



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

TAMIRES KORCHOVEI SANCHES

**ANÁLISE DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES NO
MICROAMBIENTE FOLICULAR DE ACORDO COM A
PRESENÇA DO CORPO LÚTEO EM VACAS LEITEIRAS**

Londrina
2020

TAMIRES KORCHOVEI SANCHES

**ANÁLISE DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES NO
MICROAMBIENTE FOLICULAR DE ACORDO COM A
PRESENÇA DO CORPO LÚTEO EM VACAS LEITEIRAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda

Londrina
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

S211a Sanches, Tamires Korchovei..
Análise das vesículas extracelulares no microambiente folicular de acordo com a presença do corpo lúteo em vacas leiteiras / Tamires Korchovei. Sanches. - Londrina, 2020.
49 f. : il.

Orientador: Marcelo Marcondes Seneda.
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2020.
Inclui bibliografia.

1. Bovino - Tese. 2. Vesículas extracelulares - Tese. 3. Corpo lúteo - Tese. 4. Gravidez em animais - Tese. I. Seneda, Marcelo Marcondes . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 63

TAMIRES KORCHOVEI SANCHES

**ANÁLISE DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES NO
MICROAMBIENTE FOLICULAR DE ACORDO COM A
PRESENÇA DO CORPO LÚTEO EM VACAS LEITEIRAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Marcelo Marcondes Seneda
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Amanda Fonseca Zangirolamo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Fábio Morotti
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 09 de abril de 2020

O presente trabalho foi realizado junto ao Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (REPROA), Departamento de Clínicas Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (Área de Concentração: Produção Animal), sob orientação do Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto a:

- 1. CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior / MEC.**
- 2. CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.**
- 3. INCT-Leite: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para a Cadeia Produtiva do Leite.**

DEDICATÓRIA

À Deus por iluminar meus passos.

À minha família por todo apoio.

A todos do laboratório ReproA pelo acolhimento e companheirismo.

AGRADECIMENTO (S)

Agradeço a Deus por estar presente em minha vida, iluminando meu caminho, e o preenchendo com pessoas queridas, grandes oportunidades, excelentes aprendizados e novas conquistas. Sem Ele não somos nada.

Agradeço aos meus pais Rosa e Henrique, por me inspirar a ser uma pessoa digna e responsável, agradeço por sempre me apoiarem e por torcer pelo meu crescimento profissional.

Aos meus irmãos Bruna Elena, Fernando Henrique, e Helloisa, que me ensinaram a dividir e admirar as conquistas do outro.

Aos meus avós Henrique e Maria, por dedicarem seu tempo à mim ensinando-me as coisas simples e importantes da vida.

Gostaria de expressar imensa gratidão ao meu professor orientador Marcelo Seneda por me acolher em sua equipe de trabalho, compartilhar seu conhecimento com dedicação e preocupação em promover o crescimento profissional e pessoal para todos de sua equipe. Agradeço por estar presente em todas as etapas deste projeto, não medindo esforços para que isso fosse possível, além de me proporcionar oportunidades únicas de aprendizado. Obrigada por ser fonte de inspiração, e um líder admirável.

Agradeço ao professor Fábio Morotti, por sempre estar disposto a discutir novas idéias, e também por dedicar seu tempo para auxiliar na condução deste trabalho.

Com todo carinho, gostaria de agradecer a Amanda Zangirolamo por sua amizade sincera e apoio incondicional desde que cheguei ao laboratório.

Obrigada ao querido Emanuel Binotto, por todo esforço, dedicação e comprometimento em tornar este projeto uma realidade.

Agradeço a todos que se envolveram diretamente neste trabalho: Denis, Francieli, Suellen, Nathália, Eduardo, Ana Clara, Rosane e Angélica. Obrigada por aceitarem este desafio com tanta dedicação.

Aos Professores Juliano C. da Silveira e Marcos R. Chiaratti, por todo o conhecimento compartilhado e pela parceria para que esse projeto pudesse ser desenvolvido com maior produção de informações.

Obrigada aos proprietários da fazenda D'água Verde, sr. Jan Solomons e sra. Marika Solomons, por permitirem que este estudo fosse realizado em sua propriedade.

Por fim, gostaria de agradecer a todos da equipe ReproA pelo companheirismo desses últimos anos. Obrigada por tornarem nossa equipe única e admirável.

SANCHES, Tamires Korchovei. **Análise das vesículas extracelulares no microambiente folicular de acordo com a presença do corpo lúteo em vacas leiteiras**. 2020. 49 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

RESUMO

Recentemente, descobriu-se que as vesículas extracelulares (VEs), presentes no fluido dos folículos ovarianos são uma importante forma de comunicação celular, com funções biológicas diversificadas. O presente estudo teve como objetivo analisar as VEs recuperadas do fluido folicular de ovários ipsilaterais e contralaterais ao corpo lúteo (CL), em fêmeas bovinas da raça holandesa (*Bos taurus taurus*) em dois momentos distintos: antes e após a IATF, de acordo com o “status” gestacional. Foram utilizadas 10 vacas holandesas de uma propriedade produtora de leite, da cidade de Arapoti-Paraná. O fluido folicular foi colhido através da técnica de *ovum pick-up* (OPU) de vacas lactantes, com 30 dias pós-parto, aptas a reprodução. Em seguida foram submetidas a IATF (inseminação artificial em tempo fixo). O tratamento hormonal utilizado foi a base de P4 e estradiol. A IATF foi realizada utilizando sêmen de um mesmo touro para o grupo de fêmeas deste estudo. Após cerca de 60 dias da IATF, a OPU foi realizada em fêmeas prenhes (N=5) e não prenhes (N=4). As amostras de fluido folicular foram direcionadas para isolamento e análise por sequenciamento de nanopartículas pelo Nanosigth (NS300; NTA 3.1 Build 3.1.45; Malvern). As variáveis concentração (VEs/mL) e diâmetro (nm) das VEs foram analisadas pelo teste T de Student ou teste Mann-Whitney com significância de $p \leq 0,05$. O fluido folicular proveniente de fêmeas prenhes e não prenhes contralateral ao CL apresentou maior concentração de VEs ($\leq 200\text{nm}$) quando comparado as amostras obtidas ipsilateral ao CL ($2,7 \times 10^{10}$ VEs/mL vs. $1,07 \times 10^{10}$ VEs/mL; $p=0,013$) dos mesmos animais. Quando analisamos o grupo de fêmeas não prenhes (N=3) separadamente, a concentração de VEs é maior para contralateral ($3,12 \times 10^{10}$ VEs/mL) se comparado com o ipsilateral ($6,38 \times 10^9$ VEs/mL) ao CL ($p=0,024$). Porém, quando avaliamos o mesmo grupo (ipsilateral vs. contralateral) para as fêmeas prenhes (N=3), não foi possível observar diferença para a concentração de VEs ($p=0,663$). Para a avaliação entre CL ipsilateral (prenhe) vs. ipsilateral (não prenhe), as fêmeas prenhes apresentaram maior concentração de VEs ($1,50 \times 10^{10}$ VEs/mL) em relação as fêmeas não prenhes ($6,38 \times 10^9$ VEs/mL; $p=0,016$). Não houve diferença entre as demais comparações realizadas e para a média do diâmetro das VEs. Em nosso estudo, foi possível concluir que a presença ou ausência de CL, bem como o “status” gestacional da fêmea, influencia no número de VEs presentes no fluido dos folículos adjacentes.

Palavras-chave: vesículas extracelulares; corpo lúteo; gestação; líquido folicular; *Bos taurus taurus*.

SANCHES, Tamires Korchovei. **Analysis of extracellular vesicles in the follicular microenvironment according to the presence of the corpus luteum in dairy cows.** 2020. 49 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

Recently, it was discovered that extracellular vesicles (EVs), present in the fluid of ovarian follicles are an important form of cellular communication, with diverse biological functions. The present study aimed to analyze the EVs recovered from the follicular fluid of “ipsilateral” (same side) and “contralateral” (opposite side) of the corpus luteum (CL) in Holstein cows (*Bos taurus taurus*) at two different times: before and after timed artificial insemination (TAI), according to the gestational status. Ten cows from a dairy farm in Arapoti-Paraná were used. The follicular fluid was collected using the ovum pick-up technique (OPU), of the lactating Holstein cows, 30 days postpartum, ready for reproduction, and then were submitted to TAI. The hormonal treatment used on the property was based on P4 and estradiol. The TAI was performed using semen from the same bull for all females in this study. After about 60 days from the TAI, the OPU was performed in pregnant (N=5) and non-pregnant (N=4) females. The follicular fluid samples, collected were directed to isolation and Nanoparticle tracking analysis by Nanosight (NS300; NTA 3.1 Build 3.1.45; Malvern). The concentration (EVs/mL) and diameter (nm) of the VEs were analyzed by Student's T test or Mann-Whitney test with significance of $p \leq 0.05$. The follicular fluid of pregnant and non-pregnant females from the ovarian opposite the CL presented higher concentration of EVs ($\leq 200\text{nm}$) when compared to ovarian samples with CL (2.7×10^{10} EVs/mL vs. 1.07×10^{10} EVs/ml; $p=0.013$) from the animals. When we analyzed the group of nonpregnant females (N=3) separately, the nanoparticle concentration is higher for “contralateral” follicular fluid (3.12×10^{10} EVs/mL) compared to the “ipsilateral” (6.38×10^9 EVs/mL) follicular fluid ($p=0.024$). However, when evaluating the same group (“contralateral vs. “ipsilateral”) for pregnant females (N=3) was not observed difference in the concentration of EVs ($p=0.663$). The evaluation between “ipsilateral” (pregnant) vs. “ipsilateral” (non-pregnant) on the pregnant females had greater concentration EVs ($1,50 \times 10^{10}$ EVs/mL) compared to non-pregnant females ($6,38 \times 10^9$ EVs/mL; $p=0.016$). There was no difference between the others comparisons made and for the mean EVs diameter. In our study, it was possible to conclude that the presence or absence of CL, as well as its gestational status influences the number of EVs present in the fluid of adjacent follicles.

Key words: extracellular vesicles; corpus luteum; gestation; follicular fluid; *Bos taurus taurus*.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Esquema simplificado da oogênese e foliculogênese..... | 17 |
| Figura 2 – Vesículas extracelulares liberadas no antro folicular (imagem ampliada) | 22 |
| Figura 3 – Esquema representativo da colheita de fluido folicular..... | 36 |
| Figura 4 – Esquema representativo do delineamento experimental e tratamento hormonal para IATF | 37 |
| Figura 5 – Imagem ultrassonográfica em modo Color-Doppler (SV6, SonoScape, China) de área de vascularização do CL em fêmea bovina | 39 |
| Figura 6 – Concentração média de VEs ($\times 10^{10}/\text{mL}$) ipsilateral vs. contralateral ao CL independente do “status” gestacional e momento da colheita das amostras | 41 |
| Figura 7 – Análise da concentração média de VEs ($\times 10^{10}/\text{mL}$) ipsilateral vs. contralateral ao CL de vacas não prenhes não prenhes (A) e prenhes (B) | 42 |
| Figura 8 – Concentração média de VEs ($\times 10^{10}/\text{mL}$) presentes no fluido folicular contralateral ao CL de vacas prenhes vs. contralateral ao CL de vacas não prenhes (A), e ipsilateral ao CL de vacas prenhes vs. ipsilateral ao CL de vacas não prenhes (B)..... | 43 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------------|--------------------------------------|
| CL | Corpo Lúteo |
| COC's | Complexo Cumulus-Oócito |
| eCG | Gonadotrofina Coriônica equina |
| FSH | Hormônio Folículo Estimulante |
| g | Gramas |
| GnRH | Hormônio Liberador de Gonadotrofina |
| IA | Inseminação Artificial |
| IATF | Inseminação Artificial em Tempo Fixo |
| IGF | Fator de Crescimento Insulínico |
| LH | Hormônio Luteinizante |
| mg | Miligramas |
| miRNA | MicroRNA |
| mL | Mililitros |
| mm | Microlitros |
| mRNA | RNA mensageiro |
| nm | Nanomêtros |
| OPU | <i>Ovum pick up</i> |
| PGFE | Prostaglandina E |
| PGF2 α | Prostaglandina F2alfa |
| UI | Unidades Internacionais |
| VEs | Vesículas Extracelulares |
| μ L | Microlitros |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 12 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 14 |
| 2.1 | CICLO ESTRAL E DINÂMICA FOLICULAR | 14 |
| 2.1.1 | Oogênese e Foliculogênese | 15 |
| 2.1.2 | Recrutamento..... | 17 |
| 2.1.3 | Seleção..... | 17 |
| 2.1.4 | Dominância Folicular | 18 |
| 2.1.4 | Ovulação e Formação do Corpo Lúteo..... | 18 |
| 2.1.5 | Atresia Folicular | 19 |
| 2.2 | MICROAMBIENTE FOLICULAR | 20 |
| 2.2.1 | Vesículas Extracelulares (VEs)..... | 21 |
| 2.2.2 | Influência da Progesterona no Microambiente Folicular | 23 |
| | REFERÊNCIAS | 24 |
| 3 | HIPÓTESE | 31 |
| 4 | OBJETIVOS | 31 |
| 4.1 | OBJETIVO GERAL | 31 |
| 4.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 31 |
| 5 | ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO | 32 |
| 5.1 | INTRODUÇÃO..... | 34 |
| 5.2 | MATERIAL E MÉTODOS | 36 |
| 5.2.1 | Localização, Manejo Dos Animais E Alimentação..... | 36 |
| 5.2.2 | Colheita Das Amostras | 36 |
| 5.2.3 | Isolamento Das Pequenas Vesículas Extracelulares Do Líquido Folicular | 39 |
| 5.2.4 | Análise Por Rastreamento De Nanopartículas | 40 |
| 5.2.5 | Análise Estatística | 40 |
| 5.3 | RESULTADOS | 40 |
| 5.4 | DISCUSSÃO..... | 43 |
| 6 | CONCLUSÃO | 46 |
| 7 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 46 |
| | REFERÊNCIAS | 48 |

1 INTRODUÇÃO

Até pouco tempo atrás, a seleção genética em vacas leiteiras era voltada, quase que exclusivamente, para as características de qualidade e produção de leite e poucos países se preocupavam com as características funcionais dos animais e índices de fertilidade, como intervalo entre partos, taxa de serviço, taxa de concepção, dentre outros (MIGLIOR et al., 2005; GARNSWORTHY et al., 2008). Como esperado, a capacidade de produção de leite dos rebanhos atuais aumentou consideravelmente, por outro lado os índices de fertilidade foram negligenciados (MIGLIOR et al., 2017), ocasionando em baixas taxas de prenhez e maior intervalo entre partos, provocando perdas econômicas ao produtor (BERGAMASCHI et al., 2010).

