in maturation media consisting of TCM-199 supplemented with 10% FBS (Gibco<sup>®</sup>, Carlsbad, CA, USA) or 0.4% BSA–fatty acid-free, 0.01 IU/mL follicle-stimulating hormone (FSH), 0.1 mg/mL L-glutamine, 0.075 mg/mL amikacin, and 0.1  $\mu$ M cysteamine. COCs were then matured for 22 h at 38.5°C in 5% CO<sub>2</sub>. The oocytes were matured either in groups (control) or individually in a microdrop.

In the control group, COCs (20-25 per replicate) were washed in IVM media and transferred to a 150  $\mu$ L drop of IVM media covered with mineral oil.

For individual culture, 20  $\mu$ L microdrops (16) were placed on a 60 mm diameter petri-dish covered with mineral oil. COCs were individually washed, transferred to previously identified droplets, and matured.

### ***In vitro* fertilization**

Following maturation, COCs from the control group were transferred to 150  $\mu$ L of fertilization media consisting of Tyrode's albumin lactate pyruvate (TALP) [24] supplemented with 2 mM penicillamine, 1 mM hypotaurine, 250 mM epinephrine, and 10  $\mu$ g/mL heparin. Frozen semen from a bull of proven fertility was used for all the treatments and replicates. Motile spermatozoa were obtained using the Percoll gradient method (GE<sup>®</sup> Healthcare, Piscataway, NJ, USA) in microtubes [25] and then added to the fertilization droplet at a final concentration of  $1 \times 10^6$  spermatozoa/mL. Spermatozoa and oocytes were co-incubated for 18 h at 39°C in 5% CO<sub>2</sub>. Day 0 was considered to be the day of *in vitro* insemination.

For the microdrop system, a solution was prepared using 350  $\mu$ L of fertilization media and sperm was added to it at a final concentration of  $1 \times 10^6$ /mL. This solution was used to prepare 16 microdrops (20  $\mu$ L); the matured oocytes were individually transferred to each drop.

### **Embryo culture (*in vitro* culture)**

After 18 h of co-incubation, the presumptive zygotes were washed and transferred to synthetic oviduct fluid (SOF) media with amino acids, citrate, and inositol (SOFaaci) [26], supplemented with 10% FBS or 0.4% BSA and incubated at 38.5°C in 5% CO<sub>2</sub> for eight days. For the control groups, zygotes were transferred to 150  $\mu$ L drops of SOFaaci. For the microdrop system culture, the zygotes were transferred to a dish containing 16 microdrops (20  $\mu$ L) while maintaining the same positions they occupied on the fertilization dish. In all the groups, the embryos were evaluated on day 2 for cleavage and on days 6, 7, and 8 to determine the blastocyst rates. Embryos

were washed with PBS and stored individually in RNAlater in identified microtubes at -80°C.

### **Embryo sex determination**

The sex of the embryos was determined using polymerase chain reaction (PCR) with two distinct pairs of primers (Ludwig<sup>®</sup>, Alvorada, Rio Grande do Sul, Brazil), adapted from the protocol described by De Sousa *et al.*[27]. The first primer pair is region-specific to the Y chromosome, while the second primer pair is specific to an autosomal bovine gene. The primer sequences and fragment sizes for each gene were: bSRY F CCTCCCCTTCAAACGCCCGGAATCATT and bSRY R GGCCATAGTCAGGATCTT, Autosomal F CCCATCACCATCTTCCAGG Autosomal R AGTGAGCTTCCCGTTCAGCA. Initially, the embryos were exposed to a lysis solution containing 1X PCR buffer and 15 µg proteinase K (Invitrogen<sup>®</sup>, Carlsbad, CA, USA) in a final volume of 10 µL for 5 min at 55°C. Proteinase K was subsequently inactivated at 95°C for 5 min. PCR was performed by adding a PCR mix, containing 50 nM of the autosomal bovine primer pair, 90 nM of the Y primer pair, 200 µM dNTP, 1X PCR buffer, and 1U Taq Polymerase Platinum<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>®</sup>) in a final volume of 30 µL, to each sample individually placed in microtubes. The PCR program used consisted of heating at 94°C for 2 min, followed by 40 cycles at 95°C for 30 sec, 57°C for 40 sec, and 72°C for 40 sec, followed by final extension at 72°C for 3 min. The PCR products were visualized using ethidium bromide staining on a 1.5% agarose gel (10 mg/mL) under ultraviolet illumination. The results were read as follows: when two amplicons of 280 and 210 base pairs were detected, the embryo was considered male; when a 280 base pair amplicon was detected, the embryo was considered female.

### **RNA extraction from cumulus cell biopsies and cDNA synthesis**

Total RNA was isolated from the four pools of 10 biopsies of immature CCs and the four pools of 10 biopsies of mature CCs for each treatment, using the RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen<sup>®</sup>, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions with minor modifications. The total RNA was used for cDNA synthesis using the GoScript Reverse Transcriptase Kit (Promega<sup>®</sup>, Madison, Wisconsin, United States) according to the manufacturer's instructions. Reactions were incubated at 65°C for 5 min, 50°C for 50 min, and 85°C for 5 min. RT-qPCR reactions were performed using the GoTaq qPCR Master Mix Kit (Promega<sup>®</sup>). Each sample was analyzed in triplicate and PCR specificities were determined by examining the melting curves and amplicon sizes on an agarose gel. Reactions were performed in a final volume of 25  $\mu$ L using template cDNA equivalent to 0.35 of a cumulus cells biopsy. The PCR conditions were 95°C for 5 min followed by 50 cycles of denaturation at 95°C for 10 sec and then annealing and extension at 60°C for 30 sec.

The gene names, primer sequences, amplicon sizes, efficiency, and annealing temperatures are listed in Table 1. The amplification profiles of three housekeeping genes including peptidylprolyl isomerase A (PPIA) glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), and  $\beta$ -actin (ACTB) were analyzed using the GeNorm program [28]. This analysis indicated that GAPDH was the most stable gene and it was thus used as a reference for data normalization. The relative expression of each gene was calculated using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method with efficiency correction [29].

**Table 1.** Primer sequences, annealing temperatures, amplicon sizes in base pairs (bp), and reference GenBank accession numbers.

Genes	Primer sequence	Annealing temperature	Fragment size (bp)	GenBank accession/Reference
GAPDH	F 5' GCGTGAACACGAGAAGTATAA-3' R 5' CCCTCCACGATGCCAAAGT – 3'	60°C	119	NM_001034034.2
PTGS2	F: GAG GAA CTT ACA GGA GAG AAG R: CGG GAG AGC ATA TAG GAT TAC	60°C	193	NM_174445.2
GHR	F 5' AGAGATTCATGCCGACATCC 3' R 5' CGTTGTCTGGTTCTCACACG 3'	54°C	210	JQ711177.1
ALCAM	F: GGA CAG CCT GAA GGA ATT AG R: CCA ATC TGC TTA GTC ACC TC F 5' TGGTGAATCCCACAACCCAGTGTA 3'	60°C	182	NM_174238.1
GPC4	R 5' TCTCAGCCACCATCAGCATAGCAT 3'	60°C	192	NM_001205784.1
VCAN	F 5' TCATAGCCACCCCAGAGC 3' R 5' TTCCTTCCCATCATGTCTC 3'	60°C	143	(NM_181035)

## 2.4 Experimental Design

**Experiment 1:** Effect of PS during IVM on embryo development and sex of the embryo, using bovine oocytes matured in the presence of FBS or BSA and cultured in SOF supplemented with FBS.

In this experiment we evaluated if the PS during maturation affects embryo production and sex when FBS is used during in group embryo culture. COCs obtained from slaughterhouse ovaries were distributed into two groups according to the PS during maturation: IVM-FBS group (COCs matured in the presence of 10% FBS, n=105); and IVM-BSA group (COCs matured in the presence of 0.4% BSA, n=105). After maturation, both the groups were fertilized and cultured in the presence of FBS

up to day 8 of development. Embryos were evaluated on days 2, 7, and 8. Sex determination was performed in 30 day-8 blastocysts/group using PCR.

**Experiment 2:** Effect of PS during IVM on embryo development and sex, using bovine oocytes matured in the presence of FBS or BSA and cultured in SOF supplemented with BSA.

This experiment was similar to experiment 1, except that the culture media was supplemented with BSA instead of FBS. COCs obtained from slaughterhouse ovaries were cultured in groups and were distributed into two groups: IVM-FBS group (COCs matured in the presence of 10% FBS, n=350); and IVM-BSA group (COCs matured in the presence of 0.4% BSA, n=346). After maturation, both the groups were fertilized and cultured in the presence of BSA up to day 8 of development. Sex determination was performed in 30 day-8 blastocysts/group using PCR.

**Experiment 3:** Effect of PS during maturation on the expression profiles of candidate genes for oocyte competence in CCs.

This experiment aimed to evaluate the expression profiles of candidate genes related to oocyte competence in bovine CCs. Ovaries were collected from local abattoirs and the follicles were dissected. Only COCs from 4-6 mm diameter-sized follicles with a homogenous cytoplasm and at least four layers of CCs were used. COCs were distributed into two groups: IVM-FBS treatment (COCs matured in the presence of 10% FBS) and IVM-BSA treatment (COCs matured in the presence of 0.4% BSA). All steps, maturation, fertilization and embryo culture were carried out in

an individual culture system. The control group were matured and cultured in pools of 20-25 oocytes per replicate to compare if oocytes quality from the ones selected for individual culture were in accordance to the laboratory routine.

After maturation, both the groups were fertilized and cultured in the presence of BSA up to day 8 of development. Biopsies from both the treatments were removed from the CCs before and after maturation, and individually stored for gene expression analysis. The biopsies were then classified into five groups based upon the embryo production and the PS during IVF: 1) Immature CCs (IMMATURE); 2) Mature CCs derived from COCs that formed expanded blastocysts on day 8 and were matured in the presence of FBS (CCMEFBS); 3) Mature CCs derived from COCs that formed expanded blastocysts on day 8 and were matured in the presence of BSA (CCMEBSA); 4) Mature CCs derived from COCs that cleaved after IVF but did not reach the blastocyst stage and were matured in the presence of FBS (CCMNFBFS); and 5) Mature CCs that were derived from COCs that cleaved after IVF but did not reach the blastocyst stage and were matured in the presence of BSA (CCMNBSA).

Four pools of 10 biopsies were formed per treatment group and five genes were selected for RT-qPCR expression profiling: glypican 4 (GPC4), versican (VCAN), growth hormone receptor (GHR), prostaglandin-endoperoxidase sintase 2 (PTGS2), and activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM). Only genes that have previously been reported as candidate genes for oocyte competence were selected. Each sample was analyzed in triplicate using GAPDH as a constitutive gene.

## **2.5 Statistical analysis**

The results of maturation, embryo development, and embryo sex were analyzed using the chi-square test ( $P < 0.05$ ). Genes that were normally distributed were

analyzed using ANOVA and Tukey's test, while those that were not normally distributed were evaluated using the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests. All analyses were performed using Prophet Statistics software, version 5.0 (BBN Systems and Technologies, Cambridge, MA, 1996).

## 2.6 Results

The results showed that when IVC was performed in the presence of FBS, the PS used during IVM affected ( $P < 0.05$ ) the blastocyst rate on days 7 and 8, being lower in those COCs that were matured in the absence of serum (Table 2). However, no differences in embryo development were observed when COCs matured in the presence of BSA or FBS and were cultured with BSA (Table 3).

**Table 2.** Embryo development of bovine oocytes that were allowed to undergo *in vitro* maturation (IVM) in the presence of fetal bovine serum (FBS) or bovine serum albumin (BSA) and were *in vitro* cultured in the presence of FBS up to day 8 of development.

Treatments	N. oocytes	Cleavage D2 (%)		Blastocyst D7 (%)		Blastocyst D8 (%)	
IVM FBS	105	92	(87.6)	64	(61.0) <sup>a</sup>	68	(64.8) <sup>a</sup>
IVM BSA	105	87	(82.9)	49	(46.7) <sup>b</sup>	53	(50.5) <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup>Different letters in the same column indicate significant difference by  $\chi^2$  ( $P < 0.05$ ).

**Table 3.** Embryo development of bovine oocytes that were allowed to undergo *in vitro* maturation (IVM) in the presence of fetal bovine serum (FBS) or bovine serum albumin (BSA) and were *in vitro* cultured in the presence of BSA up to day 8 of development.

Treatments	N. oocytes	Cleavage D2 (%)		Blastocyst D7 (%)		Blastocyst D8 (%)	
IVM FBS	350	300	(85.7)	124	(35.4)	144	(41.1)
IVM BSA	346	286	(82.7)	112	(32.4)	129	(37.3)

<sup>a,b</sup>Different letters in the same column indicate significant difference by  $\chi^2$  ( $P < 0.05$ ).

The PS used during IVM did not affect the sex of the embryos ( $P > 0.05$ ), regardless of whether the culture medium was supplemented with FBS or with BSA (Tables 4 and 5).

**Table 4.** Sex of bovine embryos that originated from oocytes that were allowed to undergo *in vitro* maturation (IVM) in the presence of fetal bovine serum (FBS) or bovine serum albumin (BSA) and were *in vitro* cultured in the presence of FBS up to day 8 of development.

Treatments	N Total	Male (%)	Female (%)
IVM FBS	30	16 (53.33)	14 (46.66)
IVM BSA	30	17 (56.66)	13 (43.33)

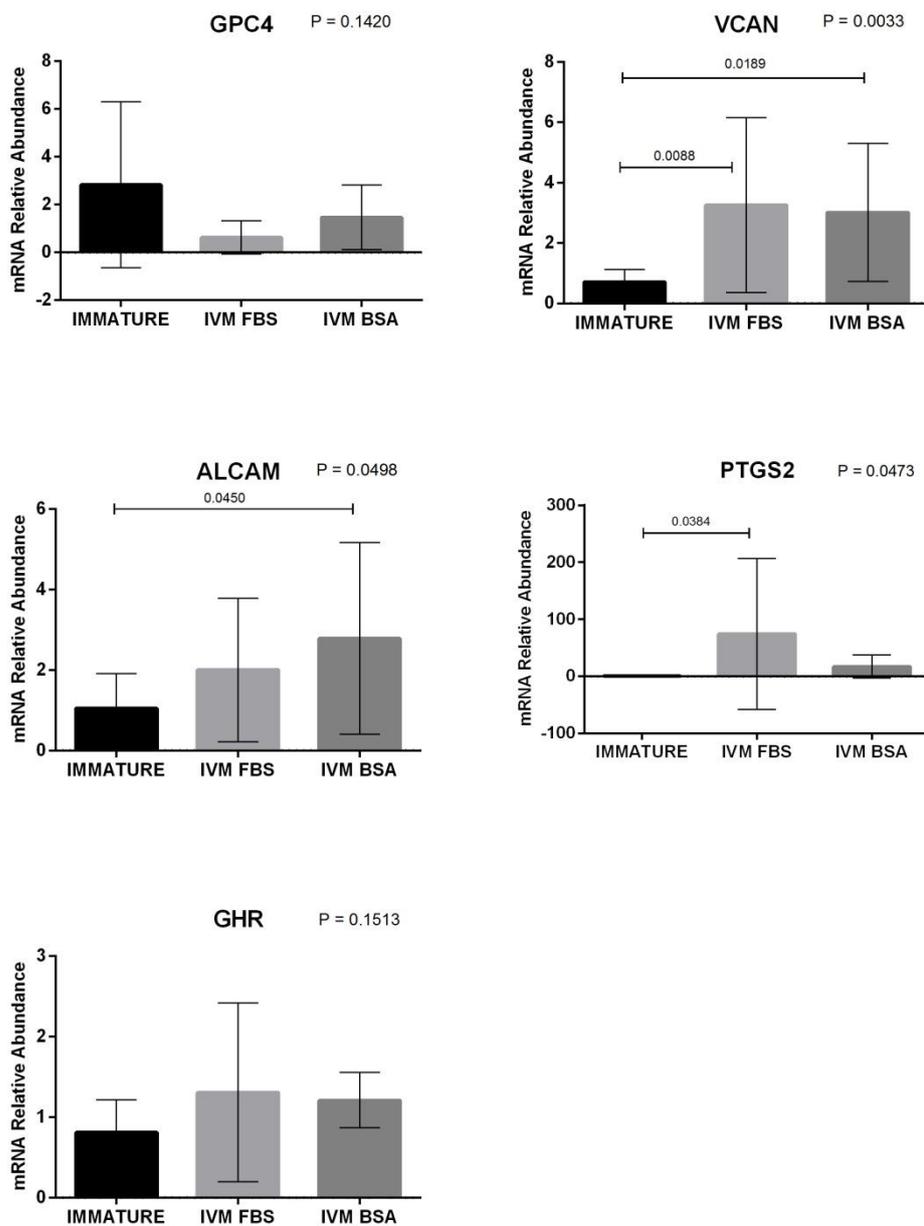
a,b,c Different letters in the same column indicate significant differences ( $P < 0.05$ ). Data analyzed by the chi-square test ( $P > 0.05$ ).

**Table 5.** Sex of bovine embryos that originated from oocytes that were allowed to undergo *in vitro* maturation (IVM) in the presence of fetal bovine serum (FBS) or bovine serum albumin (BSA) and were *in vitro* cultured in the presence of BSA up to day 8 of development.

Treatments	N Total	Male (%)	Female (%)
IVM FBS	30	14 (46.66)	16 (53.33)
IVM BSA	30	17 (56.66)	13 (43.33)

a,b,c Different letters in the same column indicate significant differences ( $P < 0.05$ ). Data analyzed by the chi-square test ( $P > 0.05$ ).

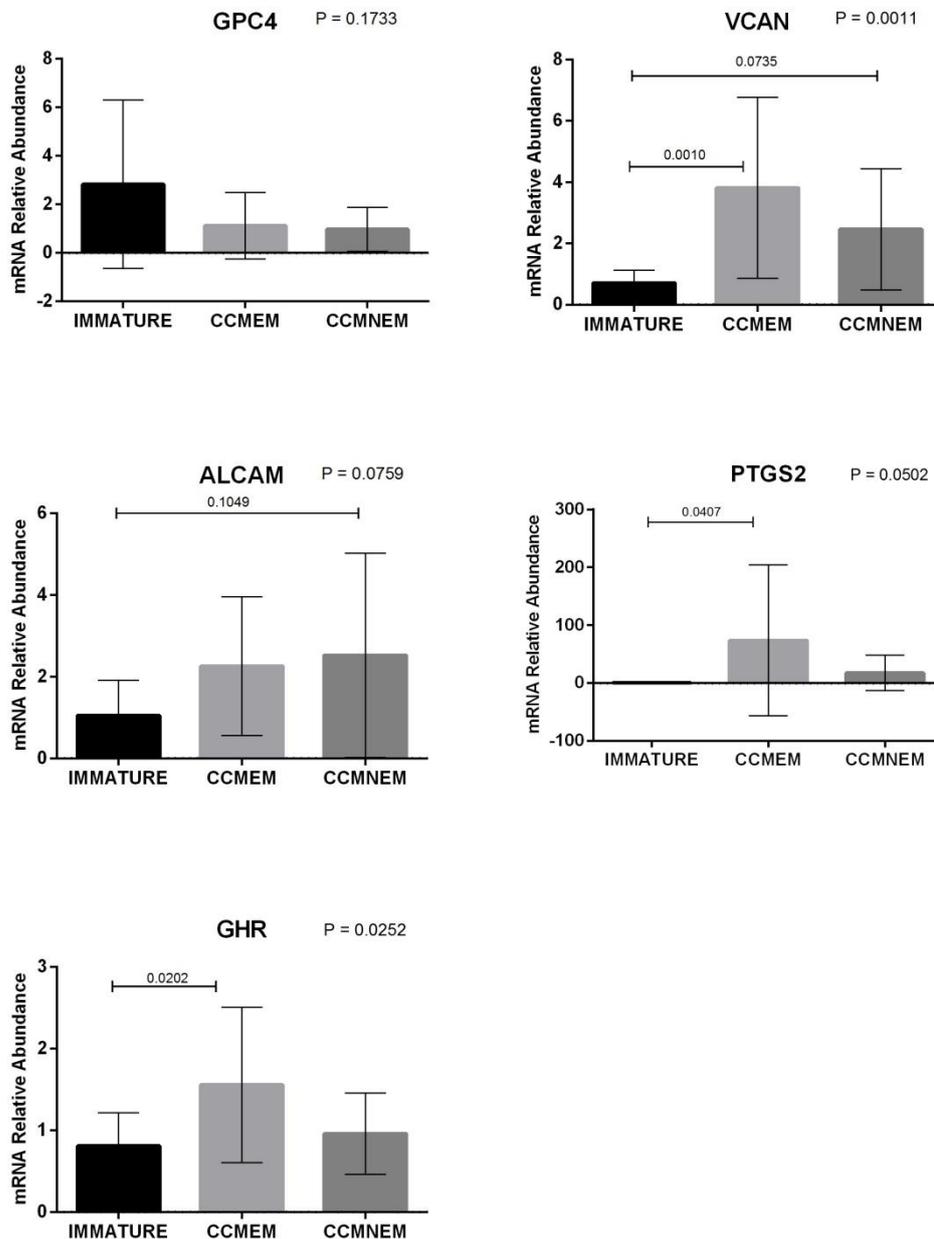
Regarding the gene expression, first we analyzed if the PS during maturation changes the expression of genes in the CCs. Following this, we compared CCs from immature COCs with those that matured in the presence of different PSs. The results showed that the transcript level of VCAN increased during maturation regardless of the PS used. In contrast, in case of ALCAM and PTGS2 genes, the increase in expression during maturation only occurred when COCs matured in the presence of BSA and FBS, respectively (Figure 1).