Sendo assim, a reprodução se tornou um dos maiores desafios enfrentados pelo setor leiteiro que vem buscando alternativas para aumentar o desempenho reprodutivo dessas fêmeas. Nesse contexto, as biotécnicas reprodutivas são bem aceitas como alternativas para ultrapassar este desafio, a produção de embriões *in vitro* (PIVE), por exemplo, consegue multiplicar animais de alto valor genético para produção e fertilidade (HANSEN, 2014).

Ao longo do tempo, as biotécnicas reprodutivas vêm sendo aperfeiçoadas. Diversos pesquisadores têm investido em estudos para possibilitar o melhor desempenho das técnicas de reprodução assistida de maneira aplicada (RIZOS et al., 2002a; WATANABE et al., 2017; CAVALIERI et al., 2018). Como sabemos a produção de embriões *in vivo* é superior em qualidade aquela obtida pela PIVE (RIZOS et al., 2002a), todavia não é possível simular de forma precisa o ambiente e os eventos que envolvem a foliculogênese e a embriogênese. Os estudos que buscam compreender a fisiologia do desenvolvimento dos oócitos e embriões estão crescendo e assim permitem a criação de novas ferramentas que buscam contribuir para melhorar os índices obtidos pela PIVE.

Na tentativa de compreender melhor os eventos fisiológicos que ocorrem durante o ciclo estral bovino e que impactam em grande parte no sucesso da produção embrionária, diversos grupos de pesquisa têm buscado analisar o microambiente folicular, e dessa maneira, avaliar a comunicação intercelular e coordenação dos eventos que promovem a competência e maturação de oócitos aptos a serem fecundados, capazes de promoverem uma gestação e o nascimento de um indivíduo

saudável (KNIGHT e GLISTER, 2006; SIRARD et al., 2006; DA SILVEIRA et al., 2012; DE ÁVILA et al., 2019).

Recentemente, descobriu-se que as vesículas extracelulares (VEs), presentes no fluido dos folículos ovarianos são uma importante forma de comunicação celular, têm funções biológicas diversificadas (MATHIVANAN et al., 2010). Tais partículas são classificadas de acordo com seu tamanho, forma, proteínas da membrana, lipídios estruturais e célula de origem (TAYLOR e GERCEL-TAYLOR, 2013). As VEs são formadas a partir da brotação interna das membranas endossômicas, produzindo os corpos multivesiculares no interior das células, onde em seguida essas vesículas se fundem com a membrana plasmática celular e são liberadas no espaço intercelular (KOWAL et al., 2014).

As VEs transportam, através dos tecidos, mensageiros importantes como proteínas, miRNA e mRNA que serão transferidos para as células-alvo (TAYLOR e GERCEL-TAYLOR, 2013; DI PIETRO, 2016). Atuam coordenando mecanismos fisiológicos e patológicos em diversos tecidos (QUESENBERRY e ALIOTTA, 2010; RATAJCZAK et al., 2012). Além disso, demais estudos observaram que o conteúdo de miRNA sofre alteração de acordo com o período do ciclo estral (DE ÁVILA et al., 2019), e durante o desenvolvimento do folículo antral, exercendo influência sobre a maturação oocitária, proliferação celular e expansão das células do cumulus (NAVAKANITWORAKUL et al., 2016).

Dessa forma, torna-se interessante conduzir estudos que possam ajudar na compreensão da função exercida pelas VEs provenientes do fluido folicular, e qual seu real impacto no desenvolvimento de oócitos sobre diferentes perspectivas fisiológicas, como a influência do ciclo estral na modulação dessas estruturas. Por isso, este estudo visa gerar informações sobre o microambiente folicular, com o intuito de que possa ser promovida a otimização do uso das técnicas reprodutivas para o rebanho de gado leite.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CICLO ESTRAL E DINÂMICA FOLICULAR

O ciclo estral bovino, iniciado logo após a puberdade da fêmea, tem duração média de 21 dias. Durante esse período, os folículos se desenvolvem em padrões de ondas, controlados pela interação entre as gonadotrofinas, fatores de crescimento e substâncias intraovarianas, sendo um processo dinâmico conciliado ao crescimento e regressão dos folículos e do corpo lúteo (CL; FORTUNE, 1994; AUSTIN et al., 2001; SARTORI et al., 2017).

A dinâmica folicular na espécie bovina foi melhor compreendida e caracterizada após estudos desenvolvidos com o uso da ultrassonografia. Desde então, sabe-se que o desenvolvimento folicular se apresenta em um padrão de duas (GINTHER et al., 1989; FIGUEIREDO et al., 1997) ou três (CASTILHO et al., 2005) ondas de crescimento durante o ciclo estral.

A variação no número de ondas de crescimento folicular é influenciada pelas subespécies bovinas. Normalmente em *Bos taurus* são manifestadas duas ondas e nas fêmeas *Bos indicus* três ondas (GINTHER et al., 1989; FIGUEIREDO et al., 1997). Além disso, fatores intrínsecos à fêmea como nutrição, condição corporal, lactação, idade, raça e ambiente também podem modular o número de ondas foliculares por ciclo estral (GINTHER et al., 1996).

O início de uma onda do ciclo estral é caracterizado pelo crescimento de um grupo de folículos antrais ≥ 5 mm de diâmetro em resposta ao aumento temporário do hormônio folículo estimulante (FSH; ADAMS et al., 1992). A segunda onda inicia-se normalmente no 9º ou 10º dia do ciclo em animais com duas ondas de desenvolvimento folicular, enquanto o CL entra em regressão a partir do 16º dia. Já em animais que apresentam três ondas a segunda emerge no 8º ou 9º dia e a terceira no 15º ou 16º dia do ciclo estral, e por volta do 19º dia o CL começa a regredir (ADAMS et al., 2008).

Um dos folículos antrais em crescimento é selecionado e passa a exercer dominância sobre os demais. Nessa fase, o folículo dominante sobrevive as baixas concentrações de FSH por apresentar receptores de hormônio luteinizante (LH) nas células da granulosa (BAO e GARVERICK, 1998; GINTHER et al., 1989 e 1996).

A transição do folículo dominante pela dependência de gonadotrofinas, do FSH para o LH, normalmente acontece quando o mesmo apresenta cerca de 8 mm de diâmetro (MIHM et al. 2006; MELLO et al., 2014).

No período pré-ovulatório ou fase folicular (em animais cíclicos), a frequência de pulso do LH aumenta para um pulso por hora que estimula a maturação final do oócito, o aumento das concentrações de estradiol e o feedback positivo do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), provocando a indução da ovulação. O folículo dominante pode sofrer atresia se houver concentrações elevadas de progesterona (P4; fase lútea em animais cíclicos) que conseqüentemente mantém a frequência de pulso do LH a cada 4 horas (BODENSTEINER et al., 1996).

Além disso, pouco antes da ovulação, a luteogênese se inicia promovendo as mudanças morfológicas, endócrinas e enzimáticas que ocorrem no folículo ovulatório até que se transforme em CL capaz de secretar grandes quantidades de P4 (SMITH et al., 1999).

Em resumo, o ciclo estral bovino e a dinâmica folicular compreendem o crescimento, regressão dos folículos, e desenvolvimento de um folículo pré-ovulatório em um padrão de ondas de crescimento folicular, além de formar o CL (LUCY et al., 1992). Os folículos presentes na dinâmica folicular, são formados na fase fetal por meio de dois processos: oogênese e foliculogênese, assim, ao nascimento as fêmeas já possuem um estoque folicular definido que será aproveitado ao longo de sua vida reprodutiva (SAUMANDE, 1991).

2.1.1 Oogênese e Foliculogênese

O desenvolvimento de oócitos e folículos tem início na fase fetal e leva cerca de seis meses para ser finalizado (LUSSIER et al 1987). As células germinativas primordiais, originadas no endoderma embrionário, proliferam por mitoses para formar os oócitos primários. Os folículos primordiais serão formados em seguida, e apresentam uma camada única de células da granulosa (pavimentosa) ao redor do oócito, cercada por uma membrana basal, sendo estas as primeiras formações das células foliculares ou também chamadas de pré-granulosa (ERICKSON, 1966). Após a formação dos folículos primordiais as células pré-granulosa param de proliferar e permanecem em repouso até sofrerem estímulo para o crescimento (ERICKSON, 1966).

O estímulo ao desenvolvimento dos folículos primordiais ocorre em um período conhecido como ativação folicular, onde os mesmos deixam o “pool” de reserva dos folículos quiescentes para entrar no “pool” de crescimento, que compreende os estágios de transição, primário, secundário, terciário e pré-ovulatório (RUSSE, 1983). Uma vez que os folículos primordiais entram na fase de ativação do crescimento, não é possível reverter este processo, dessa forma, o tamanho do “pool” de folículos primordiais que são estimulados a crescerem está relacionado com a fertilidade e vida útil reprodutiva do animal (YANG e FORTUNE, 2008).

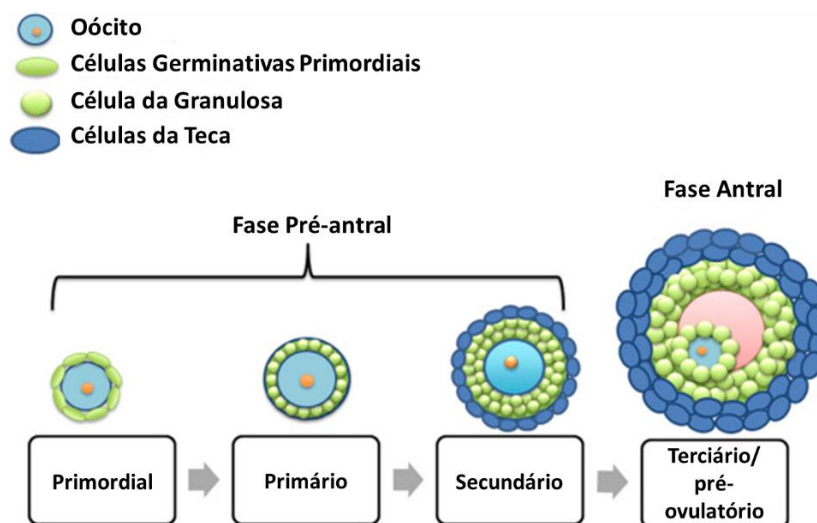
Sendo assim, o desenvolvimento folicular pode ser dividido em duas fases, a primeira delas é a fase pré-antral, que compreende a formação e início do crescimento e ativação dos folículos primordiais e crescimento dos folículos primários e secundários. A segunda fase é chamada de fase antral, caracterizada pela formação da cavidade e presença do fluido folicular em folículos terciários e pré-ovulatórios (BRAWTAL e YOSSEFI, 1997).

Durante a ativação folicular, ocorrem as modificações morfológicas das células da granulosa que passam de pavimentosas para cuboidais, a proliferação celular é retomada (VAN DEN HURK et al., 1997) e os oócitos iniciam o crescimento. Este processo é regulado por diversos fatores e mecanismos que ainda são pouco conhecidos. As alterações na morfologia folicular acontecem concomitante ao crescimento do oócito (BRISTOL-GOULD e WOODRUFF, 2006).

Em seguida os folículos primordiais passam pela fase de transição, onde adquirem gradualmente células da granulosa cuboidais ao redor do oócito formando assim os folículos primários (BRAWTAL e YOSSEFI, 1997). Os folículos secundários adicionam uma segunda camada completa de células da granulosa, além de iniciar a formação da camada externa de células da teca e da zona pelúcida (BRAWTAL e YOSSEFI, 1997; FIGUEIREDO et al., 1997).

Posteriormente, são formados os folículos terciários e pré-ovulatórios, caracterizados por um oócito envolto pela zona pelúcida, início da formação das células do *cumulus* e do antro folicular. Este último se torna repleto de líquido folicular, além de apresentar várias camadas de células da granulosa, recobertas por duas camadas de células tecais: interna e externa (FAIR et al., 1997). As etapas envolvidas na formação dos oócitos e folículos estão representadas na figura 1.

Figura 1 – Esquema simplificado da oogênese e foliculogênese



Fonte: Adaptado de GREEN e SHIKANOV, 2016.

2.1.2 Recrutamento

O período de desenvolvimento folicular pode ser subdividido em recrutamento, seleção e dominância, seguido de ovulação ou atresia do folículo dominante (LUCY et al., 1992). A fase de recrutamento pode compreender a ativação de um grupo de folículos primordiais com oócito quiescente e também a entrada do folículo na onda de crescimento (ADAMS et al., 1992). O FSH é considerado um fator chave que atua nesta primeira etapa, promovendo o crescimento comum dos folículos antrais por cerca de três dias (GINTHER et al., 2001).

2.1.3 Seleção

Durante cada onda de crescimento estral, os folículos recrutados, entram na fase de seleção, pela qual geralmente um único folículo será selecionado e se tornará dominante no caso de espécies monovulatórias. Enquanto os demais folículos chamados de subordinados são selecionados para entrar em regressão (GINTHER et al., 2001). Os próprios folículos antrais em crescimento produzem estradiol e inibina, que por sua vez, são responsáveis por suprimir a liberação de FSH, por isso, estes folículos que ainda são dependentes desta gonadotrofina para continuar se desenvolvendo sofrem atresia (ADAMS et al., 1992).

2.1.4 Dominância Folicular

Após os folículos antrais crescerem por aproximadamente 3 dias, sob o estímulo de FSH, ocorre a diferenciação entre o futuro folículo dominante, quando este atinge cerca de 8,5 mm de diâmetro, e os demais folículos subordinados. Ginther e colaboradores chamaram este momento de “desvio” onde o maior folículo da onda continua se desenvolvendo até sua maturação e ovulação, enquanto os folículos subordinados entram em regressão (GINTHER et al., 1996). Antes do desvio, todos os folículos antrais em crescimento apresentam capacidade de se tornarem folículo dominante (GIBBONS et al., 1997).

Após o desvio, o folículo dominante inibe, de forma primária a secreção de FSH, impedindo o crescimento dos folículos menores dependentes deste último hormônio, (MIHM et al., 2006). A capacidade de sobrevivência do folículo dominante aos níveis basais de FSH, na espécie bovina, é atribuída a aquisição de receptores de hormônio luteinizante (LH), assim, o crescimento do folículo dominante deixa de ser dependente do FSH e passa a ser dependente de LH (FORTUNE et al., 2001; MIHM et al., 2006; BURATINI Jr., 2007).

2.1.4 Ovulação e Formação do Corpo Lúteo

Na última onda de crescimento folicular do ciclo estral, o folículo dominante se desenvolve em um ambiente com baixas concentrações de P4 circulante, pois o CL, oriundo da ovulação anterior, entra em processo de regressão. A queda dos níveis de P4 associada ao aumento da concentração de estradiol, que por um mecanismo de *feedback* positivo provoca a secreção do GnRH pelo hipotálamo, promove a liberação de pulsos de LH pela hipófise, viabilizando a ovulação (FORTUNE, 1994).

O LH é responsável pela maturação do oócito e sua expulsão para o espaço periovariano. Além de estimular a produção da prostaglandina E (PGE) necessária para o rompimento do folículo, o LH também atua na luteinização das células granulosas e tecais (SMITH et al., 1994; FILION et al., 2001). No processo de maturação, as células do *cumulus* sofrem expansão por intermédio do ácido hialurônico, e o oócito primário conclui sua primeira divisão meiótica liberando o primeiro corpúsculo polar, tornando-se um oócito secundário após o pico de LH. Dessa forma o oócito é capaz de ser fecundado e concluir a meiose (FILION et al., 2001).

Após a ovulação, o espaço anteriormente ocupado pelo folículo ovulatório é preenchido por sangue, linfa e células da teca interna, da granulosa, do sistema imune, dentre outras (ACOSTA E MIYAMOTO, 2004). Esse conjunto de células formam o chamado corpo hemorrágico que se reorganizam para a formação do CL, o qual passa a sintetizar P4 (VOSS e FORTUNE, 1993; BERTAN et al., 2006; SALES e ARAÚJO, 2010).

Durante a fase luteal o CL sofre hiperplasia e hipertrofia, sendo que o volume da célula luteal funcional chega a ser 50 vezes maior que o volume apresentado pela célula da granulosa antes do pico de LH (WILTBANK et al., 2002). A formação do CL é realizada sob a influência de diversos fatores angiogênicos e mitogênicos, para a garantir a adequada secreção de P4, e conseqüentemente evitar a ocorrência de pulsos de LH, impedindo uma nova ovulação. A funcionalidade do CL costuma durar até o 17º dia do ciclo estral na ausência de substâncias sinalizadoras do reconhecimento materno-fetal. A lise do CL é induzida quando o endométrio libera a prostaglandina F2 α (PGF2 α), e devido à queda das concentrações de P4, a pulsatilidade do LH é retomada, permitindo uma nova ovulação (MORAES et al., 2001).

2.1.5 Atresia Folicular

Durante as ondas de crescimento do ciclo estral o folículo dominante bloqueia o desenvolvimento dos folículos menores provocando a atresia dos mesmos. Até mesmo os folículos que se tornam dominantes sofrem atresia quando crescem em ondas com CL ativo e elevada concentração de P4, onde são impedidos de chegar à ovulação devido ao bloqueio dos pulsos de LH (GINTHER et al., 2003).

A atresia é considerada um processo degenerativo ou apoptótico, que pode acometer qualquer estágio de desenvolvimento folicular, porém, é predominante durante a fase antral (MAGALHÃES et al., 2009). A partir de um estímulo fisiológico ou lesão em determinado tecido ou célula, a expressão de genes pró-apoptóticos e anti-apoptóticos entram em desequilíbrio, levando a ativação de uma cascata de eventos que provocam a programação da morte celular, denominada apoptose (HUGHES e GOROSPE, 1991; MAGALHÃES et al., 2009; WONG, 2011). Os estímulos que estão envolvidos na ativação da atresia folicular são diversos, como idade, nutrição, fatores endócrinos como LH e FSH e fatores parácrinos também influenciam no processo de morte celular (MAGALHÃES et al., 2009).

Em folículos pré-antrais a apoptose tem início no oócito, é pouco observada nas células da granulosa e se caracteriza normalmente pela retração da cromatina nuclear e fragmentação oocitária. Diferentemente nos folículos antrais, onde o oócito apresenta maior resistência, a apoptose acomete primeiramente as células da granulosa que passam a apresentar núcleo picnótico, condensação da cromatina e retração nuclear. Conforme a atresia folicular antral avança o número de camadas de células da granulosa diminui, e nos estágios finais, o oócito sofre pseudomaturação e evolui para a fragmentação (HUGHES e GOROSPE, 1991; MORITA e TILLY, 1999; MATSUDA et al., 2012).

Dessa forma, entende-se que as diferentes fases do ciclo estral expõem os folículos à variações hormonais e a presença de diferentes fatores de crescimento, que podem modificar a relação entre fatores anti e pró-apoptóticos e assim, determinar a continuidade do desenvolvimento ou a ocorrência da atresia no folículo, além de afetar a competência oocitária (WIT et al., 2000).

2.2 MICROAMBIENTE FOLICULAR

O microambiente folicular é construído ao longo de toda a foliculogênese, e envolve, múltiplas interações ovarianas, comunicação bidirecional entre célula-oócito, e interações endócrinas. A formação de um microambiente ideal para o desenvolvimento de oócitos é importante para que os mesmos sejam capazes de serem maturados, ovulados, fecundados, além de gerar um embrião viável e um indivíduo saudável (KNIGHT e GLISTER, 2006; SIRARD et al., 2006).

Nos estágios finais da foliculogênese, ocorre a formação da cavidade antral, que é preenchida com um exsudado denominado fluido folicular. Essa característica permite o isolamento do complexo *cumulus* oócito (COC's) das células da granulosa mural, essenciais para a esteroidogênese e ovulação, enquanto as células do *cumulus* estão intimamente ligadas a aquisição da competência oocitária em conjunto com o fluido folicular (HENNET e COMBELLES, 2012).

O oócito passa por diversas modificações para atingir a “competência”, incluindo a maturação meiótica, citoplasmática e molecular (SIRARD et al., 2006). A maturação meiótica compreende a progressão do oócito, estagnado em prófase I, para o estágio de metáfase II da meiose, após o pico de LH ou após a punção do folículo ovariano (CONTI et al., 2012). A maturação citoplasmática envolve a redistribuição de organelas,

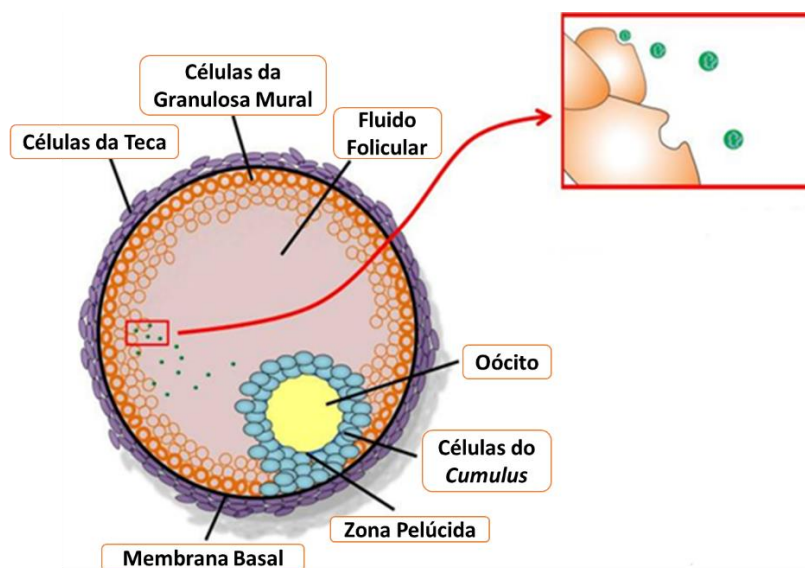
modificações morfológicas e bioquímicas, além de promover o acúmulo de RNAs, proteínas, substratos e demais nutrientes no citoplasma, que serão importantes para a fecundação do oócito posterior desenvolvimento embrionário (WATSON, 2007). A maturação molecular oocitária não possui uma definição bem estabelecida, mas envolve a preparação do núcleo para suportar a ativação genômica do embrião (SIRARD et al., 2006).

A preparação do oócito para a ovulação é extremamente importante para suportar o desenvolvimento embrionário precoce. Tais modificações, assim como a interação entre células somáticas e oócito, são controladas por complexos processos do ambiente intrafolicular que impactam na qualidade oocitária (CHAPPEL, 2013).

2.2.1 Vesículas Extracelulares (VEs)

A interação entre células somáticas e o oócito no microambiente folicular é guiada pelas redes endócrinas, parácrinas e autócrinas que facilitam a troca de informações entre oócitos, células do cumulus e da granulosa mural (RODGERS E IRVING-RODGERS, 2010). Existem diversas formas de comunicação celular e, recentemente, foram encontradas VEs no fluido folicular que também possuem o objetivo de facilitar a interação entre células da granulosa e complexo cumulus oócito no folículo antral (SANG et al., 2013; SOHEL et al., 2013; DIEZ-FRAILE et al., 2014; SANTONOCITO et al., 2014; DE ÁVILA et al., 2019) – Figura 2.

Figura 2 –Vesículas extracelulares liberadas no antro folicular (imagem ampliada)



Fonte: Adaptado de MACHTINGER et al., 2015.

As VEs são originárias da membrana plasmática, apresentam formato irregular e diâmetros variando de 100 a 1000nm (TAYLOR e GERCEL-TAYLOR, 2013). São formados a partir da brotação interna das membranas endossômicas, o que origina os corpos multivesiculares no interior das células. Mais tarde, essas vesículas se fundem com a membrana plasmática celular e liberam as vesículas no espaço intercelular como exossomos (KOWAL et al., 2014). Normalmente as VEs liberadas pela célula doadora realiza interação com receptores específicos em células alvo provocando um estímulo direto na mesma, ou ainda pode transferir receptores de ligação (JANOWSKA-WIECZOREK et al., 2001; MOREL et al., 2004), movimentar proteína de uma célula a outra e auxiliar no transporte de informação genética entre as células (COCUCCI, RACCHETTI e MELDOLESI, 2009).

As VEs, liberadas no fluido folicular pelas células da granulosa mural conseguem atingir as células do cumulus transportando moléculas e sinalizadores podendo atingir também o oócito (DA SILVEIRA et al., 2012; DE ÁVILA et al., 2019). Dessa forma, essas partículas são considerados vesículas bioativas que promovem comunicação intercelular através da transferência de proteínas, lipídios, mRNAs e microRNAs (SANTONOCITO et al., 2014; DE ÁVILA et al., 2019).