**Figure 1.** Transcript levels of glypican (GPC4), versican (VCAN), activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM), prostaglandin-endoperoxidase sintase 2 (PTGS2), and growth hormone receptor (GHR) genes were analyzed using RT-qPCR in cumulus cells (CCs) obtained from bovine cumulus-oocyte-complexes (COCs) of three groups: 1) Immature COCs (IMMATURE); 2) COCs matured in the presence of FBS (IVM FBS); 3) COCs matured in the presence of BSA (IVM BSA). Each group had four pools of CCs and each pool was analyzed in triplicate. Data have been expressed as mean $\pm$ SD.

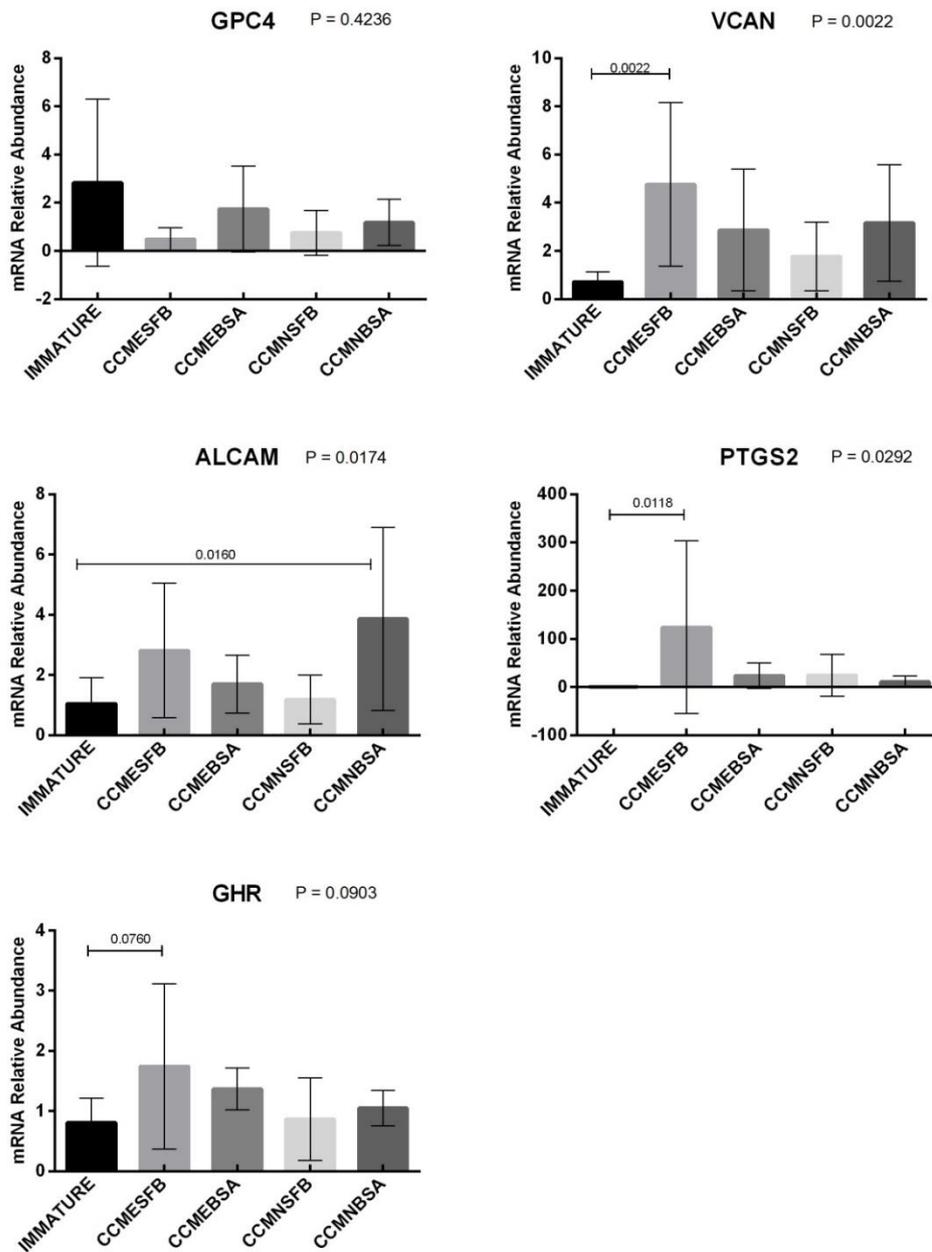
We then analyzed the gene expression based on whether the COCs had developed to embryos or not, regardless of the maturation system used. A greater level of transcripts for VCAN gene were observed after maturation in both the groups, those

that gave rise to embryos and those that did not (Figure 2). However, the level of transcripts for PTGS2 and GHR genes increased during maturation only in CCs of those COCs with competence for embryo development (Figure 2).



**Figure 2.** Transcript levels of glypican (GPC4), versican (VCAN), activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM), prostaglandin-endoperoxidase sintase 2 (PTGS2), and growth hormone receptor (GHR) genes analyzed using RT-qPCR in cumulus cells obtained from bovine cumulus-oocyte-complexes (COCs) of three groups: 1) Immature COCs (IMMATURE); 2) *In vitro* matured COCs that developed to the blastocyst stage (CCMEM); 3) *In vitro* matured COCs that did not develop to the blastocyst stage (CCMNEM). Data have been expressed as mean $\pm$ SD.

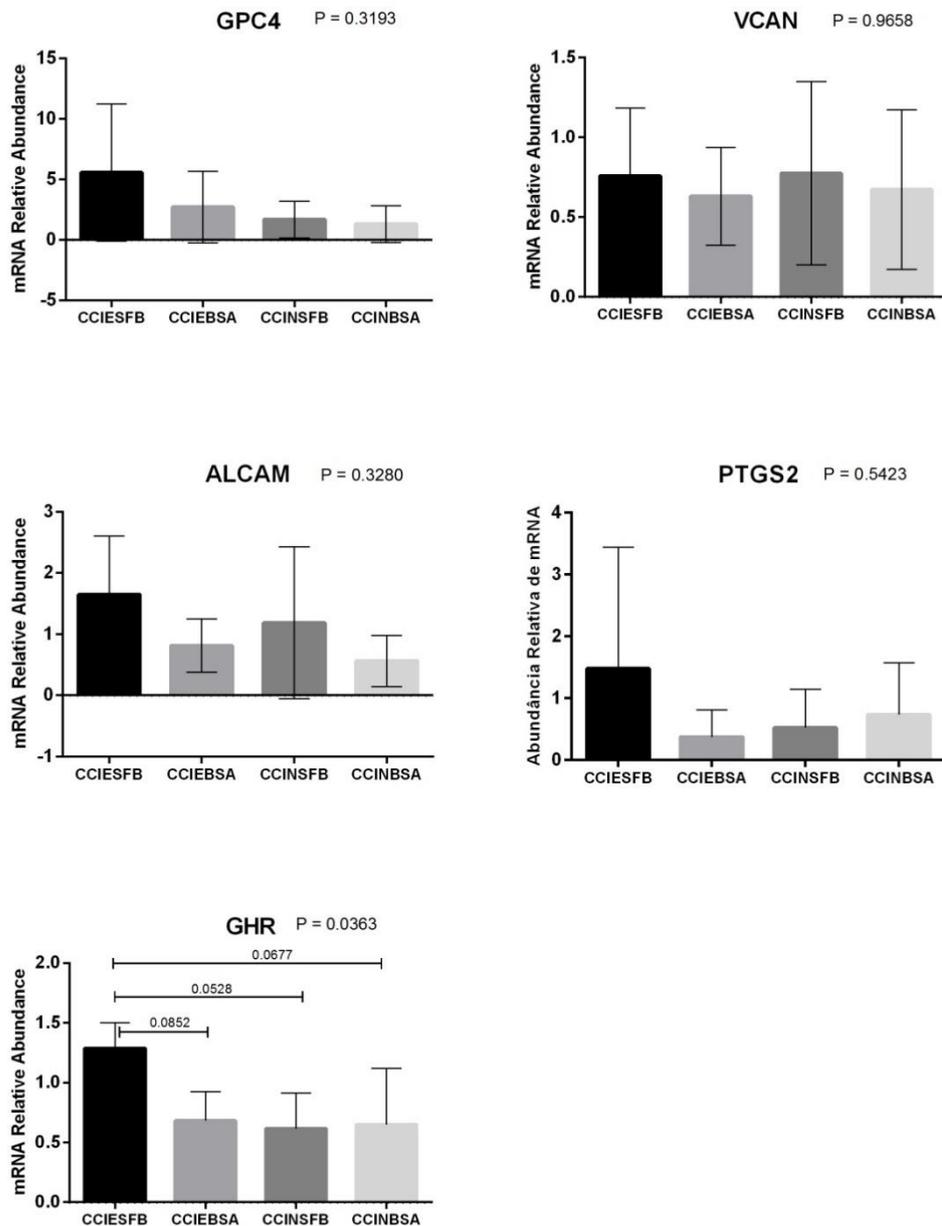
Finally, an analysis was performed taking into account the presence of PS during maturation and the competence for development, the results for which are depicted in Figure 3. For VCAN ( $P=0.002$ ), GHR ( $P=0.07$ ), and PTGS2 ( $P=0.01$ ), we noted that there was an increase in the relative abundance of transcripts during maturation in those CCs that were obtained from COCs that matured in the presence of FBS and reached the blastocyst stage (Figure 3). However, compared to the immature CCs, ALCAM ( $P=0.01$ ) gene had higher expression in mature CCs from oocytes that did not develop to the blastocyst stage and matured in the presence of BSA. These results showed that the PS affects the expression profiles of some of the genes during maturation. However, when we compared the level of transcripts in CCs of matured COCs at 24 h of maturation, there was no differential expression among those that give rise to embryos and those that did not, irrespective of the PS used.



**Figure 3.** Transcript levels of glypican (GPC4), versican (VCAN), activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM), prostaglandin-endoperoxidase sintase 2 (PTGS2), and growth hormone receptor (GHR) were analyzed using RT-qPCR in cumulus cells obtained from bovine cumulus-oocyte-complexes (COCs) of five groups: 1) Immature COCs (IMMATURE); 2) Mature COCs that formed expanded blastocysts on day 8 and were matured in the presence of FBS (CCMEFBS); 3) Mature COCs that formed expanded blastocysts on day 8 and were matured in the presence of BSA (CCMEBSA); 4) Mature COCs that did not reach the blastocyst stage and were matured in the presence of FBS (CCMNSFB); 5) Mature COCs that did not reach the blastocyst stage and were matured in the presence of BSA (CCMNBSA). Each group had four pools of samples and was evaluated in triplicate. The data have been expressed as mean $\pm$ SD.

The next analysis was to evaluate if the expression in the immature CCs was related to the ability of the COCs to develop into an embryo and if the PS used during

IVM would change that relationship. Data from this analysis are presented in Figure 4, where we can note that only GHR gene presented a greater amount of transcripts in the immature CCs from COCs that gave rise to embryos compared to those that did not. However, that was only observed when FBS was used for maturation.



**Figure 4.** Transcript levels of glypican (GPC4), versican (VCAN), activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM), prostaglandin-endoperoxidase sintase 2 (PTGS2), and growth hormone receptor (GHR) were analyzed using RT-qPCR in cumulus cells obtained from bovine cumulus-oocyte-complexes (COCs) of four groups: 1) Immature COCs that formed expanded blastocysts on day 8 and were matured in the presence of FBS (CCIEFBS); 2) Immature COCs that formed expanded blastocysts on day 8 and were matured in the presence of BSA (CCIEBSA); 3) Immature COCs that did not reach

the blastocyst stage and were matured in the presence of FBS (CCINFBS); 4) Immature COCs that did not reach the blastocyst stage and were matured in the presence of BSA (CCINBSA). Each group had four pools of samples and was evaluated in triplicate. The data have been expressed as mean $\pm$ SD.

## 2.7 Discussion

It is well known that the PS used during IVC of bovine embryos affects the blastocyst rates, total cell numbers, percentage of apoptotic cells, metabolism, cryotolerance, and gene expression. However little information is available about the effects that different PSs used during IVM have on embryo development, especially in CCs. A possible effect in CCs can have an impact on studies aiming to identify oocyte biomarkers, because it implies that the effectiveness of a marker can change according to the culture system. Therefore, we hypothesized that changes in PS during IVM would affect the features of not only oocytes but also the CCs. Then, we examined the effect of using BSA or FBS as the PS during IVM on embryo development and the expression profiles of genes that have already been identified in the literature as candidate genes for application as oocyte competence markers in CCs of immature and mature oocytes.

Our results showed that when serum was used to culture the embryos, the PS used during maturation did affect the embryo development. In others word, use of serum during the entire IVP process gives a better blastocyst rate compared to use of BSA during maturation. This result was expected, since it has already been shown that the use of FBS is beneficial for embryonic development, due to its components such as growth factors, amino acids, heavy metal chelators, vitamins, energetic substrates, proteins, peptides, citrate, and steroid hormones [30-33]. Conversely, serum has also been found to have some negative consequences, such as high risk of contamination by pathogens, alteration in the expression of transcripts, increased concentration of

fatty acids and lipid drops in COCs and embryos, in addition to low cryotolerance [34-36]. As a result, BSA has been studied as a substitute for FBS, although there are very few reports on its use only during IVM in domestic animals. Studies using BSA in IVM and FBS in IVC have not reported a detrimental effect on embryo development [37, 38], however, they have also not been compared with the use of only FBS during both IVM and IVC.

When embryo culture was performed in the presence of BSA, the results showed that the blastocyst rates were lower than those reported when FBS was used during embryo culture. However, the PS used during maturation did not affect embryo development. Using BSA during IVM and IVC, Ali *et al.*[39] reported a delay in maturation, less expansion of CCs, and a lower rate of blastocysts. Similarly, Del Collado *et al.*[40] also showed a lower rate of blastocyst when only BSA was used, compared to FBS. Our results suggest that the beneficial effect of serum on embryo development is only observed when IVM is also performed with serum. This information is important for those who are willing to take FBS out of culture, because it shows that instead of removing from IVC, one should take FBS out of the whole process, including IVM.

Because we were studying the effect of PS during IVM on embryo production, and considering that the use of BSA can cause a delay in embryonic development and that male embryos develop faster than females, we decided to evaluate the sex of the embryo. However, the male:female ratio was found to be similar for all PS combinations tested.

Considering that oocyte quality plays a key role in determining embryo development, there is a search for non-invasive markers of oocyte developmental competence, the expression levels of some genes in CCs being the most studied

alternative. However, different studies have reported varied results, and this variation can be due to various factors; among these we chose to focus on the maturation status (mature or immature) and the maturation system. Therefore, in this study, we investigated whether the expression of key genes related to oocyte competence [1, 7, 14-17, 21, 41-43] changes according to the maturation status and the PS in the maturation medium. Then, we used immature and mature CCs biopsies from oocytes and followed their embryo development until the blastocyst stage.

We first verified if the expression levels of these genes increased during maturation, regardless of PS and oocyte competence. We noted that transcripts for VCAN gene were higher in matured CCs than immature CCs. As we proceeded to other analyses we observed that the increase in the transcript levels of VCAN during maturation occurred regardless of the PS used during maturation or oocyte competence. However, this increase was only related to embryo development when the oocytes were matured in FBS. VCAN is a proteoglycan that is centrally involved in tissue maintenance and morphogenesis through its roles in adhesion, proliferation, and cell migration. In addition, it acts to stabilize hyaluronic acid in the pericellular matrix that binds to hyaluronic acid in the expanded cumulus matrix [22, 44]. Therefore, an increase in the expression of VCAN can be expected during maturation. In fact, studies using different approaches have showed the increased expression of this gene in bovine and human immature or mature CCs is related to the ability of the oocytes to develop into embryos and/or to have a successful pregnancy [1, 43, 45-47]. However, the establishment of this gene as a marker for embryo development is not a consensus, since other studies in bovine have not observed differential expression of this gene in mature CCs from COCs that formed embryos [7], which is in accordance with our results.

In contrast to VCAN, the increase in transcripts levels of ALCAM during maturation was dependent on the PS used, since it only increased when BSA was used as the supplement in the IVM media. In addition, this profile of ALCAM during maturation in the presence of BSA was only observed in the CCs whose oocytes did not develop into embryos. Similar to VCAN, ALCAM also mediates cell-to-cell interactions, is expressed in CCs from mature CCOs, and is involved in CC expansion and the early process of human embryo implantation [22, 47]. It also has been reported as a marker for oocyte competence, in human mature CCs, since its expression only increases in samples that culminate in pregnancy compared to those that do not culminate in pregnancy [45]. In contrast, Ekart *et al.*[47] did not find any difference between the pregnant and non-pregnant groups.

Another gene that showed changes in its expression profile based on PS and oocyte competence was PTGS2. Its expression increased during maturation on CCs that developed into embryos only when FBS was present. Physiologically, in the pre-ovulatory follicle, the expression of the PTGS2 gene is induced in CGs and CCs after the luteinizing hormone (LH) peak [48-50], while *in vitro* it can be synthesized by adding FSH or epidermal growth factor EGF to the IVM [50-54]. Many studies have shown the effect of PTGS2 on reproductive processes, where the inhibition of its activity during maturation resulted in failures in ovulation, oocyte maturation, fertilization, embryonic development, implantation, and pregnancy in several species [23, 53, 55-58]. In human CCs, the expression of PTGS2 has been associated with better development and quality of embryos [59, 60] and in pigs [61], its increased expression in CCs has been found to be related to more competent oocytes.

Although the use of GHR gene expression as a marker for oocyte competence is not well explored, studies in our laboratory have previously suggested its association

with oocyte competence [1, 21]. Use of GH in the IVM media accelerates nuclear maturation, induces CC expansion, and improves oocyte developmental competence [62-65]. However, this beneficial effect of GH is only observed in the presence of CCs, because it acts by binding on its receptor, which is present on CCs. Kussano *et al.* [1] observed that the transcript levels for GHR in immature CCs were higher in COCs that gave rise to blastocysts than in CCs from COCs that did not cleave. These results are consistent with the results of the present study, since we found that not only were the transcripts levels higher in mature CCs that reached the blastocyst stage, but also in immature CCs from COCs that resulted in embryos when serum was present. It is possible that GHR generates a signal that is transferred to the oocytes; this signaling may play an important role during the final stage of follicular development by stimulating mechanisms involved in competence acquisition. Taken together, the results of gene expression show that the PS changed the profile of some genes during maturation but did not affect their ability to predict the embryo's outcome, except for GHR gene. None of them were differentially expressed in mature or immature CCs that resulted in embryos compared to those that did not, regardless of the PS used. The only exception was GHR, which can be considered as an oocyte competence marker, but only when serum is used for culture.

In conclusion, PS used in IVM affects embryo development, only if FBS is used in the IVC. However, when the embryo is cultured in BSA, type of PS used during IVM does not affect embryo development. In addition, PS during IVM also influences gene expression in CCs and has to be considered when studies involving molecular markers for oocyte quality are designed.

### **Acknowledgements**

The authors thanks EMBRAPA, CNPq and CAPES for their financial support, and Qualimax and Bom Corte (Luziania and Formosa-GO, Brazil) slaughterhouse for providing the necessary biological materials for this experiment.

### **Conflict of interest**

The authors have no conflict of interest to disclose.