As VEs isoladas do fluido folicular carregam diferentes microRNAs (miRNA), que apesar de não serem codificados, desempenham a função de reprimir a

expressão gênica de mRNAs específicos (BARTEL, 2004), ou seja, as VEs apresentam funções distintas. Além disso, o conteúdo de miRNA é alterado de acordo com o período do ciclo estral (DE ÁVILA et al., 2019) e à medida que o folículo antral cresce, pode exercer influência sobre a maturação oocitária, proliferação celular e expansão das células do cumulus (NAVAKANITWORAKUL et al., 2016).

2.2.2 Influência da Progesterona no Microambiente Folicular

As variações dos hormônios e de seus receptores que controlam as ondas de crescimento folicular durante o ciclo estral bovino também são responsáveis por afetar o microambiente folicular (ADAMS et al., 2008). Como sabemos a P4 circulante é considerada um fator chave para a função ovariana, que permite a ovulação e o desenvolvimento de novos folículos, e ainda atua na manutenção da prenhez (PELUSO, 2006). Além disso, a P4 presente no líquido folicular, bem como seus receptores presentes nas células da granulosa e do *cumulus*, foram associados positivamente à maturação e competência dos oócitos ovulados (DIELEMAN et al., 1983; APARICIO et al., 2011; TERZAGHI et al., 2016;).

A principal produção de P4 no ovário é iniciada por um processo de esteroidogênese que acontece nas células da teca e granulosa do folículo pré-ovulatório (BAO e GARVERICK, 1998), bem como nas células luteais (URSELY, 1979). Dessa forma, o CL formado após a ovulação é uma fonte central de P4, que promove o aumento progressivo da mesma, durante os dias 4 a 12 do ciclo estral (SARTORI, 2011). Os altos níveis de P4 são produzidos durante o diestro e permanecem até o 17º dia do ciclo estral, quando se inicia a luteólise, ou pode permanecer elevada se houver prenhez (ADAMS et al., 2008).

A influência da P4 sobre o microambiente folicular ao longo do ciclo estral promove mudanças no fluido folicular em relação a composição de diversos hormônios, não somente da própria P4, mas também de estradiol, insulina, IGFs e outros fatores secretados pelas células oocitárias e do *cumulus* (ORSI et al., 2005). O fluido folicular também sofre alteração na composição de nutrientes como carboidratos, aminoácidos e outros metabólitos de acordo com a fase do ciclo estral (O'SHEA et al., 2012).

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, T. J.; MIYAMOTO, A. Vascular control of ovarian function: ovulation, *corpus luteum* formation and regression. **Animal reproduction science**, v. 82, p. 127-140, 2004.
- ADAMS, G.P.; MATTERI, R.L.; KASTELIC, J.P. Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 94, p. 177-188, 1992.
- ADAMS, G. P.; JAISWAL, R.; SINGH, J. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. **Theriogenology**, v.69, n. 1, p.72-80, 2008.
- APARICIO, I. M.; GARCIA-HERREROS, M.; O'SHEA, L. C.; HENSEY, C.; LONERGAN, P.; FAIR, T. Expression, regulation, and function of progesterone receptors in bovine cumulus oocyte complexes during *in vitro* maturation. **Biology of reproduction**, v. 84, n. 5, p. 910-921, 2011.
- AUSTIN E.J.; MIHM M.; EVANS A.C.O.; KNIGHT P.G.; IRELAND J.L.H.; ROCHE J.F. Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle. **Biology of Reproduction, Madison**, v. 64, n. 3, p. 839-848, 2001.
- BAO, Bagna; GARVERICK, H. Allen. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. **Journal of animal science**, v. 76, n. 7, p. 1903-1921, 1998.
- BERGAMASCHI, M. C. M. A; MACHADO, R.; BARBOSA, R. T. Eficiência reprodutiva das vacas leiteiras. Juiz de Fora, MG: **Embrapa Gado de leite, Circular Técnica**, n. 64, 2010.
- BERTAN, C. M.; BINELLI, M.; MADUREIRA, E. H. Mecanismos endócrinos e moleculares envolvidos na formação do corpo lúteo e na luteólise - revisão de literatura. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n.6, 2006.
- BODENSTEINER K.J.; KOT K.; WILTBANK M.C.; GINTHER O.J. Synchronization of emergence of follicular wave in cattle. **Theriogenology**, v.45, n. 6, p.1115-1128, 1996.
- BURATINI Jr., J. Controle endócrino e local da foliculogênese em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, p.190-196, 2007.
- BRAW-TAL, R.; YOSSEFI, S. Studies *in vivo* and *in vitro* on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. **Reproduction**, v. 109, n. 1, p. 165-171, 1997.
- CASTILHO, C.; GARCIA, J. M. Divergência no crescimento folicular: efeito na competência oocitária para produção *in vitro* de embriões-revisão. **Archives of Veterinary Science**, v. 10, n. 3, p. 17-23, 2005.

CAVALIERI, F. L. B.; MOROTTI, F.; SENEDA, M. M.; COLOMBO, A. H. B.; ANDREAZZI, M. A.; EMANUELLI, I. P.; RIGOLON, L. P. Improvement of bovine *in vitro* embryo production by ovarian follicular wave synchronization prior to ovum pick-up. **Theriogenology**, v. 57, p. 70-117, 2018.

COCUCCI, E.; RACCHETTI, G.; MELDOLESI, J. Shedding microvesicles: artefacts no more. **Trends in cell biology**, v. 19, n. 2, p. 43–51, 2009.

CONTI, M.; HSIEH, M.; ZAMAH, A. M.; OH, J. S. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 356, n. 1-2, p. 65-73, 2012.

CHAPPEL, Scott. The role of mitochondria from mature oocyte to viable blastocyst. **Obstetrics and gynecology international**, v. 2013, 2013.

DA SILVEIRA, J. C.; VEERAMACHANENI, D. N. R.; WINGER, Q. A.; CARNEVALE, E. M.; BOUMA, G. J. Cell-secreted vesicles in equine ovarian follicular fluid contain miRNAs and proteins: A possible new form of cell communication with in the ovarian follicle. **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 3, p. 71–71, 2012.

DE ÁVILA, A. C. F. C.; BRIDI, A.; ANDRADE, G. M.; DEL COLLADO, M.; SANGALLI, JR; NOCITI, R. P.; & PERECIN, F. Estrous cycle impacts miRNA content in extracellular vesicles that modulate bovine cumulus cell transcripts during *in vitro* maturation. **Biology of Reproduction**, 2019.

DIELEMAN, S. J.; KRUIP, T. A.; FONTIJNE, P.; DE JONG, W. H. R.; VAN DER WEYDEN, G. C. Changes in oestradiol, progesterone and testosterone concentrations in follicular fluid and in the micromorphology of preovulatory bovine follicles relative to the peak of luteinizing hormone. **Journal of Endocrinology**, v. 97, n. 1, p. 31-NP, 1983.

DIEZ-FRAILE A.; LAMMENS, T.; TILLEMANN, K.; WITKOWSKI, W.; VERHASSELT, B.; DE SUTTER, P.; BENOIT, Y.; ESPEEL, M.; D'HERDE, K. Age-associated differential microRNA levels in human follicular fluid reveal pathways potentially determining fertility and success of *in vitro* fertilization. **Human fertility**, v. 17, n. 2, p. 90-98, 2014.

DI PIETRO, C. Exosome-mediated communication in the ovarian follicle. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 33, n. 3, p. 303-311, 2016.

EPPIG, John J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**, v. 122, n. 6, p. 829-838, 2001.

ERICKSON, B. H. Development and radio-response of the prenatal bovine ovary. **Reproduction**, v. 11, n. 1, p. 97-105, 1966.

FAIR, T.; HULSHOF, S. C. J.; HYTTEL, P.; GREVE, T.; BOLAND, M. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. **Anatomy and embryology**, v. 195, n. 4, p. 327-336, 1997.

FIGUEIREDO, R.A.; BARROS, C. M.; PINHEIRO, O. L.; SOLE, J. M. P. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v. 47, n. 8, p. 1489-1505, 1997.

FILION, F.; BOUCHARD, N.; GOFF, A. K. Molecular cloning and induction of bovine prostaglandin E synthase by gonadotropins in ovarian follicles prior to ovulation *in vivo*. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 276, p. 34323-34330, 2001.

FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of Reproduction**, v. 50, n. 2, p. 225-232, 1994.

FORTUNE, J.E.; RIVERA, G.M.; EVANS, A. C. O. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 648-654, 2001.

GARNSWORTHY, P. C.; SINCLAIR, K. D.; WEBB, R. Integration of physiological mechanisms that influence fertility in dairy cows. **Animal**, v. 2, n. 8, p. 1144-1152, 2008.

GIBBONS, J. R.; WILTBANK, M. C.; GINTHER, O. J. Functional interrelationships between follicles greater than 4 mm and the follicle-stimulating hormone surge in heifers. **Biology of reproduction**, v. 57, n. 5, p. 1066-1073, 1997.

GINTHER O.J.; KNOPF L.; KASTELIC J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.87, n. 1, p.223-30, 1989.

GINTHER O. J.; WILTBANK M.C.; FRICKE P. M.; GIBBONS J.R.; KOT K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction, Madison**, v.55, n. 6, p.1187-1194, 1996.

GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; BERGFELT, D.R. Follicle selection in monovular species. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 638-647, 2001.

GINTHER, O. J.; BEG, M.A.; DONADEU, F. X.; BERGFELT, D. R. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, v. 78, v. 3, p. 239–257, 2003.

GREEN, Lisa J e SHIKANOV, Ariella. *In vitro* culture methods of preantral follicles. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 229-238, 2016.

HANSEN, Peter J. Current and future assisted reproductive technologies for mammalian farm animals. **In: Current and future reproductive technologies and world food production**. Springer, New York, NY, 2014. p. 1-22.

HENNET, M. L.; COMBELLES, C. M. The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation. **International Journal of Developmental Biology**, v. 56, n. 10-11-12, p. 819-831, 2013.

HUGHES M. H.; GOROSPE W. C. Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. **Endocrinology**, v. 129, p. 2415-2422, 1991.

JANOWSKA-WIECZOREK, A.; MAJKA, M.; KIJOWSKI, J.; BAJ-KRZYWORZEKA, M.; RECA, R.; ROBERT TURNER, A.; RATAJCZAK, J.; EMERSON, S. G.; ANNA KOWALSKA, M.; RATAJCZAK, M. Z. Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment. **Blood**, v. 98, n. 10, p. 3143–3149, 2001.

KOWAL, J., TKACH, M.; THERY, C. Biogenesis and secretion of exosomes. **Current opinion in cell biology**, v. 29, p. 116-125, 2014.

KNIGHT, P. G.; GLISTER, C. TGF- β superfamily members and ovarian follicle development. **Reproduction**, v. 132, n. 2, p. 191-206, 2006.

LUCY, M. C.; SAVIO, J. D.; BADINGA, L.; DE LA SOTA, R. L.; THATCHER, W. W. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 3615-26, 1992.

LUSSIER, J. G.; MATTON, P.; DUFOUR, J. J. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. **Reproduction**, v. 81, n. 2, p. 301-307, 1987.

MACHTINGER, R.; LAURENT, L. C.; BACCARELLI, A. A. Extracellular vesicles: roles in gamete maturation, fertilization and embryo implantation. **Human reproduction update**, v. 22, n. 2, p. 182-193, 2015.

MAGALHÃES, D. M.; FERNANDES, D. D.; ARAÚJO, V. R. Papel do hormônio folículo estimulante na foliculogênese *in vivo* e *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, p. 171-182, 2009.

MATSUDA, F.; INOUE, N.; MANABE, N.; OHKUNA, S. Follicular Growth and Atresia in Mammalian Ovaries: Regulation by Survival and Death of Granulosa Cells. **Journal of Reproduction and Development**, v. 58, p. 44-50, 2012.

MATHIVANAN, Suresh; JI, Hong; SIMPSON, Richard J. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. **Journal of proteomics**, v. 73, n. 10, p. 1907-1920, 2010.

MELLO, R. R. C.; FERREIRA, J. E.; MELLO, M. R. B.; PALHANO, H. B. Aspectos da dinâmica folicular em bovinos. **ACSA – Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v. 10, n. 4, p. 01-06, 2014.

MIGLIOR, F.; MUIR, B. L.; VAN DOORMAAL, B. J. Selection indices in Holstein cattle of various countries. **Journal of dairy science**, v. 88, n. 3, p. 1255-1263, 2005.

MIHM, M.; BAKER, P. J.; IRELAND, J. L. H.; SMITH, G. W.; COUSSENS, P. M.; EVANS, A. C. O.; IRELAND, J. J. Molecular evidence that growth of dominant follicles involves a reduction in follicle-stimulating hormone dependence and an increase in luteinizing hormone dependence in cattle. **Biology of reproduction**, v. 74, n. 6, p. 1051-1059, 2006.

MORAES, J. C. F.; SOUZA, C. J. H.; GONSALVES, P. B. D. Controle do estro e da ovulação em bovinos e ovinos. In: Gonsalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**, São Paulo: Livraria Varela, 2001.