### **2.8 Reference**

- [1] Kussano NR, Leme LO, Guimarães AL, Franco MM, Dode MA. Molecular markers for oocyte competence in bovine cumulus cells. *Theriogenology*. 2016;85:1167-76.
- [2] Sanches BV, Lunardelli PA, Tannura JH, Cardoso BL, Pereira MH, Gaitkoski D, et al. A new direct transfer protocol for cryopreserved IVF embryos. *Theriogenology*. 2016;85:1147-51.
- [3] Viana J, Silva de Figueiredo AC, Siqueira L. Brazilian embryo industry in context: Pitfalls, lessons, and expectations for the future. *Animal Reproduction*. 2017;14:476-81.
- [4] Sirard MA, Dufort I, Coenen K, Tremblay K, Massicotte L, Robert C. The use of genomics and proteomics to understand oocyte and early embryo functions in farm animals. *Reproduction (Cambridge, England) Supplement*. 2003;61:117-29.
- [5] Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Fair T, Boland MP. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*. 2003;38:259-67.
- [6] Krisher RL. The effect of oocyte quality on development. *Journal of animal science*. 2004;82 E-Suppl:E14-23.

- [7] Matoba S, Bender K, Fahey AG, Mamo S, Brennan L, Lonergan P, et al. Predictive value of bovine follicular components as markers of oocyte developmental potential. *Reproduction, fertility, and development*. 2014;26:337-45.
- [8] Benkhalifa M, Aicha M, Louanjli N, Bouamoud N, Saadani B, Ismail K, et al. From global proteome profiling to single targeted molecules of follicular fluid and oocyte: Contribution to embryo development and IVF outcome. *Expert review of proteomics*. 2015;12:1-17.
- [9] Sohel MMH, Hoelker M, Noferesti SS, Salilew-Wondim D, Tholen E, Looft C, et al. Exosomal and non-exosomal transport of extra-cellular microRNAs in follicular fluid: implications for bovine oocyte developmental competence. *PloS one*. 2013;8:e78505.
- [10] Moreno JM, Núñez MJ, Quiñonero A, Martínez S, de la Orden M, Simón C, et al. Follicular fluid and mural granulosa cells microRNA profiles vary in in vitro fertilization patients depending on their age and oocyte maturation stage. *Fertility and sterility*. 2015;104:1037-46. e1.
- [11] Andrade G, Meirelles F, Perecin F, Silveira J. Cellular and extracellular vesicular origins of miRNAs within the bovine ovarian follicle. *Reproduction in Domestic Animals*. 2017.
- [12] Machtinger R, Rodosthenous RS, Adir M, Mansour A, Racowsky C, Baccarelli AA, et al. Extracellular microRNAs in follicular fluid and their potential association with oocyte fertilization and embryo quality: an exploratory study. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2017;34:525-33.
- [13] Hamel M, Dufort I, Robert C, Gravel C, Leveille MC, Leader A, et al. Identification of differentially expressed markers in human follicular cells associated with competent oocytes. *Human reproduction*. 2008;23:1118-27.

- [14] Assidi M, Montag M, Van der Ven K, Sirard MA. Biomarkers of human oocyte developmental competence expressed in cumulus cells before ICSI: a preliminary study. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2011;28:173-88.
- [15] Uyar A, Torrealday S, Seli E. Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality. *Fertility and sterility*. 2013;99:979-97.
- [16] Bunel A, Jorssen EP, Merckx E, Leroy JL, Bols PE, Sirard MA. Individual bovine in vitro embryo production and cumulus cell transcriptomic analysis to distinguish cumulus-oocyte complexes with high or low developmental potential. *Theriogenology*. 2015;83:228-37.
- [17] Melo EO, Cordeiro DM, Pellegrino R, Wei Z, Daye ZJ, Nishimura RC, et al. Identification of molecular markers for oocyte competence in bovine cumulus cells. *Animal genetics*. 2017;48:19-29.
- [18] Kordus RJ, LaVoie HA. Granulosa cell biomarkers to predict pregnancy in ART: pieces to solve the puzzle. *Reproduction*. 2017;153:R69-r83.
- [19] Eckert J, Niemann H. In vitro maturation, fertilization and culture to blastocysts of bovine oocytes in protein-free media. *Theriogenology*. 1995;43:1211-25.
- [20] Russell DF, Baqir S, Bordignon J, Betts DH. The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. *Molecular reproduction and development*. 2006;73:1255-70.
- [21] Caixeta ES, Ripamonte P, Franco MM, Junior JB, Dode MA. Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify marker genes for developmental competence. *Reproduction, fertility, and development*. 2009;21:655-64.

- [22] Feuerstein P, Cadoret V, Dalbies-Tran R, Guerif F, Bidault R, Royere D. Gene expression in human cumulus cells: one approach to oocyte competence. *Hum Reprod.* 2007;22:3069-77.
- [23] Marei WF, Abayasekara DR, Wathes DC, Fouladi-Nashta AA. Role of PTGS2-generated PGE2 during gonadotrophin-induced bovine oocyte maturation and cumulus cell expansion. *Reproductive biomedicine online.* 2014;28:388-400.
- [24] Parrish JJ, Krogenaes A, Susko-Parrish JL. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology.* 1995;44:859-69.
- [25] Machado GM, Carvalho JO, Filho ES, Caixeta ES, Franco MM, Rumpf R, et al. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology.* 2009;71:1289-97.
- [26] Holm P, Shukri NN, Vajta G, Booth P, Bendixen C, Callesen H. Developmental kinetics of the first cell cycles of bovine in vitro produced embryos in relation to their in vitro viability and sex. *Theriogenology.* 1998;50:1285-99.
- [27] de Sousa RV, da Silva Cardoso CR, Butzke G, Dode MAN, Rumpf R, Franco MM. Biopsy of bovine embryos produced in vivo and in vitro does not affect pregnancy rates. *Theriogenology.* 2017;90:25-31.
- [28] Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology.* 2002;3:Research0034.
- [29] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research.* 2001;29:e45.
- [30] Keskinetepe L, Burnley CA, Brackett BG. Production of viable bovine blastocysts in defined in vitro conditions. *Biology of reproduction.* 1995;52:1410-7.

- [31] Takahashi Y, First NL. In vitro development of bovine one-cell embryos: Influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology*. 1992;37:963-78.
- [32] Mingoti GZ, Garcia JM, Rosa-e-Silva AA. The effect of serum on in vitro maturation, in vitro fertilization and steroidogenesis of bovine oocytes co-cultured with granulosa cells. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*. 1995;28:213-7.
- [33] Abe H, Hoshi H. Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum-free media. *The Journal of reproduction and development*. 2003;49:193-202.
- [34] Rizos D, Gutiérrez-Adán A, Pérez-Garnelo S, de la Fuente J, Boland MP, Lonergan P. Bovine Embryo Culture in the Presence or Absence of Serum: Implications for Blastocyst Development, Cryotolerance, and Messenger RNA Expression<sup>1</sup>. *Biology of reproduction*. 2003;68:236-43.
- [35] Rätty M, Ketoja E, Pitkänen T, Ahola V, Kananen K, Peippo J. In vitro maturation supplements affect developmental competence of bovine cumulus–oocyte complexes and embryo quality after vitrification. *Cryobiology*. 2011;63:245-55.
- [36] Barceló-Fimbres M, Seidel GE. Cross-validation of techniques for measuring lipid content of bovine oocytes and blastocysts. *Theriogenology*. 2011;75:434-44.
- [37] Diógenes MN, Guimarães AL, Leme LO, Dode MA. Bovine in vitro embryo production: the effects of fibroblast growth factor 10 (FGF10). *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2017;34:383-90.
- [38] Diógenes MN, Guimarães ALS, Leme LO, Maurício MF, Dode MAN. Effect of prematuration and maturation with fibroblast growth factor 10 (FGF10) on in vitro development of bovine oocytes. *Theriogenology*. 2017;102:190-8.

- [39] Ali A, Sirard M-A. Effect of the Absence or Presence of Various Protein Supplements on Further Development of Bovine Oocytes During In Vitro Maturation<sup>1</sup>. *Biology of reproduction*. 2002;66:901-5.
- [40] Del Collado M, Saraiva NZ, Lopes FL, Gaspar RC, Padilha LC, Costa RR, et al. Influence of bovine serum albumin and fetal bovine serum supplementation during in vitro maturation on lipid and mitochondrial behaviour in oocytes and lipid accumulation in bovine embryos. *Reproduction, fertility, and development*. 2015.
- [41] Hamel M, Dufort I, Robert C, Leveille MC, Leader A, Sirard MA. Identification of follicular marker genes as pregnancy predictors for human IVF: new evidence for the involvement of luteinization process. *Molecular human reproduction*. 2010;16:548-56.
- [42] Lager AE, Kocabas AM, Otu HH, Ruppel P, Langerveld A, Schnarr P, et al. Identification of a novel gene set in human cumulus cells predictive of an oocyte's pregnancy potential. *Fertility and sterility*. 2013;99:745-52 e6.
- [43] Shen Q, Chen M, Zhao X, Liu Y, Ren X, Zhang L. Versican expression level in cumulus cells is associated with human oocyte developmental competence. 2020;66:176-84.
- [44] Russell DL, Ochsner SA, Hsieh M, Mulders S, Richards JS. Hormone-regulated expression and localization of versican in the rodent ovary. *Endocrinology*. 2003;144:1020-31.
- [45] Wathlet S, Adriaenssens T, Segers I, Verheyen G, Van de Velde H, Coucke W, et al. Cumulus cell gene expression predicts better cleavage-stage embryo or blastocyst development and pregnancy for ICSI patients. *Human reproduction*. 2011;26:1035-51.
- [46] Gebhardt KM, Feil DK, Dunning KR, Lane M, Russell DL. Human cumulus cell gene expression as a biomarker of pregnancy outcome after single embryo transfer. *Fertility and sterility*. 2011;96:47-52 e2.

- [47] Ekart J, McNatty K, Hutton J, Pitman J. Ranking and selection of MII oocytes in human ICSI cycles using gene expression levels from associated cumulus cells. *Human reproduction*. 2013;28:2930-42.
- [48] Sirois J, Sayasith K, Brown KA, Stock AE, Bouchard N, Doré M. Cyclooxygenase-2 and its role in ovulation: a 2004 account. *Human reproduction update*. 2004;10:373-85.
- [49] Liu J, Sirois J. Follicle size-dependent induction of prostaglandin G/H synthase-2 during superovulation in cattle. *Biology of reproduction*. 1998;58:1527-32.
- [50] Nuttinck F, Reinaud P, Tricoire H, Vigneron C, Peynot N, Mialot JP, et al. Cyclooxygenase-2 is expressed by cumulus cells during oocyte maturation in cattle. *Molecular reproduction and development*. 2002;61:93-101.
- [51] Gurevich M, Harel-Markowitz E, Marcus S, Shore LS, Shemesh M. Prostaglandin production by the oocyte cumulus complex around the time of fertilization and the effect of prostaglandin E on the development of the early bovine embryo. *Reproduction, fertility, and development*. 1993;5:281-3.
- [52] Nuttinck F, Marquant-Le Guienne B, Clément L, Reinaud P, Charpigny G, Grimard B. Expression of genes involved in prostaglandin E2 and progesterone production in bovine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation and fertilization. *Reproduction*. 2008;135:593-603.
- [53] Nuttinck F, Gall L, Ruffini S, Laffont L, Clement L, Reinaud P, et al. PTGS2-related PGE2 affects oocyte MAPK phosphorylation and meiosis progression in cattle: late effects on early embryonic development. *Biology of reproduction*. 2011;84:1248-57.
- [54] Marei WF, Ghafari F, Fouladi-Nashta AA. Role of hyaluronic acid in maturation and further early embryo development of bovine oocytes. *Theriogenology*. 2012;78:670-7.

- [55] Lim H, Paria BC, Das SK, Dinchuk JE, Langenbach R, Trzaskos JM, et al. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell*. 1997;91:197-208.
- [56] Takahashi T, Morrow JD, Wang H, Dey SK. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E(2) directs oocyte maturation by differentially influencing multiple signaling pathways. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281:37117-29.
- [57] Nuttinck F, Jouneau A, Charpigny G, Hue I, Richard C, Adenot P, et al. Prosurvival effect of cumulus prostaglandin G/H synthase 2/prostaglandin2 signaling on bovine blastocyst: impact on in vivo posthatching development. *Biology of reproduction*. 2017;96:531-41.
- [58] Duffy DM. Novel contraceptive targets to inhibit ovulation: the prostaglandin E2 pathway. *Human reproduction update*. 2015;21:652-70.
- [59] McKenzie LJ, Pangas SA, Carson SA, Kovanci E, Cisneros P, Buster JE, et al. Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. *Human reproduction*. 2004;19:2869-74.
- [60] Ocampo A, Pedraza J, Ortiz G, Hernández-Pérez E, Porchia L, López-Bayghen E. Assessment of Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2 and Versican gene expression profile from the cumulus cells: association with better in vitro fertilization outcomes. 2018;11:84.
- [61] Sugimura S, Ritter LJ, Rose RD, Thompson JG, Smitz J, Mottershead DG, et al. Promotion of EGF receptor signaling improves the quality of low developmental competence oocytes. *Developmental biology*. 2015;403:139-49.
- [62] Izadyar F, Hage WJ, Colenbrander B, Bevers MM. The promotory effect of growth hormone on the developmental competence of in vitro matured bovine oocytes is due

to improved cytoplasmic maturation. *Molecular reproduction and development*. 1998;49:444-53.

[63] Kölle S, Sinowatz F, Boie G, Lincoln D. Developmental changes in the expression of the growth hormone receptor messenger ribonucleic acid and protein in the bovine ovary. *Biology of reproduction*. 1998;59:836-42.

[64] Bevers MM, Izadyar F. Role of growth hormone and growth hormone receptor in oocyte maturation. *Molecular and cellular endocrinology*. 2002;197:173-8.

[65] Kölle S, Stojkovic M, Boie G, Wolf E, Sinowatz F. Growth hormone-related effects on apoptosis, mitosis, and expression of connexin 43 in bovine in vitro maturation cumulus-oocyte complexes. *Biology of reproduction*. 2003;68:1584-9.

## **CAPÍTULO 3**

# **Características bioquímicas do ambiente folicular para predizer a competência de ovócitos bovinos**

## RESUMO

Um dos principais fatores responsáveis pela baixa produção de embriões quando se utiliza ovócitos maturados *in vitro* é o nível de competência dos ovócitos. Portanto, existe uma necessidade de se identificar quais as características bioquímicas do folículo que contêm ovócitos com maior ou menor competência. Este estudo objetivou comparar características bioquímicas do líquido folicular e das células provenientes de folículos contendo ovócitos com diferentes capacidades de formar embrião e, identificar marcadores para selecionar ovócitos mais competentes. Para isso, folículos de 5-6mm foram dissecados de ovários coletados de abatedouros. De cada folículo foram coletados individualmente amostras de líquido folicular (LF), células da granulosa (CG), células do cumulus (CC) imaturas e maturadas. O ovócito obtido de cada folículo foi maturado, fecundado e cultivado individualmente até dia 8 de desenvolvimento (D8). No D8 as amostras coletadas foram agrupadas de acordo com o resultado da produção de embriões em: aquelas em que os ovócitos chegaram ao estágio de blastocisto (EMB) e a aquelas que clivaram, mas não chegaram ao estágio de blastocisto (NEMB). Nas CC imaturas e maturadas e CGs foi quantificada por qPCR a expressão de 8 genes relacionados com competência ovocitária: CASP3, SERPINE2, VCAN, LUM, FSHR, EGFR, PGR e GHR. No LF foi avaliado DNA livre de células (cfDNA), por quantificação das sequências de ART2 e BOVTA por qPCR e, a concentração de progesterona e estradiol por quimiluminescência e eletroquimioluminescência. Dos 8 genes avaliados, o gene GHR foi mais expresso em CC imaturas de CCOs do grupo EMB e CASP3 mais expresso nas CC maturadas do grupo NEMB ( $P < 0,05$ ). Na avaliação do comportamento dos genes durante a maturação *in vitro* (MIV), observou-se que houve um aumento da expressão dos genes CASP3 e GHR nesse período apenas no grupo NEMB. Já o gene VCAN aumentou a expressão em CC do grupo EMB ( $P < 0,05$ ). As análises do LF, mostraram maior quantidade ( $P < 0,05$ ) de cfDNA do gene ART2 no LF do grupo NEMB comparado ao do EMB. Já para o gene BOVTA nenhuma diferença ( $P > 0,05$ ) foi encontrada entre os grupos. A concentração de progesterona no LF foi similar entre os grupos EMB (164,5ng/mL) e NEMB (152,8ng/mL), enquanto a de estradiol foi maior ( $P < 0,05$ ) no grupo EMB (33,14ng/mL) comparado ao grupo NEMB (3,73ng/mL). Quando a relação E2/P4 foi avaliada constatou-se que essa foi maior no grupo EMB ( $P < 0,05$ ). Conclui-se que, maior nível de transcritos de GHR em CC imaturas, a menor expressão de CASP3 em

CC maduras, menor nível do gene ART2, a concentração de estradiol e a relação de E2/P4 no LF podem indicar ovócitos com maior potencial de desenvolvimento.

**Palavras-chave:** Marcador molecular, células foliculares, embrião, cfDNA, esteroides

## ABSTRACT

One of the main factors responsible for the low production of embryos when using in vitro matured oocytes is their level of competence. Therefore, there is a need to identify the biochemical characteristics of follicles that contain oocytes with greater or lesser competence. This study aimed to compare biochemical characteristics of fluid and cells from follicles containing oocytes with different capacities to form an embryo. It also aimed to identify markers to select more competent oocytes. For this, 5-6mm follicles were dissected from ovaries collected from slaughterhouses. Samples of follicular fluid (FF), granulosa cells (GC), immature and matured cumulus cells (CC) were individually collected from each follicle. The oocyte obtained from each follicle was matured, fertilized and cultured individually until day 8 of development (D8). On D8, the collected samples were grouped according to the result of embryo production into: those in which reached the blastocyst stage (EMB) and those that the oocytes cleaved but did not reach the blastocyst stage (NEMB). In immature and mature CCs and GCs, the expression of 8 genes related to oocyte competence was quantified by qPCR: CASP3, SERPINE2, VCAN, LUM, FSHR, EGFR, PGR and GHR. In LF, cell-free DNA (cfDNA) was evaluated by quantification of ART2 and BOVTA sequences by qPCR, and the concentration of progesterone and estradiol by chemiluminescence and electrochemiluminescence. Of the 8 genes evaluated, the GHR gene was more expressed in immature CCs from the EMB group and CASP3 was more expressed in the mature CCs from the NEMB group ( $P < 0.05$ ). In evaluating the behavior of the genes during in vitro maturation (IVM), it was observed that there was an increase in the expression of the CASP3 and GHR genes during this period only in the NEMB group. The VCAN gene increased expression in CC from the EMB group ( $P < 0.05$ ). The LF analyzes showed a greater amount ( $P < 0.05$ ) of cfDNA from the ART2 gene in the LF of the NEMB group compared to the EMB. As for the BOVTA gene, no difference ( $P > 0.05$ ) was found between the groups. The concentration of progesterone in LF was similar between the EMB (164.5ng/mL) and NEMB (152.8ng/mL) groups, while the estradiol concentration was higher ( $P < 0.05$ ) in the EMB group (33.14ng/mL) compared to the NEMB group (3.73ng/mL). When the E2/P4 ratio was evaluated, it was found that it was higher in the EMB group ( $P < 0.05$ ). It is concluded that a higher level of GHR transcripts in immature CCs, lower CASP3 expression in mature CCs, lower levels of

the ART2 gene, Estradiol concentration and E2/P4 ratio in LF may indicate oocytes with greater potential for development.

**Keywords:** Molecular marker, follicular cells, embryo, cfDNA, steroids

## 1. INTRODUÇÃO

A competência dos ovócitos é o principal fator que determina o sucesso da produção *in vitro* de embriões (PIVE) (DODE et al., 2006; LONERGAN e FAIR, 2016; KUSSANO et al., 2016). Essa competência é adquirida gradualmente durante a ovogênese, através de uma gama de atributos celulares e moleculares que fornecem ao ovócito a capacidade de completar a meiose, ser fecundado, e ter desenvolvimento embrionário adequado.

Os ovócitos imaturos utilizados na PIVE são removidos prematuramente de uma população heterogênea de folículos, e possuem diferentes graus de competência. Sendo assim, apenas uma porção dos ovócitos recuperados podem ter um desenvolvimento embrionário e uma gestação normal (SIRARD et al., 2003; LONERGAN et al. 2003). Uma alternativa para otimizar o uso desses ovócitos e aumentar a eficiência da PIVE seria selecionar e utilizar apenas os ovócitos mais competentes. Entretanto, a avaliação morfológica, que é o critério mais utilizado para selecionar os ovócitos imaturos para a PIVE, é incapaz de diferenciar aqueles mais competentes dos menos competentes (LONERGAN et al., 2003, KRISHER 2004, COTOCCHIO et al., 2004). Portanto, é fundamental que se busque outros parâmetros que indiquem com mais precisão os ovócitos com maior potencial de formar um embrião.