MOREL, O.; TOTI, F.; HUGEL, B.; FREYSSINET, J. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. **Current opinion in hematology**, v. 11, n. 3, p. 156–64, 2004.

MORITA Y.; TILLY J. L. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. **Developmental Biology**, v. 213, n. 1, p. 1-17, 1999.

NAVAKANITWORAKUL, R.; HUNG, W. T.; GUNWARDENA, S.; DAVIS, J. S.; CHOTIGEAT, W., CHRISTENSON, L. K. Characterization and small RNA content of extracellular vesicles in follicular fluid of developing bovine antral follicles. **Scientific reports**, v. 6, p. 25486, 2016.

O'SHEA, L. C.; MEHTA, J.; LONERGAN, P.; HENSEY, C.; FAIR, T. Developmental competence in oocytes and *cumulus* cells: candidate genes and networks. **Systems biology in reproductive medicine**, v. 58, n. 2, p. 88-101, 2012.

ORSI, N. M.; Gopichandran, N.; Leese, H. J.; Picton, H. M.; Harris, S. E. Fluctuations in bovine ovarian follicular fluid composition throughout the oestrous cycle. **Reproduction**, v. 129, n. 2, p. 219-228, 2005.

PELUSO, John J. Multiplicity of progesterone's actions and receptors in the mammalian ovary. **Biology of reproduction**, v. 75, n. 1, p. 2-8, 2006.

QUESENBERRY, Peter J.; ALIOTTA, Jason M. Cellular phenotype switching and microvesicles. **Advanced drug delivery reviews**, v. 62, n. 12, p. 1141-1148, 2010.

RATAJCZAK, M. Z.; KUCIA, M.; JADCZYK, T.; GRECO, N. J.; WOJAKOWSKI, W.; TENDERA, M.; RATAJCZAK, J. Pivotal role of paracrine effects in stem cell therapies in regenerative medicine: can we translate stem cell-secreted paracrine factors and microvesicles into better therapeutic strategies?. **Leukemia**, v. 26, n. 6, p. 1166, 2012.

RIZOS, D., FAIR, T.; PAPADOPOULOS, S.; BOLAND; M. P.; LONERGAN, P. Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 62, n. 3, p. 320-327, 2002.

RODGERS, R. J.; IRVING-RODGERS, H. F. Formation of the ovarian follicular antrum and follicular fluid. **Biology of Reproduction**, v. 82, n. 6, p. 1021-1029, 2010.

RUSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibl Anat**, v. 24, p. 77-92, 1983.

SALES, M. G. F.; ARAÚJO, A. A. Corpo lúteo cíclico e gestacional: revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, p. 185-194, 2010.

SANG, Q.; YAO, Z.; WANG, H.; FENG, R.; WANG, H.; ZHAO, X.; XING, Q.; JIN, L.; HE, L.; WU, L.; WANG, L. Identification of microRNAs in human follicular fluid:

characterization of microRNAs that govern steroidogenesis *in vitro* and are associated with polycystic ovary syndrome *in vivo*. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 98, n. 7, p. 3068-3079, 2013.

SANTONOCITO, M.; VENTO, M.; GUGLIELMINO, M. R.; BATTAGLIA, R.; WAHLGREN, J.; RAGUSA, M.; & SCOLLO, P. Molecular characterization of exosomes and their microRNA cargo in human follicular fluid: bioinformatic analysis reveals that exosomal microRNAs control pathways involved in follicular maturation. **Fertility and sterility**, v. 102, n. 6, p. 1751-1761. e1, 2014.

SARTORI, R.; BARROS, C. M. Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. **Animal reproduction science**, v. 124, n. 3-4, p. 244-250, 2011.

SARTORI, R.; PURSLEY, J. R.; WILTBANK, M. C. **Estrous cycle of heifers and lactating dairy cows: Ovarian and hormonal dynamics and estrous cycle abnormalities**. Large Dairy Herd Management 3ed. American Dairy Science Association, 2017. CD ROOM.

SAUMANDE, J. La folliculogénèse chez les ruminants. **Recueil de Médecine Vétérinaire**, v. 167, p. 205-218, 1991.

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

SOHEL, M. M. H.; HOELKER, M.; NOFERESTI, S. S.; SALILEW-WONDIM, D.; THOLEN, E.; LOOFT, C.; & TESFAYE, D. Exosomal and non-exosomal transport of extra-cellular microRNAs in follicular fluid: implications for bovine oocyte developmental competence. **PloS one**, v. 8, n. 11, p. e78505, 2013.

SMITH, M.F.; MCINTUSH, E.V.; RICKE, W.A.; KOJIMA, F.N.; SMITH, G.W. Regulation of ovarian extracellular matrix remodelling by metalloproteinases and their tissue inhibitors: effects on follicular development, ovulation and luteal function. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.54, p.367-381, 1999.

TAYLOR, Douglas D.; GERCEL-TAYLOR, Cicek. The origin, function, and diagnostic potential of RNA within extracellular vesicles present in human biological fluids. **Frontiers in genetics**, v. 4, p. 142, 2013.

TERZAGHI, L.; TESSARO, I.; RAUCCI, F.; MERICO, V.; MAZZINI, G.; GARAGNA, S.; ZUCCOTTI M.; FRANCIOSI, F.; LODDE, V. PGRMC1 participates in late events of bovine granulosa cells mitosis and oocyte meiosis. **Cell Cycle**, v. 15, n. 15, p. 2019-2032, 2016.

URSELY, JOCELYNE; LEYMARIE, PIERRE. Varying response to luteinizing hormone of two luteal cell types isolated from bovine *corpus luteum*. **Journal of Endocrinology**, v. 83, n. 3, p. 303-NP, 1979.

VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M. M.; BECKERS, Jean-François. *In-vivo* and *in-vitro* development of preantral follicles. **Theriogenology**, v. 47, n. 1, p. 73-82, 1997.

VOSS, A. K.; FORTUNE, J. E. Estradiol-17 beta has a biphasic effect on oxytocin secretion by bovine granulosa cells. **Biology of Reproduction**, v. 48, p. 1404-1449, 1993.

WATANABE, Y. F.; SOUZA, A. H.; MINGOTI, R. D.; FERREIRA, R. M.; BATISTA, E. O. S.; DAYAN, A.; WATANABE, O.; MEIRELLES, F. V.; NOGUEIRA, M. F. G.; FERRAZ, J. B. S.; BARUSELLI, P. S. Number of oocytes retrieved per donor during OPU and its relationship with *in vitro* embryo production and field fertility following embryo transfer. **Animal Reproduction**, v. 14, p. 635-644, 2017.

WATSON, A. J. Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and embryo developmental competence. **Journal of animal science**, v. 85, n. suppl_13, p. E1-E3, 2007.

WILTBANK, M. C.; GUMEN, A.; SARTORI, R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. **Theriogenology**, v. 57, p. 21-52, 2002.

WIT, A. A. C.; WURTH, Y. A.; KRUIP, A. M. Effect of ovarian and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine *cumulus*-oocyte complex. **Journal Animal Science**, v.78, p.1277-83, 2000.

WONG, R. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, p. 30-87, 2011.

YANG, M. Y.; FORTUNE, J. E. The capacity of primordial follicles in fetal bovine ovaries to initiate growth *in vitro* develops during mid-gestation and is associated with meiotic arrest of oocytes. **Biology of reproduction**, v. 78, n. 6, p. 1153-1161, 2008.

3 HIPÓTESE

A presença do corpo lúteo, bem como o “status” gestacional é capaz de modular as vesículas extracelulares oriundas do fluido folicular em ovários de fêmeas bovinas.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as vesículas extracelulares provenientes do fluido folicular recuperado de acordo com o “status” gestacional, presença e ausência do corpo lúteo no ovário de vacas leiteiras da raça holandesa (*Bos taurus taurus*).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar e comparar a concentração e diâmetro das vesículas extracelulares, provenientes do fluido folicular, de acordo com a presença e ausência do corpo lúteo.
- Analisar e comparar a concentração e diâmetro das vesículas extracelulares, provenientes do fluido folicular, de acordo com o “status” gestacional da fêmea.

5 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

ANÁLISE DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DE ACORDO COM A PRESENÇA DO CORPO LÚTEO E “STATUS” GESTACIONAL EM VACAS LEITEIRAS

ANALYSIS OF EXTRACELLULAR VESICLES ACCORDING TO THE PRESENCE OF THE CORPUS LUTEUM AND GESTATIONAL STATUS IN DAIRY COWS.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo analisar as vesículas extracelulares (VEs) recuperadas do fluido folicular de ovários ipsilaterais e contralaterais ao corpo lúteo (CL), em fêmeas bovinas da raça holandesa (*Bos taurus taurus*) em dois momentos distintos: antes e após a IATF, de acordo com o “status” gestacional. Foram utilizadas 10 vacas holandesas de uma propriedade produtora de leite, da cidade de Arapoti-Paraná. O fluido folicular foi colhido através da técnica de *ovum pick-up* (OPU) de vacas lactantes, com 30 dias pós-parto, aptas a reprodução. Em seguida foram submetidas a IATF (inseminação artificial em tempo fixo). O tratamento hormonal utilizado foi a base de P4 e estradiol. A IATF foi realizada utilizando sêmen de um mesmo touro para o grupo de fêmeas deste estudo. Após cerca de 60 dias da IATF, a OPU foi realizada em fêmeas prenhes (N=5) e não prenhes (N=4). As amostras de fluido folicular foram direcionadas para isolamento e análise por sequenciamento de nanopartículas pelo Nanosigth (NS300; NTA 3.1 Build 3.1.45; Malvern). As variáveis concentração (VEs/mL) e diâmetro (nm) das VEs foram analisadas pelo teste T de Student ou teste Mann-Whitney com significância de $p \leq 0,05$. O fluido folicular proveniente de fêmeas prenhes e não prenhes contralateral ao CL apresentou maior concentração de VEs ($\leq 200\text{nm}$) quando comparado as amostras obtidas ipsilateral ao CL ($2,7 \times 10^{10}$ VEs/mL vs. $1,07 \times 10^{10}$ VEs/mL; $p=0,013$) dos mesmos animais. Quando analisamos o grupo de fêmeas não prenhes (N=3) separadamente, a concentração de VEs é maior para contralateral ($3,12 \times 10^{10}$ VEs/mL) se comparado com o ipsilateral ($6,38 \times 10^9$ VEs/mL) ao CL ($p=0,024$). Porém, quando avaliamos o mesmo grupo (ipsilateral vs. contralateral) para as fêmeas prenhes (N=3), não foi possível observar diferença para a concentração de VEs ($p=0,663$). Para a avaliação entre CL ipsilateral (prenhe) vs. ipsilateral (não prenhe), as fêmeas prenhes apresentaram maior concentração de VEs ($1,50 \times 10^{10}$ VEs/mL) em relação as fêmeas não prenhes ($6,38 \times 10^9$ VEs/mL; $p=0,016$). Não houve diferença entre as demais comparações realizadas e para a média do diâmetro das VEs. Em nosso estudo, foi possível concluir que a presença ou ausência de CL, bem como o “status” gestacional da fêmea, influencia o número de VEs presentes no fluido dos folículos adjacentes.

Palavras-chave: vesículas extracelulares, corpo lúteo, gestação, fluido folicular, *Bos taurus taurus*.

ABSTRACT

The present study aimed to analyze the extracellular vesicles (EVs) recovered from the follicular fluid of “ipsilateral” (same side) and “contralateral” (opposite side) of the corpus luteum (CL) in Holstein cows (*Bos taurus taurus*) at two different times: before and after timed artificial insemination (TAI), according to the gestational status. Ten cows from a dairy farm in Arapoti-Paraná were used. The follicular fluid was collected using the ovum pick-up technique (OPU), of the lactating Holstein cows, 30 days postpartum, ready for reproduction, and then were submitted to TAI. The hormonal treatment used on the property was based on P4 and estradiol. The TAI was performed using semen from the same bull for all females in this study. After about 60 days from the TAI, the OPU was performed in pregnant (N=5) and non-pregnant (N=4) females. The follicular fluid samples, collected were directed to isolation and Nanoparticle tracking analysis by Nanosight (NS300; NTA 3.1 Build 3.1.45; Malvern). The concentration (EVs/mL) and diameter (nm) of the VEs were analyzed by Student's T test or Mann-Whitney test with significance of $p \leq 0.05$. The follicular fluid of pregnant and non-pregnant females from the ovarian opposite the CL presented higher concentration of EVs ($\leq 200\text{nm}$) when compared to ovarian samples with CL (2.7×10^{10} EVs/mL vs. 1.07×10^{10} EVs/ml; $p=0.013$) from the animals. When we analyzed the group of nonpregnant females (N=3) separately, the nanoparticle concentration is higher for “contralateral” follicular fluid (3.12×10^{10} EVs/mL) compared to the “ipsilateral” (6.38×10^9 EVs/mL) follicular fluid ($p=0.024$). However, when evaluating the same group (“contralateral vs. “ipsilateral”) for pregnant females (N=3) was not observed difference in the concentration of EVs ($p=0.663$). The evaluation between “ipsilateral” (pregnant) vs. “ipsilateral” (non-pregnant) on the pregnant females had greater concentration EVs ($1,50 \times 10^{10}$ EVs/mL) compared to non-pregnant females ($6,38 \times 10^9$ EVs/mL; $p=0.016$). There was no difference between the others comparisons made and for the mean EVs diameter. In our study, it was possible to conclude that the presence or absence of CL, as well as its gestational status influences the number of EVs present in the fluid of adjacent follicles.

Key words: extracellular vesicles, corpus luteum, gestation, follicular fluid, *Bos taurus taurus*.

5.1 INTRODUÇÃO

Cada vez mais estudos tem buscado métodos para identificar biomarcadores que sejam eficientes em prever características desejáveis para o sucesso da prenhez (MAGEE et al., 2010; BERKOWICZ et al., 2011), ou ainda características intrínsecas ao próprio animal, possíveis de serem correlacionada com a fertilidade de maneira aplicada, como a contagem de folículos antrais (CFA; SENEDA et al., 2019). Também já foi comprovada que a seleção genômica combinada com as tecnologias reprodutivas avançadas foi capaz de acelerar a taxa de progresso genético em vacas leiteiras (BOUQUET e JUGA, 2013; THOMASEN et al., 2016).

Pensando na aplicabilidade das biotécnicas reprodutivas, tem-se buscado estabelecer um período do ciclo estral que visa otimizar o uso da técnica de *Ovum Pick-up* (OPU) e posterior produção de embriões *in vitro* (PIVE). Cavalieri e colaboradores (2018), demonstraram que a sincronização da onda de crescimento folicular, aumenta a produção de embriões *in vitro* e a taxa de concepção. Em um estudo preliminar, realizado pelo nosso grupo de pesquisa, foi possível correlacionar a influência do ciclo estral sobre a recuperação de oócitos com maior competência de desenvolvimento embrionário *in vitro* a partir de pares de ovários recuperados de abatedouro (Covre et al., Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019 - dados não publicados).

Neste contexto, De Ávila et al. (2019) indicaram a influência do período do ciclo estral sobre o microambiente folicular, e conseqüentemente, sobre a capacidade de maturação *in vitro* do oócito recuperado por aspiração folicular na presença de diferentes níveis de P4. A inibição da produção de P4 pelas células do *cumulus* ou o bloqueio da atividade de seus receptores, promove queda na produção de embriões desenvolvidos *in vitro*, demonstrando a importância da interação e comunicação intercelular entre a P4 e seus receptores para a competência do oócito (APARICIO et al., 2011).

De Ávila et al. (2019) verificaram que o nível de P4 secretada pelo CL interfere na comunicação celular do microambiente folicular. Nos últimos anos o interesse pela comunicação intercelular aumentou devido a sua importância para o funcionamento de diversos processos fisiológicos, incluindo a regulação da diferenciação e proliferação celular, gametogênese, e desenvolvimento embrionário. Nesse contexto, foram evidenciadas vesículas extracelulares (VEs), presentes no fluido de folículos

antrais, como novos e importantes mediadores da comunicação intercelular (DA SILVEIRA et al., 2012).

As VEs são liberadas por diversos tipos de células e carregam a informação genética ou sinais biológicos de suas células de origem a uma célula receptora vizinha ou localizada distalmente, mediando a comunicação intercelular até as células-alvos (LEE et al., 2011; SOHEL et al., 2013; MOBARAK et al., 2019). Investigações mais detalhadas das substâncias expressas diferencialmente de acordo com a modulação das VEs podem levar a possíveis novos alvos para intervenção ou desenvolvimento de testes prognósticos para desempenho reprodutivo positivo e, potencialmente, permitir a implementação de estratégias para melhorar os índices de fertilidade de rebanhos leiteiros, como abordagens nutricionais ou manipulação do ciclo estral (MITCHELL et al., 2016 e 2017).

No fluido folicular as VEs tornam-se responsáveis por parte da transmissão e controle da comunicação intercelular entre oócito, células do *cumulus* e células da granulosa, pois transportam miRNAs que atingem elementos-chave em vias relacionadas ao crescimento folicular e maturação de oócitos em mamíferos (DA SILVEIRA et al., 2012 ; SOHEL et al., 2013 ; SANTONOCITO et al., 2014).

Além do conteúdo transportado pelas VEs, a concentração e o diâmetro das mesmas, também pode sugerir diferença na comunicação intercelular. O aumento do número de VEs no plasma sanguíneo é observado em condições patológicas e sua carga proteica pode ser usada para diagnosticar doenças (MELO et al., 2015). Além disso, as VEs foram utilizadas como marcadores de gestação e patologias reprodutivas, em mulheres (TSOCHANDARIDIS et al., 2015).

Os estudos conduzidos para compreender melhor a modulação e a função realizada pelas VEs, sobre diferentes perspectivas fisiológicas, se torna interessante pela possibilidade de contribuir com o avanço da eficiência reprodutiva no rebanho de gado leite.

Por isso, hipotetizamos que a presença ipsilateral ou contralateral do CL, bem como o “status” gestacional em que a fêmea bovina se encontra (prenhe ou não prenhe), pode modular o microambiente folicular de maneira distinta. Dessa maneira, este estudo tem como objetivo avaliar as VEs recuperadas do fluido folicular de acordo com o “status” gestacional, presença e ausência do corpo lúteo no ovário de vacas leiteiras da raça holandesa (*Bos taurus taurus*).

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

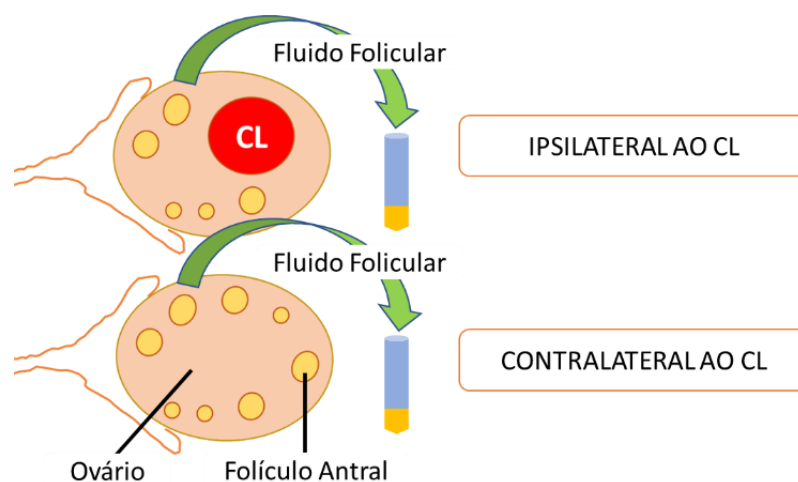
5.2.1 Localização, manejo dos animais e alimentação

Este estudo foi realizado nos meses de junho e setembro de 2019, em uma única fazenda comercial de leite no Sul do Brasil, na cidade de Arapoti - Paraná. Foram utilizadas o total de 10 fêmeas holandesas (*Bos taurus taurus*), com média de 61,1 ($\pm 3,07$) dias pós-parto ao início do estudo e média de 132,1 ($\pm 3,07$) ao final do mesmo. Todas as fêmeas foram avaliadas através de exame ultrassonográfico e àquelas consideradas aptas à reprodução foram submetidas a duas coletas de amostras de fluido folicular através da técnica de OPU. As fêmeas estavam em lactação com média de produção diária de leite/animal de 42,6 L ($\pm 10,28$), possuíam de 2 a 9 anos de idade, e foram mantidas confinadas em sistema *free-stall*, com dieta a base de silagem de milho, sal mineral e água *ad libitum*.

5.2.2 Colheita das amostras

As fêmeas holandesas (N=10) selecionadas para o estudo foram submetidas a colheita de amostra de fluido folicular (figura 3) *in vivo* através da técnica de *ovum pick-up* (OPU) em dois momentos distintos, que denominamos OPU 1 (antes da inseminação artificial em tempo fixo; IATF) e OPU2 (após IATF). A OPU1 inclui somente fêmeas não prenhes, enquanto a OPU2 ocorreu em fêmeas prenhes e não prenhes após a IATF. Em ambos os momentos, o fluido folicular foi colhido ipsilateral e contralateral ao ovário que continha o CL, separadamente (figura 3). Dessa forma foi possível realizar diversas comparações entre as variáveis: status gestacional; fluido ipsilateral e contralateral ao CL; e OPU1 e OPU2.

Figura 3 – Esquema representativo da colheita de fluido folicular

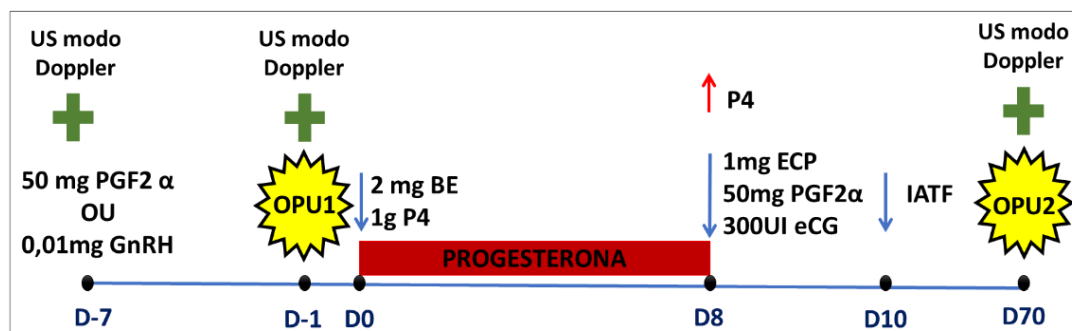


O esquema representa a recuperação do fluido folicular, após punção do folículo antral através de OPU, no ovário ipsilateral e contralateral ao CL. Fonte: própria autoria.

Anterior ao momento da OPU1 as fêmeas desse estudo foram submetidas a uma aplicação de 50mg de cloprostenol sódico ($PGF2\alpha$; Sincrocio®, Ourofino, São Paulo) intramuscular (IM) quando pelo menos um dos ovário apresentou CL, ou uma aplicação de 0,01 mg (IM) de GnRH (Sincroforte®, Ourofino, São Paulo) quando apresentaram folículo antral ≥ 8 mm com o objetivo de sincronizar o momento da colheita de amostras de fluido folicular para o OPU1 (figura 4).

Após a OPU1, os animais desse estudo foram submetidos a um tratamento hormonal para IATF que consistiu no uso de um dispositivo intravaginal de liberação lenta de P4 (1g; Sincrogest®, Ourofino, São Paulo) associado a aplicação IM de 2 mg de benzoato de estradiol (Sincrodiol®, Ourofino, São Paulo) no dia 0 do ciclo estral. No dia 8 foi feita a retirada do implante de P4, e aplicação IM de 50mg de $PGF2\alpha$ (Sincrocio®, Ourofino, São Paulo), associado a 1 mg de cipionato de estradiol (Sincrocip®, Ourofino, São Paulo) e 300UI de eCG (gonadotrofina coriônica equina; SincroeCG®, Ourofino, São Paulo). Após 72 horas a IATF foi realizada utilizando sêmen descongelado de um mesmo touro para o grupo de fêmeas deste estudo.

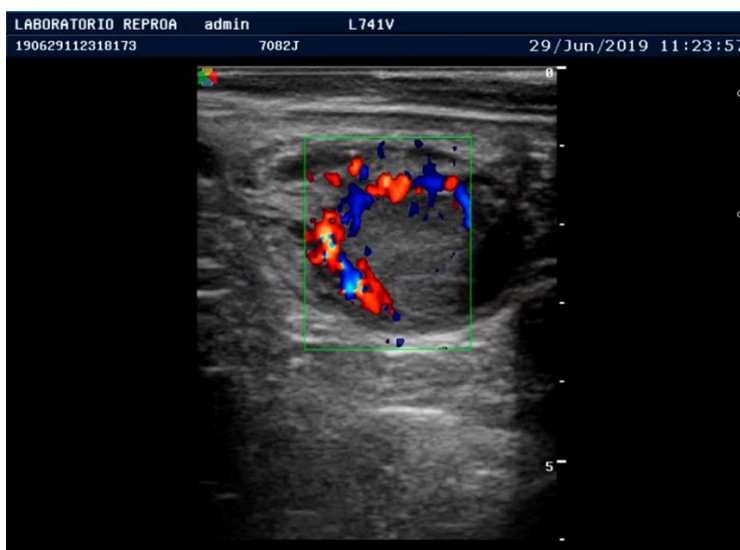
Figura 4 – Esquema representativo do delineamento experimental e tratamento hormonal para IATF



A figura esquemática aponta em ordem cronológica o delineamento experimental deste estudo, bem como o tratamento hormonal realizado antes da OPU1, e o protocolo de IATF. “OPU1 e 2” representam o momento da colheita do fluido folicular. “US em modo Doppler” correspondem aos exames ultrassonográficos realizados durante o estudo. Fonte: própria autoria.

Todas as amostras foram obtidas de fêmeas com CL funcional (figura 5) e ausência de folículo dominante. Animais que não possuíam CL funcional ou apresentavam folículo dominante, não foram utilizadas na OPU correspondente. A vascularização do CL foi estimada através do uso de ultrassonografia em modo Doppler (SV6, SonoScape, China) classificada de acordo com escala de 0 - 4 estabelecida por Silva e Ginther (2010). Na OPU1 a área do CL avaliada apresentou média de vascularização igual a 2,0 ($\pm 0,0$; N=7). Enquanto na OPU 2 a média de escore de vascularização apresentada pelas fêmeas foi de 2,37 ($\pm 0,744$; N=8).