Um ambiente folicular saudável é fundamental para que o ovócito adquira a sua competência e, conseqüentemente, tenha sucesso na fecundação e no desenvolvimento embrionário (BUCCIONE et al. 1990, EPPIG, 2001). Esse ambiente saudável depende da contribuição balanceada de vários componentes, tais como hormônios, fatores de crescimento, eletrólitos, metabolitos e proteínas. Desta forma, os componentes do ambiente folicular tais como o líquido folicular (LF) e as células foliculares podem refletir a qualidade do ovócito e, são potenciais fontes de marcadores para esse parâmetro.

O LF é um fluido biológico complexo, com diferentes fatores tais como eletrólitos, RNAs, proteínas, aminoácidos, peptídeos, açúcares, hormônios, fatores de crescimento, metabolitos e vesículas extracelulares (VEs), sendo uma rota de comunicação autócrina e parácrina entre células da teca, CG, CC e ovócito (GOSDEN et al., 1988; REVELLI et al., 2009). Os compostos presentes neste fluido estão

relacionados com o estágio de crescimento folicular e o potencial de desenvolvimento do ovócito (REVELLI et al., 2009; SOHEL et al., 2013). Alguns componentes tais como Glicina, L-glutamato, L-alanina e as concentrações de estradiol e progesterona já foram identificados como sendo indicadores da qualidade dos ovócitos (MATOBA et al., 2014, TEISSIER, et al., 2000, BURATINI et. Al., 2005). E, mais recentemente, vários estudos têm mostrado que a presença e quantidade de *cell-free* DNA (cfDNA) e de microRNAs (miRNAs) específicos têm sido caracterizados e identificados no LF (MORENO et al., 2015; ANDRADE et al., 2017; MACHTINGER et al., 2017; ICHIKAWA et al., 2019; LATIF et al., 2020; PAN et al.,2021). Esses resultados trazem uma nova alternativa para a busca de marcadores ovocitários que possam ser utilizados de forma não invasiva.

Além do líquido folicular, as CC e células foliculares também fazem parte do ambiente folicular e se comunicam direta ou indiretamente com os ovócitos. Essas, portanto, também podem refletir o status de saúde ou de desenvolvimento em que os ovócitos se encontram. Vários estudos têm focado na identificação de marcadores em CC (CAIXETA et al., 2009; ROMAR et al., 2011; KUSSANO et al., 2016; MELO et al., 2017). De fato, vários genes já foram identificados como diferencialmente expressos em CC de ovócitos com diferentes níveis de competência, sendo considerados candidatos a marcadores moleculares para a competência ovocitária (CC) (CAIXETA et al. 2009; MATOBA et al. 2014; BUNEL et al., 2015; KUSSANO et al., 2016; MELO et al., 2017; RICHANI et al., 2021). Já os estudos que utilizam as CG para identificação de marcadores para competência ovocitária são escassos, entretanto essas células também são uma fonte potencial de marcadores (MAZZONI et al.,2017; LIU et al., 2022).

Apesar de vários estudos indicarem parâmetros relacionados com a qualidade dos ovócitos e, possíveis marcadores, ainda não existe nenhum índice, variável ou combinação de variáveis que possam ser utilizados para selecionar de forma mais segura os ovócitos mais competentes. Portanto, o presente estudo objetivou avaliar e comparar um conjunto de características bioquímicas do ambiente folicular de folículos contendo ovócitos que são ou não capazes de formar embriões. O conhecimento das diferenças entre folículos que contêm ovócitos com maior ou menor potencial de desenvolvimento poderá contribuir para identificar marcadores para a competência e, melhorar as condições de cultivo *in vitro*.

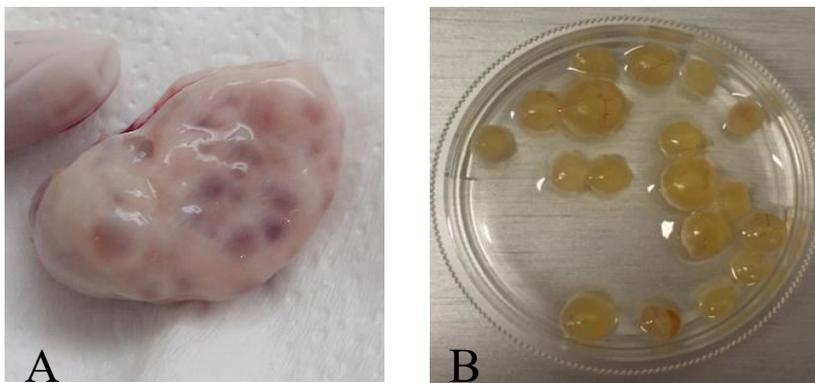
## 2 MATERIAL E MÉTODOS

A menos que seja indicado, os reagentes usados foram comprados da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Para os experimentos 1, 2 e 3, foram realizadas 15 manipulações, 10 ovários por manipulação, com um total de 216 folículos dissecados. Foram dissecados um total de 216 folículos, dos quais todo o material foi coletado e armazenado individualmente.

### 2.1 Coleta e processamento das amostras

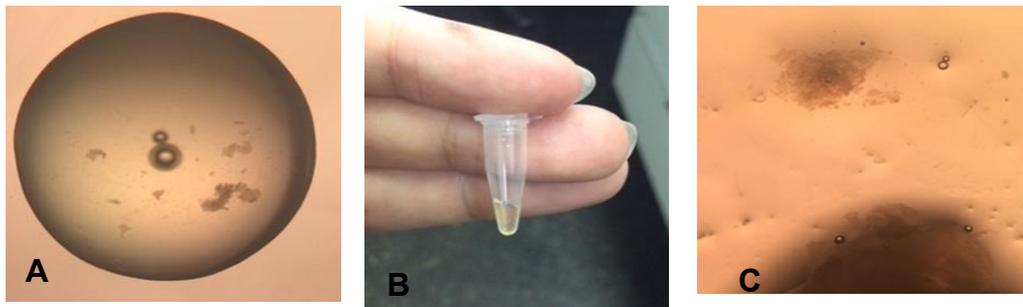
Ovários foram coletados em abatedouros locais, imediatamente após o abate e transportados em solução salina 0,9% (NaCl), suplementada com estreptomicina (50µg/ml) e penicilina (100µg/ml) à temperatura de 35-36° C. No laboratório os folículos foram dissecados do córtex ovariano, com o auxílio de tesoura, lâmina de bisturi e pinças (CAIXETA et al., 2009). Após a dissecação os folículos foram medidos e somente aqueles com diâmetros de 5 a 6mm foram utilizados (Figura 1).



**Figura 1:** A: Ovário antes da dissecação. B: Folículos dissecados.

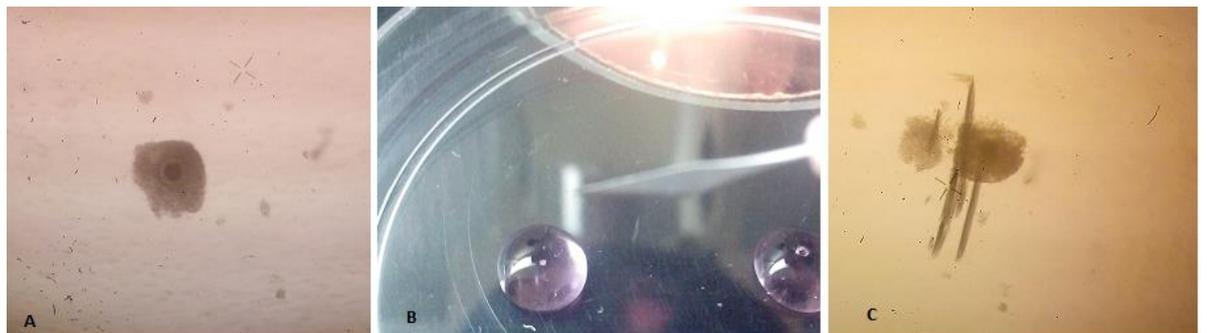
Os folículos dissecados e selecionados foram transferidos individualmente para uma placa de Petri, onde foram rompidos com auxílio de agulha (26G). Após a ruptura do folículo na placa, o LF juntamente com as CG foram coletados com um pipetador e transferidos para um microtubo de 0,2ml. As amostras foram centrifugadas a 300g x 10 min a 4°C para separar o LF e a fração de células. O sobrenadante (LF) foi removido e transferido para outro microtubo, sendo retirada uma amostra de 5µl de LF que foi armazenada individualmente -80°C para análise hormonal e, o restante foi novamente centrifugado a 2000g por 10min. Após essa centrifugação o sobrenadante

foi transferido para outro microtubo e centrifugado mais uma vez a 16500g por 30min a 4°C. E, o sobrenadante foi então individualmente armazenado a -80°C. O *pellet* resultante da primeira centrifugação, contendo as CG foi lavado 2x em solução salina em tampão fosfato (PBS), centrifugado a 3000g x 2 min e armazenado em RNAlater a -80°C (Figura 2).



**Figura 2:** A/B: Líquido folicular coletado após ruptura individual do foliculo. C:Complexo-cumulus-ovócito recuperado após ruptura do foliculo.

Após a ruptura dos foliculos os CCO foram avaliados morfológicamente e, aqueles que apresentavam CC compactas, com pelo menos quatro camadas de células e citoplasma homogêneo, foram transferidos individualmente para uma gota de 50µL de LF previamente centrifugado. Os CCO foram então biopsiados com o auxílio de uma lâmina oftálmica para a retirada de um pequeno fragmento (Figura 3) de CC imatura (KUSSANO et al., 2016).



**Figura 3:** A/B: Complexo-cumulus-ovócito recuperado após ruptura do foliculo (A) e transferido para gota de líquido folicular para ser feita a biopsia de CC (B). C:Complexo-cumulus-ovócito após realização da biopsia das CC.

O fragmento foi depositado em microcubo de 0,2mL devidamente identificado e, foi armazenado individualmente a -80°C em RNAlater. Os CCO após a biópsia foram transferidos individualmente para microgotas de 25µL de meio de maturação cobertas com óleo mineral. Após o período de maturação, uma nova biópsia foi realizada em cada CCO para a retirada de um pequeno fragmento de CC maturadas. Da mesma forma que foi realizada nas CC imaturas, elas foram identificadas e

armazenadas individualmente em RNAlater à -80°C. Todas as amostras de biópsia e LF foram mantidas em gelo durante toda a manipulação.

## 2.2 Maturação, Fecundação e Cultivo *in vitro*

Os CCO foram maturados individualmente em microgotas de 25µL de meio cobertas com óleo mineral por 24h a 38,5 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar. O meio de maturação era constituído de TCM-199 (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA) com sais de Earl's suplementado com 0,075 mg/ml de amicacina, 1µg/ML de L-glutamina, 1µM de piruvato, 1µM de cisteamina e 0,01 UI/ml de hormônio folículo estimulante (FSH), 0,4% de Albumina Sérica Bovina livre de ácidos graxos (BSA-FAF).

Após a maturação os CCO maturados foram transferidos individualmente para microgotas de 25µL de meio de fecundação (FIV) constituído de *Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate* [TALP (Parrish et al. 1995)] suplementado com 0,5 mM de penicilamina, 0,25mM de hipotaurina, 25 mM de epinefrina e 10 µg/ml de heparina. Para todos os grupos e réplicas foi utilizado sêmen congelado de um mesmo animal e da mesma partida, previamente testado para a PIVE. O sêmen foi descongelado a 36 °C por 30 segundos, e os espermatozoides foram selecionados pelo método de gradiente de Percoll 90 e 45% (GE® Healthcare, Piscataway, NJ, USA) (MACHADO et al., 2009), e adicionados nas gotas de FIV em uma concentração final de 1 x 10<sup>6</sup> espermatozoides móveis/ml. Os ovócitos foram co-incubados com os espermatozoides a 38,5 °C em 5% de CO<sub>2</sub> em ar por um período de 18-20 horas.

Após o período de co-incubação, os possíveis zigotos foram transferidos para o meio de cultivo (CIV), constituído de Fluido Sintético de Oviduto (SOF) suplementado com aminoácidos essenciais e não essenciais (Holm et al., 1998), 0,34 mM de sódio tri-citrato, 2,77 mM de myo-inositol, 0,4% de BSA e combinação de 5mg/ml de insulina, 5,5 mg/ml de transferrina e 5ng/ml de selênio (ITS), individualmente, em microgotas de 25 µl, cobertas por óleo mineral. O cultivo realizado por 8 dias em estufa a 38,5 °C e com 5% de CO<sub>2</sub> em ar. Os embriões foram avaliados em D2 para a clivagem e em D6, D7 e D8 pós-inseminação (p.i.) para a produção de blastocistos.

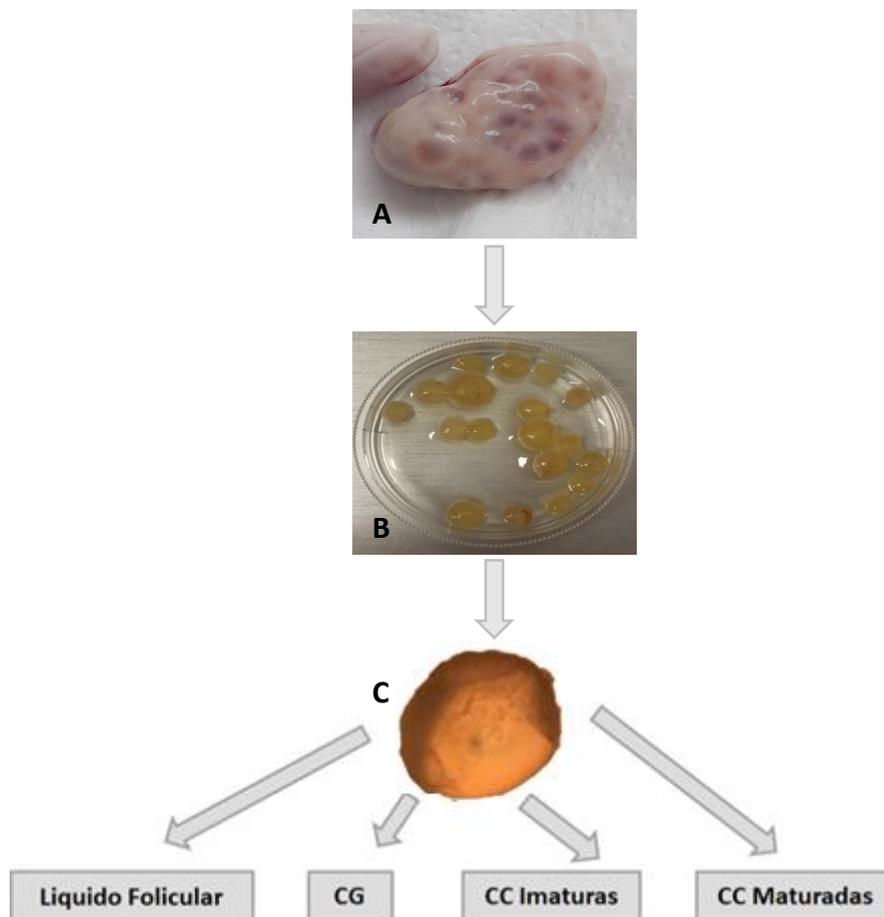
Para todas essas etapas as placas foram preparadas com 16 microgotas individuais dispostas em 4X4 (Figura 4), com volume de 25ul, cobertas com óleo, de

forma que as estruturas mantivessem as posições no momento em que foram transferidas da MIV para FIV, e da FIV para a CIV.



**Figura 4.** Cultivo individual de Complexos-cumulus-ovócitos em microgota de 20 $\mu$ L.

As amostras coletadas e armazenadas individualmente de cada folículo manipulado estão esquematicamente apresentadas na Figura 5:



**Figura 5:** A- Ovário com folículos ; B- Folículos dissecados e C – Folículo dissecado e amostras individualmente coletadas e armazenadas de cada folículo manipulado: líquido folicular, células da granulosa (CG), células do cumulus (CC) imaturas e maturadas.

### 2.3 Extração de RNA de células do *cumulus* e células da granulosa, síntese de cDNA e qPCR

Para a quantificação de transcritos dos genes selecionados o RNA total foi obtido de quatro “*pools*” de cada um dos 3 tipos celulares coletados CC imaturas, CC maturadas e CG. Cada “*pool*” foi formado de 10 amostras de cada um dos tipos celulares provenientes de 10 folículos.

O nível de transcritos de seis genes relacionados a competência ovocitária: CASP3 (Caspase 3), SERPINE2 (Serpina pertencente à família E, membro 2), VCAN (Versican), LUM (Lumican), FSHR (Receptor de hormônio folículo estimulante), EGFR (Receptor de fator de crescimento epidermal), PGR (Receptor de progesterona) e GHR (Receptor do hormônio de crescimento) foi quantificado por qPCR. A qPCR foi realizado em um 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystem, Foster City, Califórnia, USA). O RNA total foi isolado usando o Kit Rneasy Plus Micro (Qiagen®, Hilden, Germany), de acordo com instruções do fabricante. A síntese de cDNA foi realizada usando o kit GoScript (200 U/ $\mu$ L, Promega®, Wisconsin, USA) com primers (do inglês, oligonucleotídeo iniciador) Oligo-dT (0,5  $\mu$ g/ $\mu$ L) e Random (0,5  $\mu$ g/ $\mu$ L), adicionando as enzimas (transcriptase reversa e inibidor de ribonuclease recombinante) e tampão em um volume final de 30 $\mu$ L. As reações foram realizadas a 70 °C por 5 minutos, numa segunda etapa o anelamento ocorre à 25 °C por 5 minutos, e a extensão à 42°C por 60 minutos, seguido pela inativação da enzima a 70 °C por 15 minutos.

As reações da qPCR foram realizadas usando GoTaq Master Mix (Promega®). As reações foram otimizadas para promover eficiência de amplificação máxima para cada gene (Eficiência dos primers 80–110%). As eficiências foram calculadas utilizando diluição seriada. Cada amostra foi analisada em triplicata e a especificidade de cada produto de PCR foi determinada pela análise da curva de melting e tamanho do amplicon em gel de agarose. As reações foram realizadas em um volume final de 25  $\mu$ L usando cDNA correspondente a 0,35 biópsias. As condições dos ciclos do PCR foram 95 °C por 5 minutos, seguido de 50 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos e então anelamento e extensão a 60 °C por 30 segundos.

Em um experimento prévio, os perfis de amplificação para os três genes constitutivos, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH),  $\beta$ -Actin (ACTB) e Peptidylprolyl isomerase A (PPIA) foram submetidos ao programa de análise

GeNorm (VANDESOMPELE, 2002), que indicou o GAPDH como o gene mais estável. Este gene foi usado como referência para normalização dos dados. A expressão relativa de cada gene foi calculada usando o método de  $\Delta\Delta C_t$  com correção da eficiência pelo método Pfaffl (Pfaffl 2001). O nome, a sequência, a concentração do primer e o tamanho do amplicon de cada gene estão listados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Sequência dos oligonucleotídeos, concentração dos primers, tamanho dos fragmentos em pares de base (pb) e referência de acesso ao *GenBank*.

Genes	Sequência	Concentração do Primer (nM)	Fragmento amplificado (bp)	Número de acesso GenBank/ Referência
<b>GAPDH</b>	F 5' GCGTGAACCACGAGAAGTATAA-3' R 5' CCCTCCACGATGCCAAAGT – 3'	300	119	NM_00103 4034.2
<b>EGFR</b>	F 5' AAAGTTTGCCAAGGGACAAG 3' R 5' AAAGCACATTCCTCGGATG 3'	300	253	XM_00269 6890.3
<b>GHR</b>	F 5' AGAGATTCATGCCGACATCC 3' R 5' CGTTGTCTGGTTCTCACACG 3'	200	210	JQ711177. 1
<b>FSHR</b>	F 5' GGATGCCATCATCGACTCTG 3' R 5' TGA CTGAAGCTTGGTGAGAAC 3'	300	133	(NM_17406 1)
<b>PGR</b>	F: TCAGGCTGGCATGGTTCTTGG R: CTTAGGGCTTGGCTTTCGTTTGG	300	126	NM_00120 5356.1
<b>LUM</b>	F: GTC TCC CAG TGT CTC TTC TAA R: GAG ATC CAG CTC CAA AG	300	179	NM_17393 4.1
<b>SERPINE2</b>	F: GAC TCC TTT CCT ACA TCT TTC C R: CAG TAC AGT GTT CCA CCA TC	300	158	NM_17466 9.2
<b>CASP3</b>	F: GCC CAG GAC TTT AGC AGT CA R: AAA TGT GAG CGC CTT TGT T	300	185	NM_00107 7840.1
<b>VCAN</b>	F 5' TCATAGCCACCCAGAGC 3' R 5' TTCCTCCCATCATGTCTC 3'	300	143	NM_18103 5

**F=forward; R= reverso**

#### 2.4 Extração e quantificação de *cell-free* DNA de líquido folicular

Devido ao volume das amostras de LF ser muito pequeno, inviabilizando o uso de kits comerciais para extração do cfDNA, foi necessário estabelecer um protocolo que permitisse o uso de volumes reduzidos. Esse protocolo foi baseado nos

procedimentos rotineiros de extração de DNA e, no fato de não precisar lisar a células para obtenção do DNA. Amostras de 15 µL de LF foram testadas com o protocolo de extração de cfDNA estipulado e adaptado no Laboratório de Genética Molecular Animal (LGMA) da EMBRAPA – CENARGEN, sendo possível obter a quantificação das sequencias selecionadas nas amostras extraídas de LF. O método de extração do cfDNA das amostras de LF e quantificação dos genes de interesse, são descritos a seguir.

Antes da extração foi adicionado em cada amostra de LF, 10pg de plasmídeo com GFP (*green fluorescent protein*), como um controle exógeno. Para a extração de cfDNA foram utilizadas 30 amostras individuais de 15 µL de LF de cada grupo. As amostras foram lisadas a 95°C por 1 min em seguida mergulhadas a -196°C. Esses passos foram repetidos por 5 vezes. Em seguida, foi adicionado 5 µL de NaCl a 6M em cada amostra, essas foram homogeneizadas por sucessivas pipetagens, mantidas em gelo por 5 min, e logo centrifugados a 13.000 rpm, por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi então transferido para outro microtubo onde foi adicionado o mesmo volume transferido de isopropanol gelado, homogeneizados por pipetagem e mantidos a -20°C por uma hora. As amostras então foram centrifugadas a 13.000 rpm, por 15 min a 4°C, o sobrenadante descartado e o “*pellet*” lavado com o mesmo volume de etanol 70%. Centrifugados novamente a 13.000 rpm, por 10 min a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o “*pellet*” deixado secar ao ar por 10 a 15 min. Com o “*pellet*” seco o DNA foi ressuspendido em 10 µL de água e, em seguida usado na reação de qPCR.

A quantidade de DNA de ART2, BOVTA e GFP foram avaliados por qPCR realizada em um 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystem, Foster City, Califórnia, USA). A análise da qPCR foi realizada usando GoTaq Master Mix (Promega®). Cada amostra foi analisada individualmente, e a especificidade de cada produto de PCR foi determinada pela análise da curva de melting e tamanho do amplicon em gel de agarose. As reações foram realizadas em um volume final de 25 µL usando cfDNA correspondente a 1/3 de cada amostra (3,3µL). As condições dos ciclos do PCR foram 95 °C por 10 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos e então anelamento e extensão a 60 °C por 1 minuto.

O nome, a sequência e concentração dos primers, tamanho do amplicon de cada gene estão listadas na Tabela 2.

**Tabela 2.** Sequência dos oligonucleotídeos, concentração do primer e tamanho dos fragmentos em pares de base (pb)

Genes	Sequência	Concentração do Primer (nM)	Fragmento amplificado (bp)
<b>ART2</b>	F: CTCCCAGCATCAGAGTCTTT R: CTGTGGTGTGGAGAAGACT	300	181
<b>BOVTA</b>	F 5' CTTCCYTDGTRGCTCAG 3' R 5' CMAGRCTCCTCTGTCCATG 3'	150	148
<b>GFP</b>	F: GGA CAG CCT GAA GGA ATT AG R: CCA ATC TGC TTA GTC ACC TC	300	100

## 2.5 Dosagem de Progesterona e Estradiol

O LF também foi utilizado para a análises hormonais. As concentrações de progesterona e estradiol foram determinadas por quimiluminescência e eletroquimioluminescência respectivamente, analisadas no laboratório comercial TECSA® Tecnologia em Sanidade Animal, Belo Horizonte -MG, Brasil. Foram analisados, 4 *pools* composto de 13 amostras individuais de cada grupo, totalizando um volume de 100 µL cada *pool* (50µL para análise de progesterona e 50µL para estradiol).

Os coeficientes de variação intra e inter-ensaio foram 12,9 e 13,02% respectivamente para progesterona e 17,48 e 19,74% respectivamente para a estradiol. A sensibilidade dos ensaios de Estradiol foram 0,009 a 3ng/mL e para progesterona de 0,20 a 40ng/mL, ambos na diluição de 1:10.

## 3- DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Com o objetivo de encontrar marcadores para a qualidade ovocitária este estudo visou relacionar parâmetros bioquímicos do folículo e dos CCO com a capacidade dos ovócitos de formar embrião. Dois grupos foram formados de acordo com o resultado da produção de embrião, o grupo em que os ovócitos deram origem a blastocisto (EMB) e o grupo que não formaram blastocistos (NEMB) após a FIV e CIV. Foram realizados 3 experimentos sendo que em todos foram utilizados os mesmos grupos.

**Experimento 1:** Avaliação da quantidade de transcritos de genes candidatos em CC e CG oriundas de folículos contendo ovócitos com alta e baixa capacidade de produzir embriões *in vitro*

Esse experimento visou avaliar se a quantidade de transcritos de genes candidatos em CG e CC está relacionada com a capacidade de desenvolvimento dos ovócitos. Os genes avaliados foram CASP3 (Caspase 3), SERPINE2 (Serpina pertencente à família E, membro 2), VCAN (Versican), LUM (Lumican), FSHR (Receptor de hormônio folículo estimulante), EGFR (Receptor de fator de crescimento epidermal), PGR (Receptor de progesterona) e GHR (Receptor do hormônio de crescimento), os quais foram selecionados com base em estudos anteriores que mostram serem possíveis marcadores para a competência ovocitária. As CG e CC e os CCO foram obtidas de folículos dissecados de 5 a 6 mm. Após a coleta das CG e das CC, essas foram armazenadas e os CCOs foram maturados, fecundados e cultivados individualmente até o dia 8 de desenvolvimento. De acordo com os resultados da produção de embriões, as amostras de células foram agrupadas sendo constituídos 6 tratamentos: CG que deram e que não deram embrião (CG EMB/ CG NEMB), CC imaturas que deram ou não embrião (CCI EMB/ CCI NEMB) e CC maturadas que deram ou não embrião (CCM EMB/ CCM NEMB). A expressão dos genes selecionados, foi quantificada por qPCR em 4 "pools" de 10 amostras de cada um dos 6 tratamentos, usando o gene GAPDH como constitutivo. Cada amostra foi analisada em triplicata e a eficiência e especificidade dos primers avaliadas pela curva de amplificação e dissociação, respectivamente.

**Experimento 2:** Quantificação de *cell-free* DNA (cfDNA) no líquido folicular oriundos de folículos contendo ovócitos com alta e baixa capacidade de produzir embriões *in vitro*

Nesse experimento foi levantada a hipótese de que a quantidade de cfDNA presente no líquido folicular é um indicativo da qualidade do ovócito. Para isso o cfDNA foi quantificado no líquido folicular proveniente dos folículos com ovócitos que formaram ou não embrião. Considerando o pequeno volume (15µL) das amostras individualmente armazenadas de LF, e que para extrair cfDNA através dos kits comerciais disponíveis seria necessário um volume mínimo de 200µL foi necessário

estabelecer e otimizar um protocolo para extração de cfDNA que utilizasse apenas 15 µL da amostra.

Após a extração de cfDNA, cada amostra eluída (10 µL) foi dividida em 3 para a análise da quantidade de 3 genes: ART2, BOVTA e GFP (*green fluorescent protein*) por qPCR. Os genes ART2 e BOVTA, são elementos nucleares intercalados curtos (SINEs), e foram selecionados por se tratar de uma classe de retrotransposons que possuem muitas cópias ao longo do genoma além de serem enriquecidos no cfDNA (TAJIMA et al.,2002; COSENZA et al.,2019). Foram analisadas 30 amostras individuais de LF de folículo/CCO do grupo EMB e 30 amostras do grupo NEMB. O CT de cada amostra analisada de LF foi dividido pelo valor de CT de sua amostra referência para o gene GFP, e essa razão foi comparada entre os grupos ( $\frac{CT_{Alvo}}{CT_{GFP}}$ ).

**Experimento 3:** Dosagem de Progesterona e Estradiol do Líquido Folicular oriundos de folículos contendo ovócitos com alta e baixa capacidade de produzir embriões *in vitro*

Da mesma forma que nos experimentos anteriores as amostras obtidas e armazenadas individualmente, foram agrupadas de acordo com o resultado da PIVE. As concentrações de progesterona e estradiol foram determinadas por quimiluminescência e eletroquimioluminescência respectivamente, analisadas no laboratório comercial TECSA® Tecnologia em Sanidade Animal, Belo Horizonte -MG, Brasil. Devido ao volume coletado de cada folículo ser muito pequeno foi necessário fazer pools. Foram formados 4 “pools” composto de 13 amostras de LF para cada um dos grupos, EMB e NEMB.

Para a comparação entre os grupos foi utilizada a concentração de E2, a de P4 e a relação entre os dois que foi calculada dividindo a concentração de E2 pela concentração de P4.

#### 4- Análise estatística

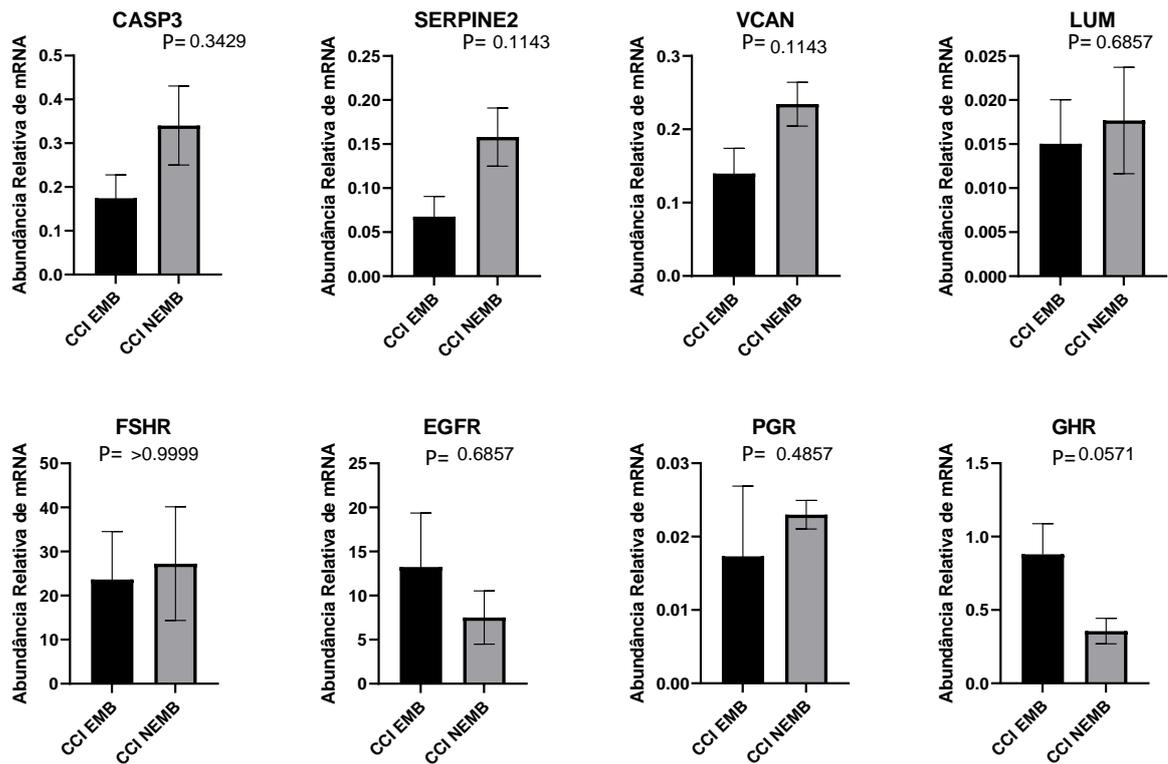
Os resultados obtidos de desenvolvimento embrionário, foram analisados pelo teste do Qui-quadrado ( $P < 0,05$ ). Os dados de quantificação do padrão de expressão gênica avaliados para normalidade, e após foi feita análise de variância e teste de Tukey para comparação de médias, ou Kruskal-Wallis e Mann-Whitney se

apresentaram distribuição normal ou não, respectivamente. Para a quantificação de cfDNA os dados de CT de cada amostra analisada de LF foram divididos pelo valor de CT de sua amostra referência para o gene GFP. Essa razão foi avaliada quanto a normalidade e após foi feita análise de variância e teste de Tukey, ou Kruskal-Wallis e Mann-Whitney se apresentaram distribuição normal ou não, respectivamente. E, para concentração hormonal, Mann-Whitney. Todas as análises foram avaliadas utilizando-se o programa Prophet Statistics, versão 5.0 (BBN Systems & Technologies, Cambridge, MA, 1996) e GraphPad Prism 9.

## RESULTADOS

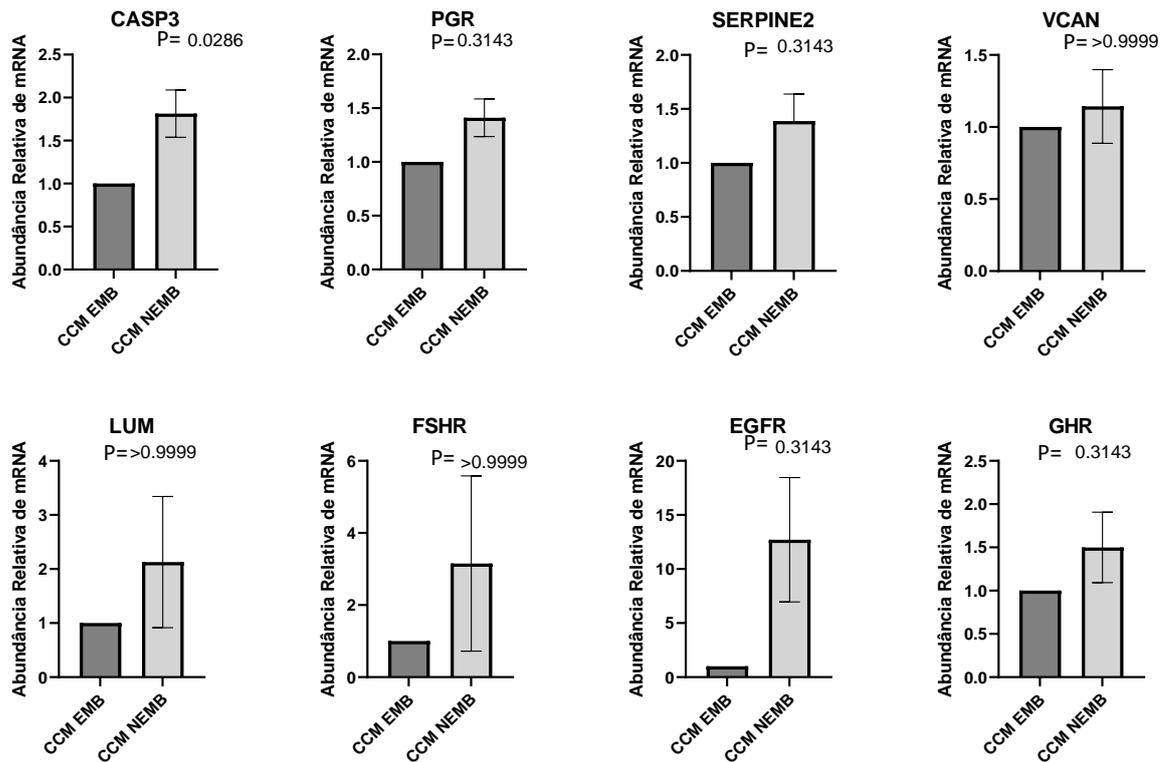
Para os experimentos 1, 2 e 3, foram realizadas 15 manipulações, 10 ovários por manipulação, com um total de 216 folículos dissecados. Foram dissecados um total de 216 folículos, dos quais todo o material foi coletado e armazenado individualmente. Dos 216 CCOs biopsiados, maturados, fecundados e cultivados individualmente foram obtidos 49 blastocistos expandidos no D8, sendo uma taxa de produção média de embrião de 22,7%.

No primeiro experimento foi avaliada a expressão de genes relacionados com competência ovocitária em CC imaturas, CC maturadas e CG dos dois grupos experimentais: EMB e NEMB. Inicialmente foi analisada a quantidade de transcritos dos genes selecionados nas CC imaturas dos dois grupos avaliados (Figura 6). Pode-se observar que apenas o gene GHR apresentou diferença na expressão entre o grupo que originou e o que não originou embrião.



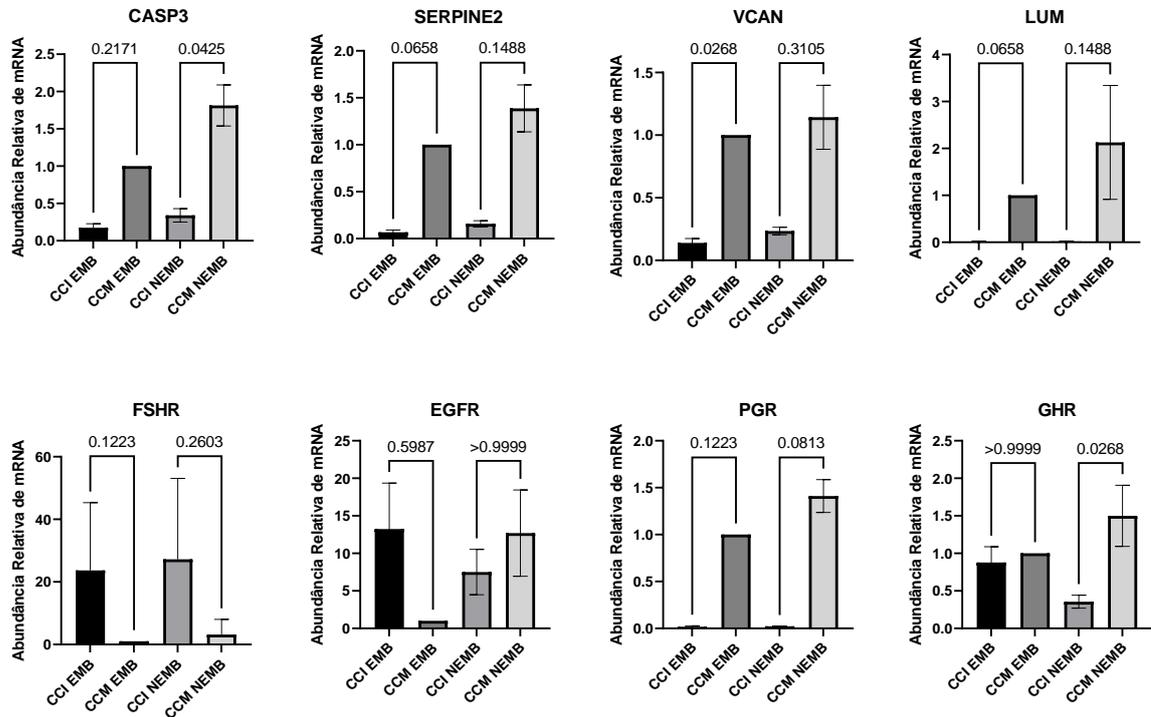
**Figura 6.** Nível de transcritos dos genes CASP3 (Caspase 3), SERPINE2 (Serpina pertencente à família E, membro 2), VCAN (Versican), LUM (Lumican), FSHR (Receptor de hormônio foliculo estimulante), EGFR (Receptor de fator de crescimento epidermal), PGR (Receptor de progesterona) e GHR (Receptor do hormônio de crescimento) em células do cumulus imaturas coletadas de complexos-cumulus-ovócitos (CCOs) que deram origem a embrião no D8 (CCI EMB) e de CCOs que clivaram, mas não chegaram ao estágio de Blastocisto (CCI NEMB). Para cada grupo foram utilizados quatro pools de amostras, avaliados em triplicata. Os dados são expressos como média±desvio padrão.

Posteriormente, foi comparado entre os dois grupos experimentais a expressão dos genes selecionados, nas CC dos mesmos CCOs após a MIV (Figura 7). Os resultados mostraram que apenas o gene CASP3 apresentou expressão diferencial em CC de CCOs maduros sendo o grupo NEMB o que apresentou maior quantidade de transcritos.