Figura 5 – Imagem ultrassonográfica em modo Color-Doppler (SV6, SonoScape, China) de área de vascularização do CL em fêmea bovina



A figura mostra uma imagem visibilizada em aparelho de ultrassom (SV6, SonoScape, China), onde o retângulo em verde capta a área de um CL (em escala de cinza) e a vascularização ao redor do mesmo. Em vermelho é possível identificar o fluxo sanguíneo que flui no sentido do transdutor. Em azul está o fluxo sanguíneo que flui no sentido contrário ao transdutor. Fonte: própria autoria.

5.2.3 Isolamento das pequenas vesículas extracelulares do líquido folicular

As amostras de fluido folicular foram centrifugadas para remover células (300xg por 10 min), detritos celulares (2.000xg por 10 min) e VEs grandes (16.500xg por 30 min; KENIGSBERG et al., 2017). O sobrenadante foi recuperado após cada ciclo, e o “pellet” descartado. As amostras foram mantidas em nitrogênio líquido até o momento da ultracentrifugação para isolamento das pequenas VEs.

Para a ultracentrifugação as amostras de fluido folicular foram filtradas com filtro de seringa estéril de 0,22 µm (membrana PES; KASVI) para selecionar as VEs menores. Posteriormente, este fluido foi centrifugado duas vezes a 119.700xg por 70 min e temperatura de 4°C (Ultracentrífuga Optima XE-90; rotor 70 Ti; Beckman Coulter) conforme descrito anteriormente por Kenigsberg et al. (2017). O sobrenadante foi descartado e os sedimentos de pequenas VEs foram suspensos em 50µL de solução tampão fosfato-salina (DM-PBS).

5.2.4 Análise por rastreamento de nanopartículas

As amostras das pequenas VEs isoladas, após serem diluídas em 50 μ L de PBS livre de cálcio e magnésio, foram analisadas quanto ao tamanho e concentração através do aparelho Nanosight (NS300; NTA 3.1 Build 3.1.45; Malvern). O fator de diluição para todas as amostras foi ajustado para 1:500 em PBS livre de cálcio e magnésio. A análise realizou 5 vídeos de 30 segundos para cada amostra, que foram capturados pela câmera sCMOS em câmera level 12, sob laser verde (532nm) e temperatura controlada de 38,5°C. As análises foram realizadas considerando “threshold” cinco.

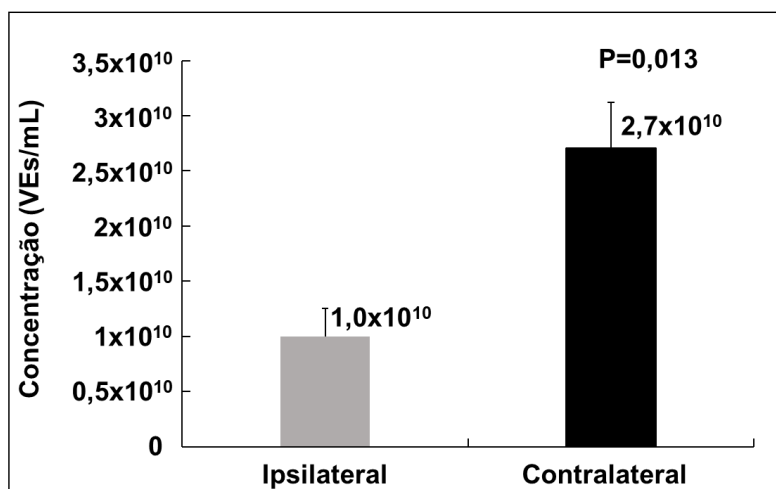
5.2.5 Análise Estatística

Para análise estatística, as variáveis concentração (VEs/mL) e diâmetro (nm) das VEs, foram previamente testadas quanto a normalidade de distribuição dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk e para homogeneidade de variâncias pelo Teste F. Dados considerados paramétricos foram analisados pelo teste T de Student para amostras independentes. Dados considerados não paramétricos foram analisados pelo teste Mann-Whitney. Para análise descritiva, os dados estão apresentados como média \pm erro padrão (M \pm SE). Todas as análises foram realizadas no programa estatístico Minitab® 18.1.1. Para significância estatística foi adotado $p \leq 0,05$ e para tendência estatística um valor de $p \leq 0,10$.

5.3 RESULTADOS

Nesta pesquisa identificamos que a concentração de VEs de amostras oriundas de ovários contralateral (N=5) ao CL é maior quando comparada as amostras de fluido folicular provenientes de ovários ipsilateral (N=5) ao CL, independente de “status” gestacional e do momento em que foi realizada a OPU (figura 6). Não foi possível observar diferença (P=0,606) para a média do diâmetro das VEs para contralateral (161,3 \pm 4,34nm) vs. ipsilateral (163,67 \pm 4,17nm) ao CL.

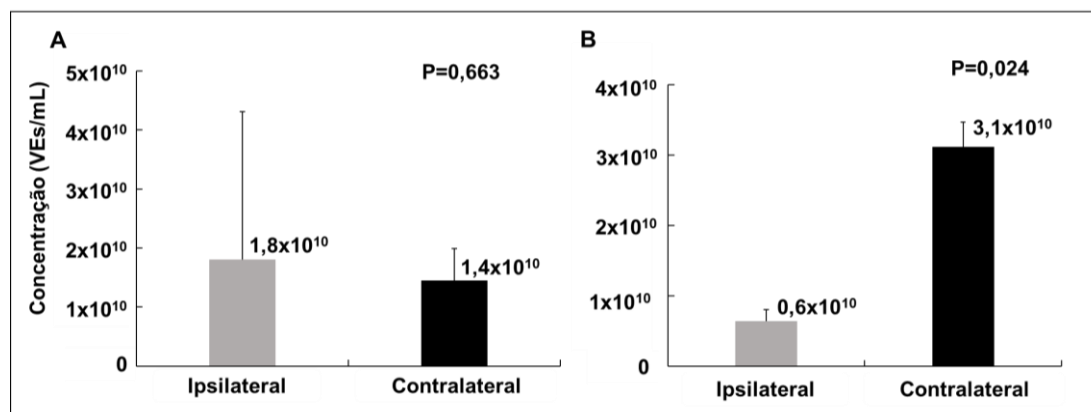
Figura 6 – Concentração média de VEs ($\times 10^{10}/\text{mL}$) ipsilateral vs. contralateral ao CL independente do “status” gestacional e momento da colheita das amostras



A figura demonstra a diferença entre a concentração média de VEs ($\times 10^{10}/\text{mL}$) encontrada no fluido de folículo antral ipsilateral (vacas prenhes e não prenhes) vs. contralateral (vacas prenhes e não prenhes) ao CL, independente do momento em que foi realizada a OPU (1 e 2) para recuperação das amostras. Barras representam média e barras de erro representam erro padrão da média.

Observando separadamente as amostras de fluido folicular de ovários de vacas prenhes (N=3; OPU2), foi possível verificar que a concentração das VEs foi pouco alterada pela presença do CL (ipsilateral vs. contralateral; figura 7-A), bem como o tamanho das VEs encontradas ($172,3 \pm 11,7\text{nm}$ ipsilateral vs. $138,2 \pm 11,0\text{nm}$ contralateral ao CL; $P=0,124$). Porém quando analisamos a mesma variável no grupo de fêmeas não prenhes (N=3; OPU2) é possível identificar a maior concentração de VEs para o fluido folicular recuperado de ovários contralaterais ao CL quando comparado com o fluido folicular de ovários ipsilaterais ao CL (figura 7-B). Não houve diferença ($P=0,16$) para a média do diâmetro das VEs em vacas não prenhes ($173,3 \pm 5,68\text{nm}$ contralateral vs. $158,9 \pm 5,31\text{nm}$ ipsilateral ao CL).

Figura 7 – Análise da concentração média de VEs ($\times 10^{10}/\text{mL}$) ipsilateral vs. contralateral ao CL em vacas não prenhes (A) e prenhes (B)

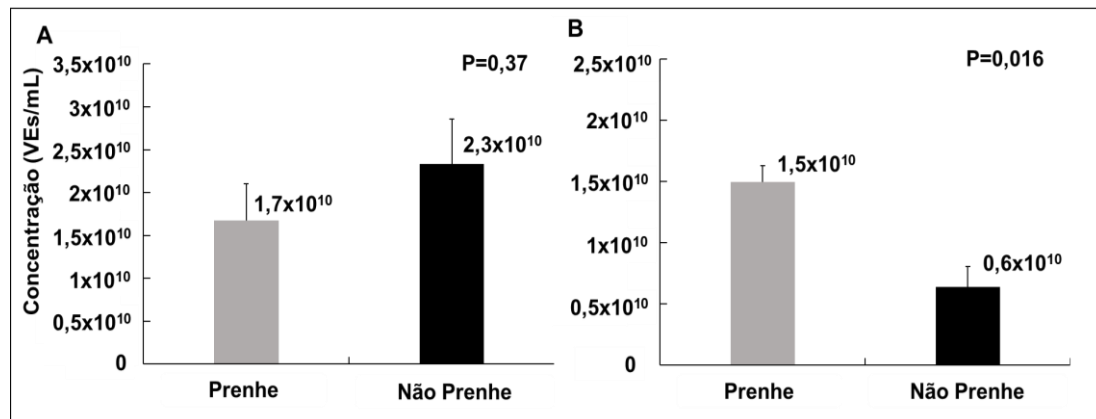


Os resultados mostram a concentração média de VEs ($\times 10^{10}/\text{mL}$) encontrada no fluido de folículo antral colhido separadamente de ovários ipsilateral vs. contralateral ao CL em (A) vacas prenhes e (B) não prenhes no momento da OPU2. Barras representam média e barras de erro representam erro padrão da média.

Além disso, foi possível observar maior concentração de VEs de amostras colhidas somente de ovários ipsilateral ao CL de fêmeas prenhes (N=4) quando comparamos entre amostras de ovários também ipsilateral de fêmeas não prenhes (N=3; figura 8-B). Não houve diferença (P=0,436) para o diâmetro das VEs comparadas as amostras somente de ovários ipsilaterais ($166,94 \pm 7,94\text{nm}$ prenhe vs. $158,87 \pm 5,31\text{nm}$ não prenhes).

Porém, não observamos diferença quando analisamos amostras colhidas somente de ovários contralaterais ao CL de fêmeas prenhes (N=4) entre amostras de ovários também contralaterais ao CL de fêmeas não prenhes (N=5; figura 8-A), bem como não houve diferença (P=0,129) entre o tamanho das VEs ($141,73 \pm 8,51\text{nm}$ prenhe vs. $162,88 \pm 8,51\text{nm}$ não prenhes).

Figura 8 – Concentração média de VEs ($\times 10^{10}/\text{mL}$) presentes no fluido folicular contralateral ao CL de vacas prenhes vs. contralateral ao CL de vacas não prenhes (A), e ipsilateral ao CL de vacas prenhes vs. ipsilateral ao CL de vacas não prenhes (B)



O gráfico presente na figura 8 (A) mostra o resultado da concentração média de VEs ($\times 10^{10}/\text{mL}$) encontrada entre amostras de fluidos folicular recuperadas de ovários contralaterais ao CL para fêmeas prenhes vs. não prenhe. E o gráfico apresentado em (B) mostra a maior concentração de VEs ($\times 10^{10}/\text{mL}$) encontradas em amostras de fluido folicular recuperadas de ovários ipsilaterais em fêmeas prenhes quando comparado com as amostras ipsilaterais de fêmeas não prenhes. Barras representam média e barras de erro representam erro padrão da média.

5.4 DISCUSSÃO

É a primeira vez que um estudo descreve a influência do CL sobre a concentração das VEs no fluido de folículos adjacentes. Em nosso estudo encontramos maior concentração de VEs ($\leq 200\text{nm}$) presentes no fluido de folículos provenientes de ovários contralaterais ao CL quando comparado com amostras provenientes dos ovários ipsilaterais ao CL, indicando que há possível mudança na comunicação intercelular no microambiente folicular dependente da presença do CL. O futuro entendimento da informação carregada pelas VEs no fluido folicular pode auxiliar na escolha ou manipulação do ciclo estral das fêmeas bovinas para coincidir com a recuperação de complexos *cumulus* oócitos (COC's) de maior competência para a produção *in vitro* de embriões, por exemplo, proporcionando maior desempenho reprodutivo para as fêmeas leiteiras de alta produção.

Nesse sentido, em nosso estudo podemos afirmar que a presença ou ausência do CL modula de forma distinta o microambiente folicular, mas ainda não é possível determinar qual o real impacto para a maturação e competência oocitária, bem

como para o desenvolvimento embrionário precoce. Em outro estudo, realizado com fluido folicular bovino, foi possível comprovar que os exossomos representam alterações fisiológicas no microambiente folicular (SOHEL et al., 2013), o que possivelmente explica os resultados encontrados em nossa pesquisa, onde o rearranjo morfológico, endócrino e vascular promovido pela formação do CL no ovário, foi capaz de modular o número de VEs dos folículos ao seu redor.