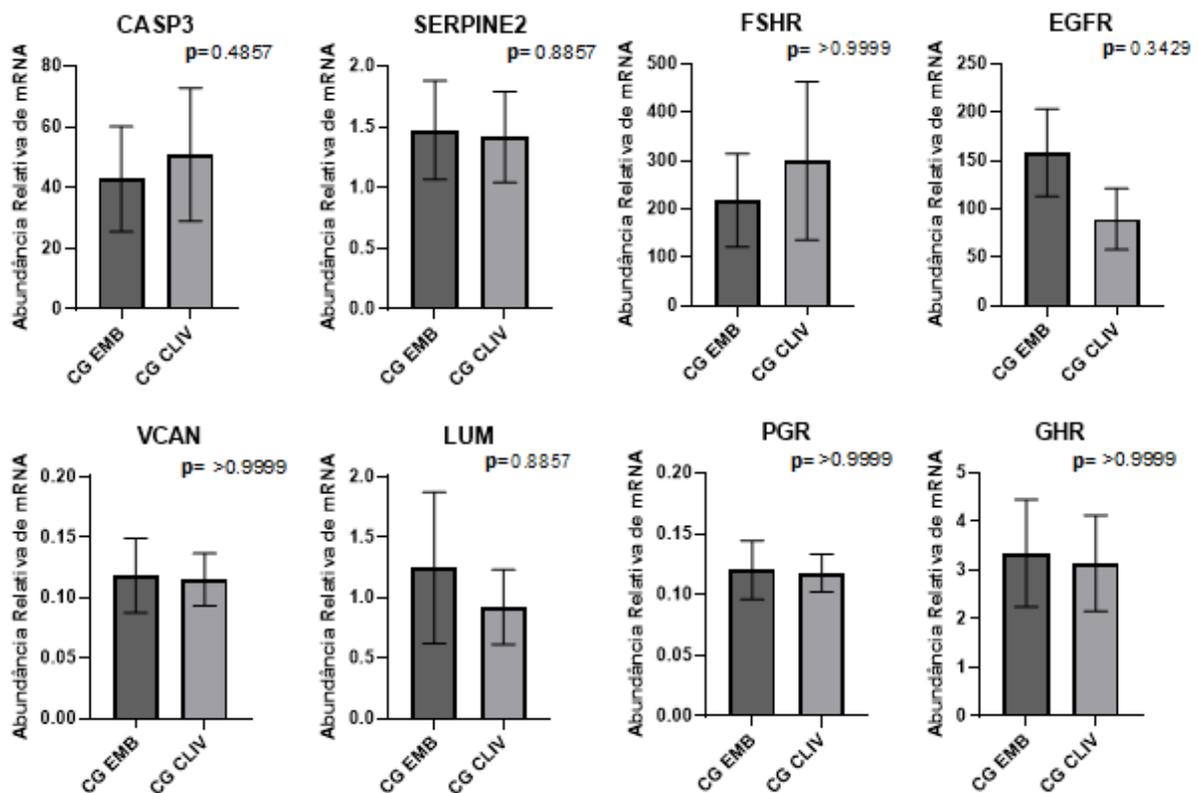
**Figura 7.** Nível de transcritos dos genes CASP3 (Caspase 3), SERPINE2 (Serpina pertencente à família E, membro 2), VCAN (Versican), LUM (Lumican), FSHR (Receptor de hormônio foliculo estimulante), EGFR (Receptor de fator de crescimento epidermal), PGR (Receptor de progesterona) e GHR (Receptor do hormônio de crescimento) em células do cumulus maturadas, coletadas de complexos-cumulus-ovócitos (CCOs) que deram origem a blastocisto no D8 (CCM EMB) e de CCOs que clivaram, mas não chegaram ao estágio de blastocisto (CCM NEMB). Para cada grupo foram utilizados quatro pools de amostras, avaliados em triplicata. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão.

Finalmente, o padrão de expressão dos oito genes selecionados durante a MIV (Figura 8) foi avaliada. Observou-se que os genes CASP3 e GHR apresentaram aumento na quantidade de transcritos após a MIV nas CC de CCO que não chegam a BX no D8. E o gene VCAN apresentou aumento no nível de transcritos durante a MIV apenas no grupo que resultou em embrião no D8. Já os demais genes, não apresentaram mudança na expressão durante a MIV nos grupos avaliados.



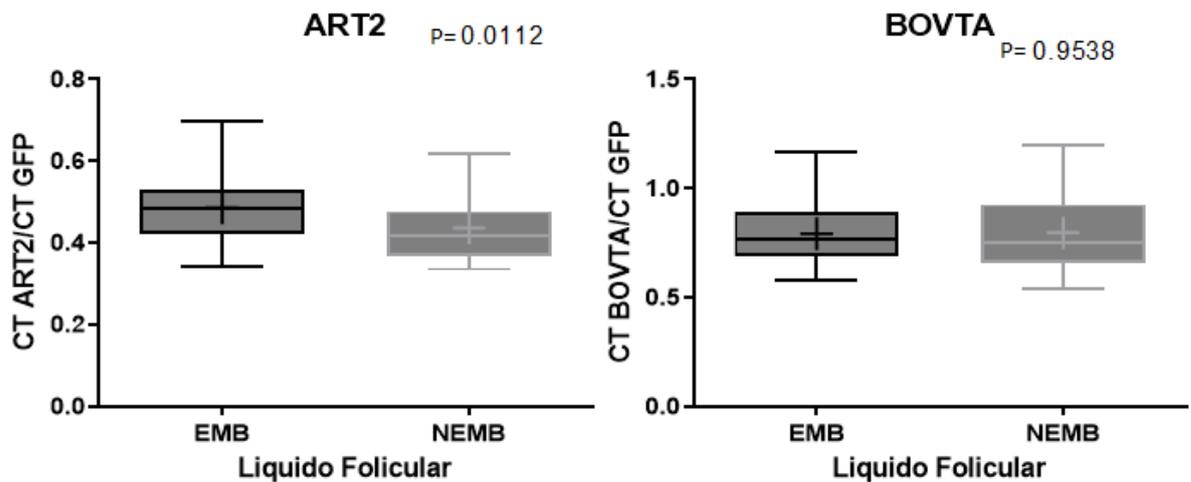
**Figura 8.** Nível de transcritos dos genes CASP3 (Caspase 3), SERPINE2 (Serpina pertencente à família E, membro 2), VCAN (Versican), LUM (Lumican), FSHR (Receptor de hormônio folículo estimulante), EGFR (Receptor de fator de crescimento epidermal), PGR (Receptor de progesterona) e GHR (Receptor do hormônio de crescimento) em células do cumulus imaturas coletadas de complexos-cumulus-ovócitos (CCOs) que deram origem a embrião no D8 (CCI EMB), em células do cumulus maturadas, coletadas de CCOs que deram origem a embrião no D8 (CCM EMB), CC imaturas de CCOs que clivaram, mas não chegaram ao estágio de blastocisto (CCI NEMB) e CC maturadas de CCOs que clivaram, mas não chegaram ao estágio de blastocisto (CCM NEMB). Para cada grupo foram utilizados quatro pools de amostras, avaliados em triplicata. Os dados foram expressos como média±desvio padrão.

A quantificação dos transcritos dos genes selecionados também foi realizada nas CG provenientes de folículos que continham CCOs dos dois grupos experimentais. Entretanto, nenhuma diferença foi detectada entre os grupos avaliados (Figura 9).



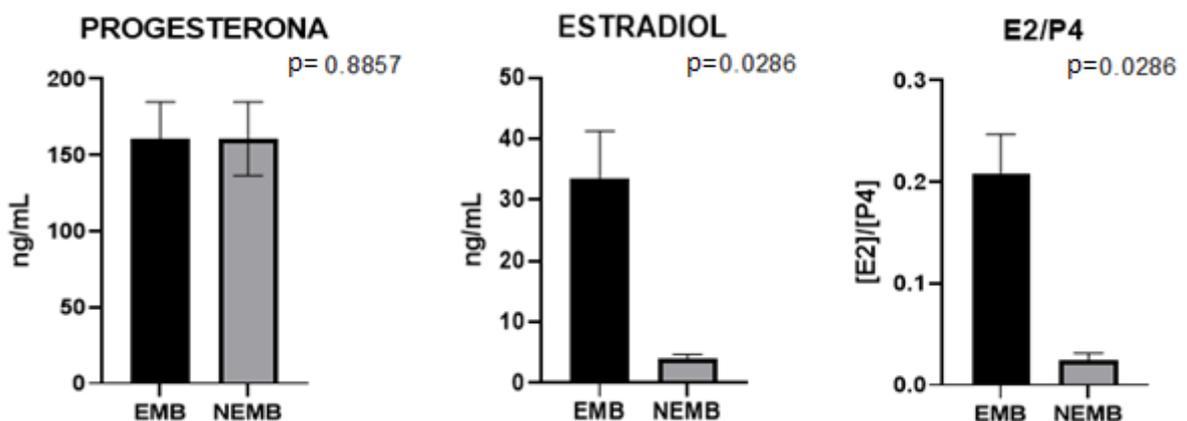
**Figura 9.** Nível de transcritos dos genes CASP3, SERPINE2, VCAN, LUM, FSHR, EGFR, PGR e GHR em células da granulosa obtidas de folículos ovarianos de onde foram coletados complexos-cumulus-ovócitos (CCOs) que deram origem a embrião no D8 (CG EMB) e de CCOs que clivaram, mas não chegaram ao estágio de blastocisto (CG NEMB). Para cada grupo foram utilizados quatro pools de amostras, avaliados em triplicata. Os dados foram expressos como média±desvio padrão.

No segundo experimento, com o estabelecimento do protocolo para extração de cfDNA de amostras com pequenos volumes, foi possível fazer a quantificação de cópias de ART2 e BOVTA em amostras individuais do LF de ambos os grupos. Os resultados mostraram maior quantidade ( $P < 0,05$ ) de cfDNA do gene ART2 no LF do grupo NEMB comparado ao do EMB. Já para o gene BOVTA nenhuma diferença ( $P > 0,05$ ) foi encontrada entre os grupos (Figura 10).



**Figura 10.** Quantificação dos genes ART2 e BOVTA em amostras de líquido folicular onde foram coletados complexos-cumulus-ovócitos (CCOs) que se desenvolveram até embrião no D8 (EMB) e CCOs que clivaram, mas não chegaram ao estágio de blastocisto no D8 (NEMB). Cada grupo teve 30 amostras avaliadas. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

No terceiro experimento, foi avaliada a concentração de progesterona e estradiol no LF comparando amostras oriundas de folículos de onde foram coletados CCOs que se desenvolveram ou não até embrião no D8. Os resultados mostraram que a concentração de progesterona foi similar entre os grupos EMB (164,5ng/mL) e NEMB (152,8ng/mL). Já a concentração de estradiol e a relação E2/P4 foi maior ( $P < 0,05$ ) no grupo EMB (33,14ng/mL; 0,226) comparado ao grupo NEMB (3,73ng/mL; 0,024) (Figura 11).



**Figura 11.** Concentração de Progesterona e Estradiol no líquido folicular, de folículos que continham complexo-cumulus-ovócitos (CCOs) que se desenvolveram até embrião no D8 (EMB) e CCOs que clivaram, mas não chegaram ao estágio de blastocisto no D8 (NEMB). E a relação entre Progesterona e Estradiol (E2/P4). Para cada grupo foram analisados quatro pools de 15 amostras. Os dados foram expressos como média± desvio padrão.

## DISCUSSÃO

Considerando que o ambiente folicular é essencial para o desenvolvimento e aquisição de competência dos ovócitos, a identificação de características bioquímicas que diferenciem folículos contendo ovócitos com maior competência é de grande valia para melhorar os resultados da PIVE. Essas informações sobre qual o ambiente mais favorável para a obtenção de ovócitos mais competentes pode indicar mudanças a serem realizadas nos sistemas de MIV e também indicar quais parâmetros podem ser utilizados como marcadores para selecionar os melhores ovócitos. Visando identificar essas diferenças esse estudo comparou a expressão de genes candidatos a competência em CC imaturas, CC maturadas e CG, assim como a quantidade de cfDNA e dosagem de hormônios esteroides no LF entre folículos que continham ovócitos mais ou menos competentes.

No experimento 1, vários genes já citados na literatura como possíveis marcadores para a competência ovocitária, foram quantificados em CC antes e após a MIV e nas CGs e a expressão comparada entre as amostras obtidas de folículos dos grupos EMB e NEMB. Inicialmente foi comparada a quantidade de transcritos nas CC imaturas, sendo que de todos os genes avaliados apenas o GHR apresentou diferença na quantidade de transcritos, tendo maior quantidade em CC de CCO que chegaram ao estágio de blastocisto no D8. Considerando que a seleção dos genes foi baseada na literatura era esperado que um maior número de genes apresentasse uma expressão diferencial. Entretanto, é importante ressaltar que existem grande variação entre os sistemas de MIV, tais como momento da coleta dos CCOs, meio de MIV, tamanho de folículo utilizado, protocolos de superestimulação ovariana, entre outros que podem afetar os resultados e serem responsáveis pela falta de repetibilidade. De fato, esse efeito foi corroborado pelos resultados do capítulo 1, em que a fonte proteica utilizada na MIV afeta a expressão de certos genes nas CCs.

Com relação ao GHR, estudos anteriores do mesmo grupo, também encontraram diferença de transcritos desse gene em CC imaturas (CAIXETA et

al.,2009; MELO et al., 2017). Nesses estudos a quantidade de transcritos de GHR foi maior em células do cumulus de folículos  $\geq 8,1$  mm, os quais continham CCOs mais competentes. Resultados similares também foram relatados em outros estudos que mostraram maior expressão desse gene em CC imaturas de CCO que deram origem a embrião após a FIV (KUSSANO et al., 2015; KUSSANO et al., 2022). Desta forma a expressão de GHR como marcador de competência está sendo consolidada. A presença de GH no meio MIV acelera maturação, melhora desenvolvimento embrionário, induz expansão da CC e aumenta taxas de PIVE (KOLLE et al., 1998, KOLLE et al., 2003). Esse efeito benéfico do GH só foi observado na presença das CCs, o que sugere que seu efeito ocorre pela presença dos receptores nessas células. Isso justificaria o motivo de uma maior expressão de GHR estar relacionado com a competência dos ovócitos.

Considerando que a maioria dos trabalhos citados na literatura nessa área são em humanos em que as CCs utilizadas são coletadas de ovócitos maturados *in vivo*, e que nas espécies domésticas apesar da maturação se realizada *in vitro*, a biópsia de uma amostra das CC após a MIV poderia ser mais uma alternativa de avaliação da competência. Além disso, já foi demonstrado que a realização de biópsia nas CC tanto imatura como maturadas não afetam o desenvolvimento embrionário, o que reforçou a ideia de também avaliar as CC maturadas (KUSSANO et al., 2016, SPRICIGO et al., 2022). Sendo assim, nesse estudo também foi avaliado o nível de transcritos nas CC após a MIV. A comparação entre os grupos que deram ou não embrião na PIVE, mostrou que apenas o gene CASP3 foi diferencialmente expresso e apresentou nível mais alto de transcritos nas amostras de CC do grupo NEMB. Esses resultados estão de acordo com outros relatos que mostram que a expressão desses genes está aumentada em CC de mulheres com problemas de fertilidade comparado a mulheres saudáveis (SALEHI et al., 2017) e, que a apoptose das CC está relacionada com a competência de desenvolvimento dos ovócitos, fragmentação embrionária e prejuízos no desenvolvimento embrionário (HOST et al., 2000; IKEDA et al., 2003). A caspase 3 é um dos fatores pro-apoptóticos expresso em células foliculares e a apoptose é um processo presente nas funções normais como atresia, luteólise e desenvolvimento do folículo (VARRAS et al., 2012). Portanto, é possível que a maior quantidade de transcritos de CASP3 encontrados em CC de CCO do grupo NEMB indique que esses folículos poderiam estar em início de atresia e que os ovócitos já poderiam ter sido afetados de alguma forma.

Outro aspecto que tem sido considerado em estudos sobre competência e expressão de genes é o comportamento dos genes durante a MIV, ou seja, se a expressão de um gene aumentar, diminuir ou se mantiver durante esse período poderá refletir a qualidade do CCOs (BRAGA et al.,2019). Portanto, no presente estudo esse parâmetro também foi avaliado. Os resultados mostraram que o comportamento de três dos oito genes avaliados variou entre os grupos durante a MIV, sendo que a expressão dos genes CASP3 e GHR, aumentaram no grupo NEMB, e do VCAN aumentou no grupo EMB. Pode-se observar, que o gene GHR só teve aumento de transcritos durante a MIV apenas no grupo NEMB, mas nas CC imaturas, apresentou maior nível nas CC do grupo EMB, sugerindo que talvez CCOs de pior qualidade não tenham receptor suficiente e por isso foi necessário aumentar a quantidade de transcritos durante a MIV. No período de maturação, os CCOs, passam por várias transformações bioquímicas e morfológicas, que garantem a progressão da meiose ao estágio de metáfase II, a expansão das CC e a reorganização das organelas, em preparação para a fecundação (SIRARD et al., 2003; LONERGAN et al. 2003). Sendo assim, o aumento na quantidade de transcritos de CASP3 encontrada neste estudo, nas CC maduras do grupo que não gerou embriões, reforça a possibilidade de que os folículos poderiam estar em início de atresia e que os ovócitos estariam afetados, o que não aconteceu no grupo EMB. Outro gene em que a mudança de expressão foi relacionada com a qualidade do ovócito foi o gene VCAN. A proteína codificada por esse gene é um proteoglicano, envolvido em manutenção e morfogênese de tecidos através dos seus papéis em adesão, proliferação e migração celular. Além de atuar estabilizando ácido hialurônico na matriz pericelular, essencial para a expansão das CC (RUSSELL et al., 2003; VAN MONTFOORT et al., 2008). Sendo assim, um aumento do nível de transcritos encontrado no presente estudo, em CC maturadas do grupo EMB, sugere que o aumento seria um fato fisiológico de CCOs saudáveis.

Já o segundo e o terceiro experimento foram focados nas características do LF. O LF é um importante componente do ambiente folicular que aloja os CCOs e, sua composição varia durante a foliculogênese de forma que atenda adequadamente todas as necessidades dos ovócitos. Os seus componentes, portanto, estão relacionados com o estágio de crescimento folicular e o potencial de desenvolvimento do ovócito (REVELLI et al., 2009; SOHEL et al., 2013). O LF é uma alternativa interessante para a busca de marcadores para uma seleção de forma não invasiva.

Desta forma, duas características foram abordadas no presente estudo, a presença de cfDNA e a concentração de hormônios esteroides.

No experimento 2, foi avaliada a quantidade de cfDNA presente no LF dos dois grupos, EMB e NEMB. Como as amostras foram obtidas de folículos individuais, o volume coletado era 15  $\mu$ L, entretanto esse volume não era suficiente para utilizar kits comerciais para extração de cfDNA, que requerem um volume mínimo de 200 $\mu$ L. Portanto foi necessário estabelecer um protocolo que utilizasse um volume que fosse adequado as amostras estocadas. Para estabelecer o protocolo, amostras de LF foram testadas com o protocolo de extração de cfDNA desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular Animal (LGMA) da EMBRAPA – CENARGEN e mostrado anteriormente, e demonstramos que volumes muito pequenos podem ser utilizados com segurança para extração de cfDNA. O estabelecimento desse protocolo possibilita a extração de cfDNA utilizando volume pequenos de forma simples e econômica, já que dispensa o uso de kits comerciais. Devido a inexistência de trabalhos em bovinos que quantifiquem cfDNA em LF, o presente estudo se baseou nos relatos em humanos, os quais utilizaram a sequência de ALU para a quantificação por qPCR (UMETANI ET AL., 2006; SCALICI1 et al., 2014; AZZAM et. al., 2021). ALU são elementos nucleares intercalados curtos (SINEs), uma classe de retrotransposons que possuem alto número de cópias ao longo do genoma, cerca de 12% do genoma de mamíferos. Entretanto, não foi encontrado o ALU em bovinos, sendo necessário uma busca por outros (SINEs) que pudessem ser utilizados nessa espécie. Foi então, encontrado os genes ART2 e BOVTA (TAJIMA et al.,2002; COSENZA et al.,2019), que também são SINEs, assim como os demais, essas sequencias foram quantificadas e comparadas nas amostras dos dois grupos utilizados neste estudo. Os resultados mostraram maior quantidade de cfDNA do gene ART2 no LF do grupo NEMB comparado ao grupo EMB. Já para o gene BOVTA nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos. A maior quantidade de cfDNA no LF do grupo NEMB pode ser um indicador da competência e um possível marcador. Resultados semelhantes foram relatados em suínos, em que mostraram que alta quantidade de cfDNA no LF estava relacionada com a baixa qualidade no desenvolvimento de ovócitos, morte celular e também a apoptose de CGs (ICHIKAWA et al. 2019). Outros estudos em humanos também confirmam esses achados pois mostraram baixa quantidade de cfDNA no LF de mulheres com alto desenvolvimento embrionário (SCALICI et al., 2014; TRAVER et al., 2015; GUAN et al., 2017; KASSIM et al.,2018;

KONSTANTINOS et al., 2020; KHAN et al., 2020). É importante ressaltar que tanto os estudos em humanos como os de suínos foram realizados utilizando tamanhos de folículos e estágios de desenvolvimento ovocitária diferentes do presente estudo, o que sugere que o cfDNA pode ser uma característica mais confiável de avaliação, já que apresenta o mesmo comportamento em diferentes estágios de desenvolvimento (SCALICI et al., 2014; KONSTANTINOS et al., 2020).

Finalmente, no último experimento, a concentração de progesterona e estradiol, no LF foi comparado entre os grupos EMB e NEMB, e detectado uma maior concentração de estradiol e maior relação E2/P4 no grupo EMB. Estudos já mostraram o efeito benéfico de progesterona e estradiol na MIV, melhorando a qualidade de ovócitos bovinos e suínos (YUAN et al., 2016; MATSUO et al., 2017). A maioria dos estudos em humanos mostram que uma maior concentração de estradiol é encontrada no LF de mulheres com resultados positivos de gestação (TEISSER et al., 2000; CARPINTERO et al., 2014, PIZARRO et al., 2020). Já Matoba et al. (2013), com amostras bovinas de LF de folículos de 8mm, não encontraram diferença da dosagem de P4 e E2 entre grupos que deram ou não origem a embrião. É importante, ressaltar que no nosso estudo foram utilizados folículos de 5 a 6 mm de diâmetro, essa fase está próxima do momento em que o folículo dominante será selecionado, portanto é possível que os folículos com maior E2 no LF possam ser os futuros dominantes contendo ovócitos melhores. De fato, já foi mostrado que na fase de seleção as CG do futuro folículo dominante têm maior capacidade de secretar estradiol comparadas com as dos folículos subordinados (Fortune et al., 2001).

Em síntese, nesse estudo foi feita uma tentativa de avaliar quais parâmetros do ambiente folicular poderiam refletir a qualidade dos ovócitos e serem utilizados como marcadores para competência. Quando os resultados são analisados em conjunto, pode-se supor que a melhor condição folicular seja com maior expressão de GHR nas CC imaturas, menor nível de transcritos da CASP3 nas CC após a MIV, menor quantidade de cfDNA e maior dosagem de estradiol no LF. Considerando que o estradiol é capaz de proteger as células foliculares de apoptose induzida por estresse oxidativo (MURDOCH, 1998; LUND et al., 1999), é possível que uma maior concentração de E2 proteja o folículo o que reduziria a quantidade de cfDNA e a expressão e CASP3 após a MIV, com isso, os ovócitos teriam maior potencial de desenvolvimento.

Esses resultados podem agregar outras características para a seleção de ovócitos mais competentes, que podem ser utilizadas de forma não invasiva, trazendo benefícios para as TRAS, incluindo a PIVE. Entretanto, deve-se salientar que os resultados foram obtidos utilizando tamanho específico de folículo (5-6mm) e que, portanto, mais estudos são necessários para validar esses marcadores em outros tamanhos de folículos.

## CONCLUSÃO

Pode-se concluir com base nos resultados encontrados, que os genes GHR e CASP3 expressos nas CCs imaturas e maturadas respectivamente, a quantificação de cfDNA com o uso do gene ART2 e a dosagem de Estradiol no LF e sua relação com a progesterona (E2/P4) são características que podem ser utilizadas para seleção de ovócitos competentes em bovinos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTINI, D.F.; COMBELLES, C.M.; BENECHCHI, E.; CARABATSOS, M.J. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Reproduction**. 2001;121(5):647-53.

ANDRADE, G.; MEIRELLES, F.; PERECIN, F.; SILVEIRA, J. Cellular and extracellular vesicular origins of miRNAs within the bovine ovarian follicle. **Reproduction in Domestic Animals**. p.1-10, 2017.

AZZAM, M., HAMOOD, A., ABDULKADIM, H. Cell-free DNA in Human Follicular Fluid as Biomarker for Intracytoplasmic Sperm Injection Procedure Outcome. **Open Access Maced J Med Sci** [Internet]. 2021 Dec. 14 [cited 2022 Dec. 1];9(B):1745-50.

BRAGA, T.F., SILVA, T.C.F., MARQUES, M.G., DE SOUZA, A.P., ALBRING, D., SILVA, L.P., CAETANO, A.R., DODE, M.A.N., FRANCO, M.M. The dynamics of gene expression, lipid composition and DNA methylation reprogramming are different during in vitro maturation of pig oocytes obtained from prepubertal gilts and cycling sows. **Reproduction in Domestic Animals**. 2019 Sep;54(9):1217-1229. doi: 10.1111/rda.13501. Epub 2019 Jul 3. PMID: 31269288.

BURNIK PAPLER, T.; VRTACNIK BOKAL, E.; MAVER, A.; KOPITAR, A.N.; LOVRECIC, L. Transcriptomic Analysis and Meta-Analysis of Human Granulosa and Cumulus Cells. **PLoS One**. 2015;10(8):e0136473.

BUCCIONE, R.; SCHROEDER, A.C.; EPPIG, J.J. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. ***Biology of Reproduction***. 1990;43(4):543–7.

BUNEL, A.; JORSSEN, E.P.; MERCKX, E.; LEROY, J.L.; BOLS, P.E.; SIRARD, M.A. Individual bovine in vitro embryo production and cumulus cell transcriptomic analysis to distinguish cumulus-oocyte complexes with high or low developmental potential. ***Theriogenology*** 2015;83:228– 37.

BURATINI, JR. J.; TEIXEIRA, A.B.; COSTA, I.B.; GLAPINSKI, V.F.; PINTO, M.G.L.; GIOMETTI, I.C.; BARROS, C.M.; CAO, M.; NICOLA, E.S.; PRICE, C.A. Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors, fibroblast growth factor receptor-3c and -4 in bovine antral follicles. ***Reproduction***, v.130, p.343-350, 2005

CAIXETA, E.S.; RIPAMONTE, P.; FRANCO, M.M.; JUNIOR, J.B.; DODE, M.A.N. Effect of follicle size on RNAm expression in cumulus cells and oocytes of *Bos Taurus indicus*: an approach to identify markers genes for developmental competence. ***Reprod Fertil Dev*** 2009;21:655–64.

CALDER, M. D.; CAVENEY, A. N.; SMITH, L. C.; WATSON, A. J. Responsiveness of bovine cumulus-oocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and Cx43 marker gene mRNAs during maturation in vitro. ***Reproductive Biology and Endocrinology***, v.1, p.1-12, 2003.

CARPINTERO, N.L., SUAREZ, O.A., MANGAS, C.C., VAREA, C.G., RIOJA, R.G. Follicular steroid hormones as markers of oocyte quality and oocyte development potential. ***J Hum Reprod Sci***. 2014;7(3):187-193.

COTICCHIO, G.; SERENI, E.; SERRAO, L.; MAZZONE, S.; IADAROLA, I.; BORINI, A. What criteria for the definition of oocyte quality? ***Annals of the New York Academy of Sciences***, v.1034, p. 132-144, 2004.

COSTERMANS, N G J.; SOEDE, N M F.; VAN TRICHT, BLOKLAND ,M.; KEMP, B.; KEIJER, J.; TEERDS, K J. Follicular fluid steroid profile in sows: relationship to follicle size and oocyte quality, ***Biology of Reproduction***, Volume 102, Issue 3, March 2020, Pages 740–749, <https://doi.org/10.1093/biolre/ioz217>

COSENZA G, IANNACCONE M, GALLO D, PAUCIULLO A. A fast and reliable polymerase chain reaction method based on short interspersed nuclear elements detection for the discrimination of buffalo, cattle, goat, and sheep species in dairy products. ***Asian-Australas J Anim Sci***. 2019 Jun;32(6):891-895. doi: 10.5713/ajas.18.0459. Epub 2019 Jan 2. PMID: 30744372; PMCID: PMC6498080.

DEVJAK, R., FON TACER, K., JUVAN, P., VIRANT KLUN, I., ROZMAN, D., VRTAČNIK BOKAL, E. Cumulus cells gene expression profiling in terms of oocyte maturity in controlled ovarian hyperstimulation using GnRH agonist or GnRH antagonist. ***PLoS One***. 2012;7(10):e47106. doi: 10.1371/journal.pone.0047106. Epub 2012 Oct 17. PMID: 23082142; PMCID: PMC3474825.

DING, S.; SONG, X.; GENG, X.; LIU, L.; MA, H.; WANG, X.; WEI, L.; XIE, L.; SONG, X. Saliva-derived cfDNA is applicable for EGFR mutation detection but not for quantitation analysis in non-small cell lung cancer. **Thoracic Cancer**, 10(10), 1973–1983, 2019.

DODE, M.A.N.; DUFORT, I.; MASSICOTTE, L.; SIRARD, M.A. Quantitative expression of candidate genes for developmental competence in bovine two-cell embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, p. 288-297, 2006.

EPPIG, J.J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**. 2001;122(6):829–38.

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

FORTUNE, J.E., RIVERA, G.M., EVANS, A.C., TURZILLO, A.M. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biology of Reproduction**. 2001 Sep;65(3):648-54. doi: 10.1095/biolreprod65.3.648. PMID: 11514324.

GOSDEN, R.G.; HUNTER, R.H.; TELFER, E.; TORRANCE, C.; BROWN, N. Physiological factors underlying the formation of ovarian follicular fluid. **Journal of Reproduction and Fertility** 1988; 82:813–825.

GUAN, Y.; ZHANG, W.; WANG, X.; CAI, P.; JIA, Q.; ZHAO, W. Cell-free DNA induced apoptosis of granulosa cells by oxidative stress. **Clin Chim Acta** 2017; **473**: 213–217.

HØST, E., MIKKELSEN, A.L., LINDENBERG, S., SMIDT-JENSEN, S. Apoptosis in human cumulus cells in relation to maturation stage and cleavage of the corresponding oocyte. **Acta Obstet Gynecol Scand**. 2000 Nov;79(11):936-40. PMID: 11081676.

ICHIKAWA, K.; SHIBAHARA, H.; SHIRASUNA, K.; KUWAYAMA, T.; IWATA, H. Cell-free DNA content in follicular fluid: A marker for the developmental ability of porcine oocytes. **Reprod Med Biol**. 2019 Dec 21;19(1):95-103. doi: 10.1002/rmb2.12309. PMID: 31956291; PMCID: PMC6955585.

IKEDA, S., IMAI, H., YAMADA, M. (2003) Apoptosis in cumulus cells during in vitro maturation of bovine cumulus-enclosed oocytes. **Reproduction** 125(3):369–376

KHAN, H.L., BHATTI, S., ABBAS, S., KALOGLU, C., QURAT-UL-AIN ZAHRA, S., KHAN, Y.L., HASSAN, Z., TURHAN, N.Ö., AYDIN, H.H. Melatonin levels and microRNA (miRNA) relative expression profile in the follicular ambient microenvironment in patients undergoing in vitro fertilization process. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**. 2021 Feb;38(2):443-459. doi: 10.1007/s10815-020-02010-2. Epub 2020 Nov 23. PMID: 33226531; PMCID: PMC7884535.

KASSIM, H.R., H.L. AL-OMARY, S.J. AHMED, Evaluation of cell free DNA in follicular fluid and embryo quality in poly cystic ovarian syndrome of Iraqi women. **IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSR-JPBS)** Volume 13, Issue 1 Ver. II (Jan. – Feb. 2018), PP 05-09

KONSTANTINOS S, PETROULA T, EVANGELOS M, POLINA G, ARGYRO G, SOKRATIS G, et al. Assessing the practice of LuPOR for poor responders: a prospective study evaluating follicular fluid cfDNA levels during natural IVF cycles. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**.. 2020;37: 1183–94.

KOLLE, S.; SINOWATZ, F.; BOIE, G.; LINCOLN, D. Developmental changes in the expression of the growth hormone receptor messenger ribonucleic acid and protein in the bovine ovary. **Biology of Reproduction**, v.59, p.836-842, 1998.

KOLLE, S.; STOJKOVIC, M.; BOIE, G.; WOLF, E.; SINOWATZ, F. Growth hormonerelated effects on apoptosis, mitosis, and expression of Connexin 43 in bovine in vitro maturation cumulus-oocyte complexes. **Biology of Reproduction**, v.68, p.1584-1589, 2003.

KORDUS, R.J., LAVOIE, H.A. Granulosa cell biomarkers to predict pregnancy in ART: pieces to solve the puzzle. **Reproduction**. 2017 Feb;153(2):R69-R83. doi: 10.1530/REP-16-0500. Epub 2016 Nov 4. PMID: 27815559.

KUSSANO, N.R.; LEME, L.O.; GUIMARÃES, A.L.S.; FRANCO, M.M.; DODE, M.A.N. Molecular markers for oocyte competence in bovine cumulus cells. **Theriogenology**, v. 85, p. 1167-1176, 2016.

KUSSANO, N.R.; LEME, L.O.; DODE, M.A.N. (2021): Protein source in maturation media affects gene expression in cumulus cells and embryo development in cattle, **Animal Biotechnology**, DOI: 10.1080/10495398.2021.2019755

KUSTANOVICH, A., SCHWARTZ, R., PERETZ, T., GRINSHPUN, A. Life and death of circulating cell-free DNA. **Cancer Biol Ther**. 2019;20(8):1057– 67.

KRISHER, R. L. The effect of oocyte quality on development. **Journal of Animal Science**, v. 82 (Suppl. E):E14–E23, 2004.

LAGER, A.E.; KOCABAS, A.M.; OUT, H.H.; RUPPEL, P.; LANGERVELD, A.; SCHNARR, P.; et al. Identification of a novel gene set in human cumulus cells predictive of an oocyte's pregnancy potential. **Fertility and Sterility** 2013;99: 745–52.

LATIF KHAN, H.; BHATTI, S.; LATIF KHAN, Y.; ABBAS, S.; MUNIR, Z.; RAHMAN KHAN SHERWANI, I.A.; SUHAIL, S.; HASSAN, Z.; AYDIN, H.H. Cell-free nucleic acids and melatonin levels in human follicular fluid predict embryo quality in patients undergoing in-vitro fertilization treatment. **Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction**. 2020 Jan;49(1):101624. doi: 10.1016/j.jogoh.2019.08.007. Epub 2019 Aug 28. PMID: 31472269.

LEQUARRE, A.S., VIGNERON, C., RIBAUCCOUR, F., HOLM, P., DONNAY, I., DALBIÈS-TRAN, R., CALLESEN, H., MERMILLOD, P. Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. **Theriogenology**. 2005 Feb;63(3):841-59. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.05.015. PMID: 15629802. LIU, X., MAI, H., CHEN, P., ZHANG, Z., WU, T., CHEN, J., SUN, P., ZHOU, C., LIANG, X., HUANG, R. Comparative analyses in transcriptome of human granulosa cells and follicular fluid micro-environment between poor ovarian responders with conventional

controlled ovarian or mild ovarian stimulations. **Reproductive Biology and Endocrinology**. 2022 Mar 21;20(1):54. doi: 10.1186/s12958-022-00926-1. PMID: 35313911; PMCID: PMC8935846.

LONERGAN, P.; MONAGHAN, P.; RIZOS, D.; BOLAND, M.P.; GORDON, I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 37, p. 48-53, 1994.

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

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

LONERGAN, P., FAIR, T. Maturation of Oocytes in Vitro. *Annu Rev Anim Biosci*. 2016;4:255-68. doi: 10.1146/annurev-animal-022114-110822. Epub 2015 Nov 9. PMID: 26566159.

LUND, S.A., MURDOCH, J., VAN KIRK, E.A., MURDOCH, W.J. Mitogenic and antioxidant mechanisms of estradiol action in preovulatory ovine follicles: relevance to luteal function. **Biology of Reproduction**. 1999;61(2):388-392.

MBAYE, M.; KHALFI, B.; LOUANJLI, N.; SAADANI, B.; KAAROUCH, I.; MADKOUR, A.; SOUKRI, A. Seminal Cell-Free DNA Test for the Management of Male Infertility. **Annual Research & Review in Biology**, 30(5): 1-10, 2019.

MACHADO, G.M.; CARVALHO, J.O.; FILHO, E.S.; CAIXETA, E.S.; FRANCO, M.M.; RUMPF, R. et al. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**. 2009;71:1289-97.

MACHTINGER, R.; RODOSTHENOUS, R.S.; ADIR, M.; MANSOUR, A.; RACOWSKY, C.; BACCARELLI, A.A.; et al. Extracellular microRNAs in follicular fluid and their potential association with oocyte fertilization and embryo quality: an exploratory study. **Journal of assisted reproduction and genetics**. 2017;34:525-33.

MAMO, S. et al. Sequential analysis of global gene expression profiles in immature and in vitro matured bovine oocytes: potential molecular markers of oocyte maturation. **BMC Genomics**, v.12, p.151-165, 2011.

MATOBA, S.; BENDER, K.; FAHEY, A.G.; SOLOMON, M.; BRENNAN, L.; LONERGAN, P.; et al. Predictive value of bovine follicular components as markers of oocyte developmental potential. **Reproduction Fertility and Development** 2014;26:337-45.

MATSUO, M., SUMITOMO, K., OGINO, C., GUNJI, Y., NISHIMURA, R., HISHINUMA, M. Three-step in vitro maturation culture of bovine oocytes imitating temporal changes

of estradiol-17 $\beta$  and progesterone concentrations in preovulatory follicular fluid. *Arch Anim Breed* 2017; **60**:385–390

MAZZONI, G.; SALLEH, S.M.; FREUDE, K.; PEDERSEN, H.S.; STROEBECH, L.; CALLESEN, H.; et al. (2017) Identification of potential biomarkers in donor cows for *in vitro* embryo production by granulosa cell transcriptomics. **PLoS ONE** 12(4): e0175464. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175464>

MELO, E. O.; CORDEIRO, D. M.; PELLEGRINO, R.; WEI, Z.; DAYE, Z. J.; NISHIMURA, R. C.; DODE, M. A. N. (2017), Identification of molecular markers for oocyte competence in bovine cumulus cells. **Animal Genet**, 48: 19–29. doi:10.1111/age.12496

MENDOZA, C. et al. Follicular fluid markers of oocyte developmental potential. **Human Reproduction**, v. 17, n. 4, p. 1017-1022, Apr. 2002.

MORENO, J.M.; NÚÑEZ, M.J.; QUIÑONERO, A.; MARTÍNEZ, S.; DE LA ORDEN, M.; SIMÓN, C.; et al. Follicular fluid and mural granulosa cells microRNA profiles vary in *in vitro* fertilization patients depending on their age and oocyte maturation stage. **Fertility and sterility**. 2015;104:1037-46. e1.

MUNAKATA, Y.; SHIRASUNA, K.; KUWAYAMA, T.; IWATA, H. Cell-free DNA in medium is associated with the maturation ability of *in vitro* cultured oocytes. **Journal of Reproduction and Development**. 2019;65(2):171-175. doi:10.1262/jrd.2018-123

MURDOCH, W.J. Inhibition by oestradiol of oxidative stress-induced apoptosis in pig ovarian tissues. **Journal of Reproduction and Fertility**. 1998;**114**(1):127-130.

PIZARRO, B.M., CORDEIRO, A., REGINATTO, M.W., CAMPOS, S.P.C., MANCEBO A.C.A., AREAS, P.C.F., ANTUNES, R.A., SOUZA, M.D.C.B., OLIVEIRA, K.J., BLOISE F.F., BLOISE, E., FORTUNATO, R.S., ORTIGA-CARVALHO, T.M. Estradiol and Progesterone Levels are Related to Redox Status in the Follicular Fluid During *in vitro* Fertilization. **J Endocr Soc**. 2020 Jun 1;4(7):bvaa064. doi: 10.1210/jendso/bvaa064. PMID: 32666010; PMCID: PMC7326473.

PFEFFER, P.L.; SISCO, B.; DONNISON, M.; SOMERS, J.; SMITH, C. Isolation of genes associated with developmental competency of bovine oocyte. **Theriogenology** 2007;68:S84–90.

REVELLI, A.; DELLE PIANE, L.; CASANO, S.; MOLINARI, E.; MASSOBRIO, M.; RINAUDO, P. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. **Reproductive Biology and Endocrinology** 2009; 7:40.

RICHANI, D., DUNNING, K.R., THOMPSON, J.G., GILCHRIST, R.B. Metabolic co-dependence of the oocyte and cumulus cells: essential role in determining oocyte developmental competence. **Human Reproduction Update**. 2021 Jan 4;27(1):27-47. doi: 10.1093/humupd/dmaa043. PMID: 33020823.