Quando analisamos o grupo de fêmeas não prenhes, a diferença na concentração de VEs entre fluido folicular recuperado do ovário contralateral *vs.* Ipsilateral ao CL é melhor evidenciada. No entanto, quando avaliamos o mesmo grupo (ipsilateral *vs.* contralateral) para as fêmeas prenhes, não foi possível observar diferença estatística para a concentração de VEs. Este resultado indica que a alteração fisiológica causada no líquido folicular por um CL gestacional pode não ser a mesma provocada pelo CL gerado durante o ciclo estral ovulatório.

Outros fatores como a dinâmica do ciclo estral bovino composto por ondas foliculares, controladas por variações dos hormônios e seus receptores também são capazes de afetar o microambiente folicular (ADAMS et al., 2008). De Ávila e colaboradores (2019) caracterizaram as VEs presentes no líquido de folículos expostos a alta e baixa concentração de P4, para fêmeas não prenhes, e confirmaram a alteração no perfil de microRNAs transportados por essas vesículas, porém não encontraram diferença na concentração de VEs. Tais resultados diferiram dos encontrados no presente estudo, onde observamos alteração na concentração de VEs. Provavelmente, isso se deve ao fato de que De Ávila et al. (2019) analisaram o microambiente folicular sob influência de diferentes níveis de P4 a partir de diferentes momentos do ciclo estral, sem considerar a presença ipsilateral ou contralateral do CL no ovário como um fator também responsável por modular a comunicação célula-célula.

Para comprovar nossa hipótese de que o CL gestacional, pode modular o microambiente folicular de forma distinta do CL do diestro, oriundo de fêmeas cíclicas, comparamos a concentração de VEs provenientes do líquido folicular ipsilateral ao CL de fêmeas prenhes *vs.* não prenhes. Dessa forma, foi possível observar que as fêmeas prenhes possuem maior concentração de VEs em relação as fêmeas não prenhes para amostras de fluidos antrais ipsilaterais ao CL. Demais estudos apontaram a prenhez como um fator importante por coordenar a função das VEs. Em ovelhas prenhes, foi verificado que as VEs secretadas no lúmen uterino estimulam as linhas celulares trofoectodérmicas a proliferar e secretar interferon tau, promovendo o sinal de reconhecimento da prenhez

(RUIZ-GONZALEZ et al., 2015). Porém não foi observado se houve alguma alteração no microambiente dos folículos antrais desses animais (RUIZ-GONZALEZ et al., 2015).

Devido a informação diferenciada que as VEs transportam, de acordo com as alterações fisiológicas ou patológicas, as mesmas têm sido usadas como marcadores da gestação e de doenças relacionadas à gravidez em seres humanos (TSOCHANDARIDIS et al., 2015). Desse modo, foi comprovado que a prenhez é capaz de modular o ambiente uterino, causar mudanças detectáveis nas VEs do plasma sanguíneo, sendo assim uma forma de diagnóstico facilitado de prenhez ou de doenças.

Em um estudo conduzido por pesquisadores da Nova Zelândia, as VEs do plasma sanguíneo foram utilizadas como método de diagnóstico e pesquisa de marcador molecular para a fertilidade e prenhez (MITCHELL et al., 2016). As fêmeas bovinas da raça holandesa, foram segregadas pela linhagem genética e perfil fenotípico para fertilidade em dois grupos: “fértil” e “subfértil”, sendo possível observar que animais do grupo “fértil” apresentaram maior concentração de exossomos no plasma sanguíneo quando comparado ao grupo “subfértil”, indicando que a concentração de exossomos pode contribuir com a saúde e fertilidade das vacas.

De maneira inovadora, o presente estudo identificou que a presença ou ausência de CL, e o “status” gestacional, podem modular a concentração de VEs no fluido folicular. Todavia, não foi possível verificar se a mesma alteração gerada no microambiente folicular pode ser encontrada no plasma sanguíneo, e consequentemente correlacionada com a eficiência reprodutiva desses animais. Com isso, entendemos que mais pesquisas são necessárias para determinar o significado funcional das maiores concentrações de VEs, provenientes tanto do fluido folicular quanto do plasma sanguíneo nas vacas de leite, e se isso tem efeitos positivos na saúde e, em particular, nos resultados de fertilidade.

A concentração e a média do diâmetro das VEs presentes no fluido folicular provenientes dos ovários contralaterais ao CL de vacas prenhes *vs.* não prenhes, diferiram. Sohel e colaboradores (2013) identificaram que o diâmetro e a concentração das VEs presentes no fluido folicular podem ser alterados conforme o diâmetro folicular e o período de desenvolvimento do oócito ao longo do ciclo estral. Neste estudo o diâmetro do folículo e o período do ciclo estral em que as amostras de fluido folicular foram obtidas foram padronizados, o que pode explicar os resultados encontrados. Porém, o fato de a concentração e diâmetro de VEs, não ter demonstrado diferença entre os grupos

com CL contralateral, não permite inferir se houve alteração no conteúdo e nas funções exercidas pelas VEs.

Corroborando nossos resultados, De Ávila et al. (2019) também não encontraram diferença na média do diâmetro das VEs, porém, quando analisaram o conteúdo da informação genética presente nas mesmas, foi possível identificar a influência dos níveis de alta (9,33 ng de P4/mL) vs. baixa (4,87 ng de P4/mL) concentração de P4 intrafolicular sobre as VEs. Dessa maneira, ainda se faz necessário um estudo mais detalhado sobre a influência e funções exercidas pelo conteúdo das VEs presente no fluido folicular de acordo com a presença e ausência do CL, bem como em relação ao “status” gestacional das vacas de alta produção de leite.

6 CONCLUSÃO

Em nosso estudo, foi possível confirmar que a presença ou ausência do CL, bem como o “status” gestacional da fêmea bovina exerce influência sobre o número de VEs presentes no fluido dos folículos adjacentes.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A concentração de VEs foi maior para as amostras de fluido folicular recuperado contralateral ao CL em comparação ao fluido recuperado ipsilateral, independente do “status” gestacional;
- Fêmeas bovinas cíclicas apresentam maior concentração de VEs no fluido folicular recuperado de folículos contralaterais ao CL;
- Fêmeas prenhes não apresentam diferença na concentração de VEs obtida do fluido folicular contralateral ou ipsilateral ao CL.
- As amostras de fluido folicular recuperadas de ovários ipsilaterais ao CL apresentaram maior concentração de VEs em vacas prenhes se comparadas com o fluido ipsilateral das vacas não prenhes;
- As amostras de fluido folicular recuperadas de ovários contralaterais ao CL não apresentaram diferença entre vacas prenhes e não prenhes;

O papel das VEs ainda deve ser melhor estudado com o objetivo de promover um entendimento detalhado de suas contribuições para a competência e maturação do oócito, bem como na série de eventos que envolvem a fecundação e implantação embrionária, além do reconhecimento materno tanto em casos normais quanto nos casos patológicos. Isto deve contribuir para o desenvolvimento de ferramentas valiosas que podem ser usadas a favor da saúde e da eficiência reprodutiva das vacas de leite de alta produção.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, G. P.; JAISWAL, R.; SINGH, J. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. **Theriogenology**, v.69, n. 1, p.72-80, 2008.
- APARICIO, I. M., GARCIA-HERREROS, M.; O'SHEA, L. C.; HENSEY, C.; LONERGAN, P.; FAIR, T. Expression, regulation, and function of progesterone receptors in bovine cumulus oocyte complexes during in vitro maturation. *Biology of reproduction*, v. 84, n. 5, p. 910-921, 2011.
- BERKOWICZ, E. W.; MAGEE, D. A.; SIKORA, K. M.; BERRY, D. P.; HOWARD, D. J.; MULLEN, M. P.; MACHUGH, D. E. Single nucleotide polymorphisms at the imprinted bovine insulin-like growth factor 2 (IGF2) locus are associated with dairy performance in Irish Holstein-Friesian cattle. **Journal of dairy research**, v. 78, n. 1, p. 1-8, 2011.
- BERRY, D. P.; WALL, E.; PRYCE, J. E. Genetics and genomics of reproductive performance in dairy and beef cattle. **Animal**, v. 8, n. s1, p. 105-121, 2014.
- BOUQUET, ALBAN; JUGA, JARMO. Integrating genomic selection into dairy cattle breeding programmes: a review. **Animal**, v. 7, n. 5, p. 705-713, 2013.
- DA SILVEIRA, J. C.; VEERAMACHANENI, D. N. R.; WINGER, Q. A.; CARNEVALE, E. M.; BOUMA, G. J. Cell-secreted vesicles in equine ovarian follicular fluid contain miRNAs and proteins: A possible new form of cell communication within the ovarian follicle. **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 3, p. 71–71, 2012.
- DE ÁVILA, A. C. F. C.; BRIDI, A.; ANDRADE, G. M.; DEL COLLADO, M.; SANGALLI, JR; NOCITI, R. P.; & PERECIN, F. Estrous cycle impacts miRNA content in extracellular vesicles that modulate bovine *cumulus* cell transcripts during *in vitro* maturation. **Biology of Reproduction**, 2019.
- KENIGSBERG, S.; WYSE, B. A.; LIBRACH, C. L.; DA SILVEIRA, J. C. **Protocol for Exosome Isolation from Small Volume of Ovarian Follicular Fluid: Evaluation of Ultracentrifugation and Commercial Kits**. In: *Extracellular Vesicles*. Humana Press, New York, NY, 2017. p. 321-341.
- LEE, T. H., D'ASTI, E.; MAGNUS, N.; AL-NEDAWI, K.; MEEHAN, B.; RAK, J. Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer—the emerging science of cellular ‘debris’. In: **Seminars in immunopathology**. Springer-Verlag, 2011. p. 455-467.
- MAGEE, D. A.; SIKORA, K. M.; BERKOWICZ, E. W.; BERRY, D. P.; HOWARD, D. J.; MULLEN, M. P.; MACHUGH, D. E. DNA sequence polymorphisms in a panel of eight candidate bovine imprinted genes and their association with performance traits in Irish Holstein-Friesian cattle. **BMC genetics**, v. 11, n. 1, p. 93, 2010.

MELO, S. A.; LUECKE, L. B.; KAHLERT, C.; FERNANDEZ, A. F.; GAMMON, S. T.; KAYE, J.; REISSFELDER, C. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. **Nature**, v. 523, n. 7559, p. 177, 2015.

MIGLIOR, F. FLEMING, A.; MALCHIODI, F.; BRITO, L. F.; MARTIN, P.; BAES, C. F. A 100-Year Review: Identification and genetic selection of economically important traits in dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 100, n. 12, p. 10251-10271, 2017.

MITCHELL, M. D.; SCHOLZ-ROMERO, K.; REED, S.; PEIRIS, H. N.; KOH, Y. Q.; MEIER, S.; SALOMON, C. Plasma exosome profiles from dairy cows with divergent fertility phenotypes. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 9, p. 7590-7601, 2016.

MOBARAK, H.; HEIDARPOUR, M.; LOLICATO, F.; NOURI, M.; RAHBARGHAZI, R.; MAHDIPOUR, M. Physiological impact of extracellular vesicles on female reproductive system; highlights to possible restorative effects on female age-related fertility. **BioFactors**, 2019.

RUIZ-GONZÁLEZ, I.; Xu, J.; WANG, X.; BURGHARDT, R. C.; DUNLAP, K. A.; BAZER, F. W. Exosomes, endogenous retroviruses and toll-like receptors: pregnancy recognition in ewes. **Reproduction**, v. 149, n. 3, p. 281-291, 2015.

SANTONOCITO, M.; VENTO, M.; GUGLIELMINO, M. R.; BATTAGLIA, R.; WAHLGREN, J.; RAGUSA, M.; & SCOLLO, P. Molecular characterization of exosomes and their microRNA cargo in human follicular fluid: bioinformatic analysis reveals that exosomal microRNAs control pathways involved in follicular maturation. **Fertility and sterility**, v. 102, n. 6, p. 1751-1761. e1, 2014.

SENEDA, M. M.; MOROTTI, F.; ZANGIROLAMO, A. F.; SILVA, N. C.; SANCHES, T. K.; BLASCHI, W.; BARREIROS, T. R. R. Antral follicle population in prepubertal and pubertal heifers. **Reproduction fertility and development**, v. 31, p. 10, 2019.

SOHEL, M. M. H.; HOELKER, M.; NOFERESTI, S. S.; SALILEW-WONDIM, D.; THOLEN, E.; LOOFT, C.; & TESFAYE, D. Exosomal and non-exosomal transport of extra-cellular microRNAs in follicular fluid: implications for bovine oocyte developmental competence. **PloS one**, v. 8, n. 11, p. e78505, 2013.

SILVA, L. A.; Ginther, O. J. Local effect of the conceptus on uterine vascular perfusion during early pregnancy in heifers. **Reproduction**, v. 139, n. 2, p. 453, 2010.

TSOCHANDARIDIS, M.; NASCA, L.; TOGA, C.; LEVY-MOZZICONACCI, A. Circulating microRNAs as clinical biomarkers in the predictions of pregnancy complications. **BioMed research international**, v. 2015, p. 294954; 2015.