ROMAR, R.; DE SANTIS, T.; PAPIILLIER, P.; PERREAU, C.; THELIE, A.; DELL' AQUILA, M.E. et al. Expression of maternal transcripts during bovine oocyte *in vitro*

maturation is affected by donor age. **Reproductive and Domestic Animals** 2011;46:e23–30.

RUSSELL, D. L.; SALUSTRI, A. Extracellular matrix of the cumulus-oocyte complex. **Seminars in Reproductive Medicine**, Sep., v. 24, n.4, p. 217-227, 2006.

SALEHI, E., AFLATOONIAN, R., MOEINI, A., YAMINI, N., ASADI, E., KHOSRAVIZADEH, Z., TARZJANI, M.D., HARAT, Z.N., ABOLHASSANI, F. Apoptotic biomarkers in cumulus cells in relation to embryo quality in polycystic ovary syndrome. *Arch Gynecol Obstet.* 2017 Dec;296(6):1219-1227. doi: 10.1007/s00404-017-4523-5. Epub 2017 Oct 7. PMID: 28988321.

SCALICI, E.; TRAVER, S.; MOLINARI, N.; MULLET, T.; MONFORTE, M.; VINTEJOUX, E.; HAMAMAH, S. Cell-free DNA in human follicular fluid as a biomarker of embryo quality. **Human Reproduction**. 2014 Dec;29(12):2661-9. doi: 10.1093/humrep/deu238. Epub 2014 Sep 29. PMID: 25267787.

SHEN. Q.; CHEN, M.; ZHAO, X.; LIU, Y.; REN, X.; ZHANG, L. Versican expression level in cumulus cells is associated with human oocyte developmental competence. *Syst Biol Reprod Med.* 2020 Jun;66(3):176-184. doi: 10.1080/19396368.2020.1725685. Epub 2020 Mar 6. PMID: 32138539.

SIRARD, M.A. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v. 55, p. 1241-1254, 2001.

SIRARD, M. A.; DUFORT, I.; COENEN, K.; TREMBLAY, K.; MASSICOTTE, L.; ROBERT, C. The use of genomics and proteomics to understand oocyte and early embryo functions in farm animals. **Reproduction**, suppl. 61, p. 117-129, 2003.

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

SIRARD, M.A.; DESROSIER, S.; ASSIDI, M. In vivo and in vitro effects of FSH on oocyte maturation and developmental competence. **Theriogenology**, v.68, p.71-76, 2007.

SOHEL, M.M.; HOELKER, M.;NOFERESTI, S.S.; SALILEW-WONDIM, D.; THOLEN, E.; LOOFT, C.; RINGS, F.; UDDIN, M.J.; SPENCER. T.E.; SCHELLANDER. K.; TESFAYE. D. Exosomal and non-exosomal transport of extra-cellular microRNAs in follicular fluid: implications for bovine oocyte developmental competence. **PLoS One** 2013; 8:e78505.

SPRÍCIGO, J.F.W., GUIMARÃES, A.L.S., CUNHA, A.T.M., LEME, L.O., CARNEIRO, M.C., FRANCO, M.M., DODE, M.A.N. Using Cumulus Cell Biopsy as a Non-Invasive Tool to Access the Quality of Bovine Oocytes: How Informative Are They? *Animals (Basel).* 2022 Nov 11;12(22):3113. doi: 10.3390/ani12223113. PMID: 36428341.

TAJIMA, K., ENISHI, O., AMARI, M., MITSUMORI, M., KAJIKAWA, H., KURIHARA, M., YANAI, S., MATSUI, H., YASUE, H., MITSUHASHI, T, KAWASHIMA, T.,

MATSUMOTO, M. PCR detection of DNAs of animal origin in feed by primers based on sequences of short and long interspersed repetitive elements. **Biosci Biotechnol Biochem**. 2002 Oct;66(10):2247-50. doi: 10.1271/bbb.66.2247. PMID: 12450143.

TEISSIER, M.P.; CHABLE, H.; PAULHAC, S.; AUBARD, Y.: Comparison of follicle steroidogenesis from normal and polycystic ovaries in women undergoing IVF: relationship between steroid concentrations, follicle size, oocyte quality and fecundability. **Human Reproduction** 2000, 15:2471-2477.

TRAVER, S.; SCALICI, E.; MULLET, T.; MOLINARI, N.; VINCENS, C.; ANAHORY, T.; HAMAMAH, S. Cell-free DNA in Human Follicular Microenvironment: New Prognostic Biomarker to Predict in vitro Fertilization Outcomes. **PLoS One**. 2015 Aug 19;10(8):e0136172. doi: 10.1371/journal.pone.0136172. PMID: 26288130; PMCID: PMC4545729.

UMETANI, N., KIM, J., HIRAMATSU, S., REBER, H.A., HINES, O.J., BILCHIK, A.J., HOON, D.S. Increased integrity of free circulating DNA in sera of patients with colorectal or periampullary cancer: direct quantitative PCR for ALU repeats. *Clin Chem*. 2006 Jun;52(6):1062-9. doi: 10.1373/clinchem.2006.068577. PMID: 16723681.

UYAR, A.; TORREALDAY, S.; SELI, E. Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality. **Fertility and Sterility** 2013;99:979–97.

VARRAS, M., POLONIFI, K., MANTZOURANI, M. *et al*. Expression of antiapoptosis gene survivin in luteinized ovarian granulosa cells of women undergoing IVF or ICSI and embryo transfer: clinical correlations. **Reproductive Biology Endocrinology** 10, 74 (2012). <https://doi.org/10.1186/1477-7827-10-74>

VANDESOMPELE, J.; De PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; De PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v.3, n. 7, 2002.

VAN MONTFOORT, A. P.; GERAEDTS, J.P.; DUMOULIN, J.C. STASSEN, A.P.M.; EVERS, J.L.H.; AYOUBI, T.A.Y. Differential gene expression in cumulus cells as a prognostic indicator of embryo viability: a microarray analysis. **Molecular Human Reproduction**, Mar, v. 14, n.3, p. 157-168, 2008.

VIANA, J. H. M. *et al*. Brazilian embryo industry in context: pitfalls, lessons, and expectations for the future. **Animal Reproduction** [S.I.], v. 14, n. 3, p. 476-81, Sept 2017.

YEO, C.; GILCHRIST, R.B.; LANE, M. Disruption of bidirectional oocyte-cumulus paracrine signaling during in vitro maturation reduces subsequent mouse oocyte developmental competence. **Biology of Reproduction**, v. 80, p. 1072-1080, 2009.

YUAN, B., LIANG, S., JIN, Y-X., KWON, J-W., ZHANG, J-B., KIM, N-H. Progesterone influences cytoplasmic maturation in porcine oocytes developing in vitro. *PeerJ* 2016; 4:e2454.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Um dos principais fatores responsáveis pela baixa produção de embriões quando se utiliza ovócitos maturados *in vitro* é o nível de competência dos ovócitos. Portanto, o uso de ovócitos mais competentes é fundamental para que se possa melhorar a eficiência da PIVE. Existe duas alternativas para isso, uma é obter os ovócitos mais competentes no momento da sua retirada dos folículos, a outra seria selecionar, dentre os ovócitos recuperados após a aspiração, somente os mais competentes para colocar em cultivo. O presente estudo tentou focar nesses dois aspectos utilizando como ferramenta a comparação de características bioquímicas entre folículo que continha ovócitos que deram ou não origem a embriões. A hipótese levantada foi que as diferenças observadas entre essas duas categorias de folículos, tanto no líquido quanto nas células foliculares, indicariam qual o ambiente mais favorável para os CCOs e quais as características podem ser utilizadas como marcadores para a capacidade de desenvolvimento *in vitro*. Esse conhecimento permitiria indicar mudanças, tanto *in vivo* como *in vitro*, que alterem o ambiente folicular oferecendo melhores condições para os CCOs e, com isso, melhorar os resultados da PIVE. Além disso, esse conhecimento também pode indicar quais parâmetros podem ser utilizados como marcadores para selecionar os melhores ovócitos. A melhor seleção de ovócitos, por sua vez, também resulta no aumento de produção de embriões PIV.

Um dos parâmetros mais importante a ser estudado no presente trabalho era a expressão genica em CC, não só por revelar diferenças entre CCOs mais e menos competentes, mas também por ser uma fonte importante para a identificação de marcadores que podem ser utilizados de forma não invasiva. A falta de repetibilidade dos inúmeros resultados relativos à identificação de marcadores de competência ovocitária em CC na literatura, nos levou a tentar esclarecer algumas questões antes de iniciar o experimento. Vários fatores podem afetar a expressão de genes nas CCs, mas no que se refere a maturação *in vitro*, fatores tais como os suplementos e a fonte proteica, podem ser importantes e afetar o resultado final. Sendo assim, foi necessário definir se a fonte proteica a ser utilizada poderia afetar o desenvolvimento do embrião e o perfil de transcritos em CCs. Para esclarecer esse ponto foi realizado um experimento comparando a expressão de genes em CC imaturas e maturadas de

CCOs maturados em diferentes fontes proteicas (SFB e BSA), o qual é apresentado no capítulo 2 deste documento. E, de fato os resultados mostraram que a FP pode afetar o desenvolvimento embrionário e que também influencia a quantidade de transcritos em CC, sendo necessário considerar esse parâmetro quando da prospecção de marcadores. Sendo assim, mostrou-se a importância dos métodos/sistemas de cultivo na avaliação de genes candidatos. Para evitar discrepâncias nos resultados e permitir uma comparação mais acertada, foi definido que seria utilizado o BSA como suplemento proteico no meio de MIV nos experimentos subsequentes. Outro resultado importante e de uso prático na PIVE, foi a constatação de que quando o cultivo embrionário é realizado na presença de BSA, a maturação pode ser realizada tanto em BSA quanto em soro sem que a taxa de embrião seja afetada.

No capítulo 3 foi então comparada a expressão de genes candidatos a competência em CC imaturas, CC maturadas e CG, assim como a quantidade de cfDNA e dosagem de hormônios esteroides no LF entre folículos que continham ovócitos mais ou menos competentes. Antes de entrar nos resultados propriamente ditos é importante ressaltar uma importante contribuição desse trabalho no que se refere a extração de cfDNA do líquido folicular. As amostras de líquido folicular, utilizadas neste estudo, eram obtidas individualmente de folículos de 5-6mm de diâmetro e o volume recuperado não era suficiente para ser utilizado em kits comerciais. Devido a isso, foi necessário adaptar outras metodologias de extração que são utilizadas rotineiramente. As adaptações foram realizadas com sucesso, mostramos que foi viável extrair cfDNA de amostras com pequeno volume, sem a utilização de kits comerciais e a baixíssimo custo. Outra consideração a ser feita é com relação as sequências utilizadas para avaliar o cfDNA, ART2 e BOVTA, usadas pela primeira vez em amostras de LF, mostrando ser viável para tal avaliação.

E, finalmente os resultados mais relevantes que se referem a expressão genica, que de todos os genes, o GHR, foi o que apresentou diferença nas CCs de ovócitos mais competentes, confirmando outros estudos inclusive do nosso grupo. Já as células da granulosa não foi observada diferença entre os grupos avaliados, o que provavelmente pode ser devido ao tamanho de folículo utilizado. É possível que se tivéssemos utilizado folículos em estágios mais avançado desenvolvimento, alguma diferença poderia ter sido observada. A dosagem de esteroides no LF também foi um resultado positivo neste estudo, onde foram confirmados resultados achados em

humanos, relacionando uma maior quantidade de estradiol no LF com uma melhor qualidade do ovócito e conseqüentemente melhor desenvolvimento embrionário.

Portanto, a quantidade de transcritos dos genes GHR e CASP3 nas CCs imaturas e maturadas, respectivamente, a quantificação de cfDNA com o uso do gene ART2 e a dosagem de estradiol e sua relação com a progesterona no líquido folicular são características que podem ser utilizadas para a seleção de ovócitos mais competentes em bovinos. Mas, estudos adicionais, que validem esses resultados encontrados, extrapolando para outros tamanhos de folículos, assim como diferentes graus de competência, são fundamentais para confirmar o uso dessas características bioquímicas na seleção de ovócitos de melhor qualidade.

# ANEXO 1

## PROTOCOLO EXTRAÇÃO RNA PARA CÉLULAS DO *CUMULUS* E CÉLULAS DA GRANULOSA Kit RNeasy® Plus Micro Kit (QIAGEN)

### Coleta Material de pequenas amostras

O material a ser submetido a avaliação de expressão de genes deverá estar armazenado sob congelamento (*freezer* -80 °C, -20 °C ou Nitrogênio líquido), em RNA later.

Transferir todo o conteúdo dos microtubos para um único microtubo, para formação de *pools*. Para isso:

- ↪ *Spin* 10 segundos nos microtubos com amostras, na rotação máxima da centrífuga, para recuperação do *pellet*.
- ↪ Retirar os microtubos da centrífuga e colocar em uma rack, no gelo;
- ↪ Transferir o conteúdo de todos os microtubos para um único;
- ↪ Lavar os microtubos com 7 µL de RNA later ou solução de lise – passar o mesmo volume em todos os microtubos que formarão o *pool*.

### Passo a passo do Kit

Todo o procedimento de bancada deve ser realizado em temperatura ambiente (20-25 °C). Não refrigerar a centrífuga a menos de 20 °C.

#### *Etapa 1:*

- Centrifugar o microtubo com a amostra – 6.250 rpm / 2 minutos.
- Retirar o sobrenadante, deixando o menor volume possível.

#### *Etapa 2:*

- Adicionar 75 µL de *Buffer RLT Plus* (amostras < 100.000 células).
  - ✓ Fazer o mais rápido possível, para evitar degradação;
  - ✓ Pipetar pelo menos 10 vezes, delicadamente, para soltar o *pellet* e as células fazerem contato com o tampão; a dissolução incompleta do *pellet* pode levar a uma lise ineficiente.

*Etapa 3:*

- Transferir o lisado para um tubo de 1,5 mL, aferir o volume da amostra e ajustar o volume final para 350  $\mu$ L com *Buffer RLT Plus*.
- Homogeneizar no vórtex por 1 minuto.

*Etapa 4:*

- Transferir o lisado homogeneizado para um tubo coletor (2 mL) com coluna *gDNA eliminator* (filtro, borda roxa), fornecido pelo kit.
  - ✓ Centrifugar por 30 segundos / 10.000 rpm;
  - ✓ Descartar a coluna e **guardar o filtrado**.

*Etapa 5:*

- Adicionar 1 volume de *Etanol 70%* ao filtrado – homogeneizar bem com a pipeta.

*Etapa 6:*

- Transferir o lisado homogeneizado, incluindo algum precipitado, para a coluna *RNeasy MinElute* (rosa), encaixada em outro tubo coletor (2 mL, sem tampa) – feche a tampa da coluna gentilmente.
  - ✓ Centrifugar por 15 segundos / 10.000 rpm;
  - ✓ **Descartar o filtrado**, reutilizar o tubo coletor e a coluna na etapa 7.

*Etapa 7:*

- Adicionar 700  $\mu$ L de *Buffer RW1* na coluna *RNeasy MinElute* – feche a tampa da coluna gentilmente.
  - ✓ Centrifugar por 15 segundos / 10.000 rpm;
  - ✓ **Descartar o filtrado**, reutilizar o tubo coletor e a coluna na etapa 8.

*Etapa 8:*

- Adicionar 500  $\mu$ L de *Buffer RPE* na coluna *RNeasy MinElute* – feche a tampa da coluna gentilmente.
  - ✓ Centrifugar por 15 segundos / 10.000 rpm;
  - ✓ **Descartar o filtrado**, reutilizar o tubo coletor e a coluna na etapa 9.

*Etapa 9:*

- Adicionar 500  $\mu$ L de *Etanol 80%* na coluna *RNeasy MinElute* – feche a tampa da coluna gentilmente.

- ✓ Centrifugar por 2 minutos / 10.000 rpm;
- ✓ **Descartar o filtrado e o tubo coletor**, reutilizar a coluna na etapa 10.

*Etapa 10:*

- Colocar a coluna *RNeasy MinElute* em um novo tubo coletor (2 mL).
  - ✓ Abrir a tampa da coluna e colocar na centrífuga em posição favorável ao sentido da rotação da centrifugação;
  - ✓ Centrifugar por 5 minutos / velocidade máxima (13.500 rpm);
  - ✓ **Descartar o filtrado e o tubo coletor**, reutilizar a coluna na etapa 11.

*Etapa 11:*

- Colocar a coluna *RNeasy MinElute* em um tubo de 1,5 mL – fornecido pelo kit.
  - ✓ Adicionar 14  $\mu$ L de *água RNase free* (kit), diretamente no centro da membrana da coluna;
  - ✓ Centrifugar por 1 minuto / velocidade máxima (13.500 rpm);
  - ✓ Medir (com pipetador) o volume de RNA eluído.

*Etapa 12:*

- Armazenar os microtubos com RNA eluído no freezer -80 °C, ou proceder à síntese de cDNA.

## ANEXO 2

### PROTOCOLO SÍNTESE DE cDNA GoScript Reverse Transcriptase (Promega)

Em um microtubo de 0,2 mL, adicionar:

**OBS.:** Condições considerando o *Volume final (Vf)* de 30  $\mu\text{L}$  de cDNA e *x  $\mu\text{L}$  de RNA eluído*. Lembrar-se de ajustar volumes para condições diferentes!

- Oligo dT (50  $\mu\text{M}$ ) 1  $\mu\text{L}$
- RNA x  $\mu\text{L}$
- Randon Primer 1  $\mu\text{L}$
- Água Nuclease-free (qsp 15  $\mu\text{L}$ ) x  $\mu\text{L}$

1. Incubar a 70 °C / 5 minutos, termociclador (conferir programa).
2. Ao terminar o ciclo no termociclador, incubar o microtubo com amostra em gelo por pelo menos 1 minuto.
3. *Spin* nas amostras e adicionar (dependendo do Vf, ajustar quantidades):
  - GoScript Buffer 5X 6  $\mu\text{L}$
  - $\text{MgCl}_2$  (25 mM) 6  $\mu\text{L}$
  - Nucleotide (10 mM) 1,5 $\mu\text{L}$
  - RNasin 0,5  $\mu\text{L}$
  - RT 1  $\mu\text{L}$
4. Incubar a 25 °C / 5 min , em seguida 42 °C / 1 hora e 70°C / 15 min, termociclador (conferir programa).
5. Ao finalizar o programa, armazenar a amostra a -20 °C.

## ANEXO 3

### PROTOCOLO PARA PREPARO DA REAÇÃO DE qPCR

**SEMPRE antes do início do procedimento:** Limpar o fluxo, a bancada e as micropipetas com álcool 70%. Utilizar somente ponteiras com filtro e microtubos estéreis, e luva sem talco.

#### ***Diluição dos primers***

Para o ESTOQUE a 100 pMoles/ µL: Multiplicar a quantidade de nMoles (indicado na especificação do *primer*) por 1000, para obter a quantidade em pMoles. Então, para diluição do estoque:

$$\begin{array}{rcl} 1 \mu\text{L} & \text{-----} & 100 \text{ pMoles} \\ X & \text{-----} & \text{Quantidade indicada no primer (pMoles)} \end{array}$$

Para o USO (solução de trabalho): diluir o estoque 10 vezes – 5 µL de primer estoque a 100 pMoles + 95 µl de água MilliQ ou Nuclease free. Concentração final da solução de trabalho = 5.000 nM.

#### ***Preparo do Mix para qPCR***

1. Calcular a quantidade de poços/reações que serão utilizados (n):

$n = (\text{amostras} \times \text{diluições} \times \text{réplicas}) + \text{controle negativo (N)} + 10\%$  (segurança p/viés de pipetagem).

*Exemplo:*  $n = [1 \text{ diluição} \times 3 \text{ amostras (cDNA de 0,5 embrião, 1 embrião, 2 embriões)} \times 3 \text{ (triplicatas)}] + 1 \text{ (N)} + 10\%$  (viés da pipetagem) = 10,1.

2. Fazer o mix para cada gene:

REAGENTE	QUANTIDADE (x n)	Quantidade Final (ex:)
GoTaq MasterMix (Fast) – metade do Vf da reação	12,5 µL	126,25 µL
Primer F (300 nM)	1,5 µL	15,15 µL
Primer R (300 nM)	1,5 µL	15,15 µL
Água Nuclease free (qsp 24 µL)	8,5 µL	85,85 µL

3. Ligar o computador do equipamento de qPCR, desenhar a placa no software (fazer uma cópia impressa ou anotada para distribuir as amostras na placa).
4. Pipetar 24  $\mu\text{L}$  do Mix, por poço (dentro do fluxo);
5. Em seguida, fora do fluxo, acrescentar 1  $\mu\text{L}$  de cDNA de cada amostra.
6. Selar a placa e centrifugar rapidamente (*spin*). Colocar a placa no equipamento de qPCR e
7. Iniciar o programa.