

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

WINNY CALDAS MORENO TAVARES

**REDUÇÃO DE 1 °C DE TEMPERATURA ALTERA PROTEÍNAS ASSOCIADAS AO
METABOLISMO DE OÓCITOS BOVINOS MATURADOS *IN VITRO***

Campos dos Goytacazes

Março de 2021

WINNY CALDAS MORENO TAVARES

**REDUÇÃO DE 1 °C DE TEMPERATURA ALTERA PROTEÍNAS ASSOCIADAS AO
METABOLISMO DE OÓCITOS BOVINOS MATURADOS *IN VITRO***

**Dissertação apresentada ao
Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias
da Universidade Estadual do
Norte Fluminense Darcy
Ribeiro como requisito
parcial para a obtenção do
grau de Mestre em Ciência
Animal, na área de
concentração de Produção e
Reprodução Animal.**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Clara Caldas Bussiere

Campos dos Goytacazes

Março de 2021

REDUÇÃO DE 1 °C DE TEMPERATURA ALTERA PROTEÍNAS ASSOCIADAS AO METABOLISMO DE OÓCITOS BOVINOS MATURADOS *IN VITRO*

WINNY CALDAS MORENO TAVARES

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal, na área de concentração de Produção e Reprodução Animal.

Aprovado em 25/03/2021.

Dr. Angelo José Burla Dias (Doutor, Biociências e Biotecnologia) – UENF

Dr^a. Fabíola Freitas de Paula Lopes (Doutora, Animal Sciences) – UNIFESP

Dr. Ivan Cunha Bustamante Filho (Doutor, Zootecnia) – UNIVATES

Dr. Ribrio Ivan Tavares Pereira Batista (Doutor, Ciências Veterinárias) – UFF

Dr. Vanildo Silveira (Doutor, Biotecnologia) – UENF

Dr^a. Maria Clara Caldas Bussiere (Doutora, Ciências) – UENF

(Orientadora)

DEDICATÓRIA

À quem me amparou nos momentos difíceis e comemorou comigo, com alegria genuína, os momentos bons: Ivana, Dyrk e Vinicius.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus por permitir que eu acorde todos os dias e tenha força para alcançar meus objetivos;

À minha mãe Ivana e minha avó Dyrk (*in memoriam*), por participarem ativamente de todas as passagens da minha vida, comemorando até as menores conquistas e por todo amor a mim dispensados. Sem vocês nada disso seria possível;

Ao meu noivo, Vinicius, pela parceria na pesquisa e na vida. Pela companhia nas viagens ao abatedouro, quando ficou comigo muitas madrugadas no laboratório para que me sentisse mais segura, por compartilhar comigo seus conhecimentos teóricos e práticos, além de livros e artigos científicos e, também, por ser meu porto-seguro nos momentos de ansiedade;

À minha orientadora, Prof^a. Maria Clara Caldas Bussiere, pela oportunidade concedida e pelos ensinamentos;

As empresas Frígua – Frigorífico Guarus e Frigorífico Aliança pela concessão da matéria-prima necessária para realização dos treinamentos e experimentos;

Ao Prof. Vanildo Silveira e Dr. Vitor Batista Pinto pela disponibilidade, parceria e paciência no desenvolvimento do projeto;

Ao Prof. Ivan Cunha Bustamante Filho pelo apoio e parceria no desenvolvimento das análises bioinformáticas;

Às técnicas de laboratório Carla, Bruna e Vânia pela indispensável colaboração na pesquisa, pelos conselhos e trocas de experiências;

Aos professores e colegas do Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal por todos os aprendizados;

A todos os membros do Setor de Biotecnologia e Desenvolvimento Animal do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos da FIOCRUZ por abrirem as portas para mim, quando ainda estava no início da graduação, para o universo das biotecnologias reprodutivas, especialmente à Dr^a. Janaína Barcelos Porto Ferreira pelo incentivo ao ingresso no Mestrado;

Aos queridos professores e amigos Expedito de Barros Coelho e Dr^a. Joanna Maria Gonçalves de Souza Fabjan por me incentivarem e acreditarem no meu potencial desde o início da graduação, pela sensibilidade, companheirismo e todo carinho a mim dispensados, além dos inesquecíveis momentos de descontração. Vocês são para mim uma inspiração enquanto ser humano e profissional;

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

Muito obrigada!

EPÍGRAFE

“(...) Que a vossa proteção conserve meu coração simples e sincero para que sirvam também para mim as palavras de Jesus: ‘Deixai vir a mim os pequeninos, porque deles é o Reino do Céu’.”

Oração a São Cosme e São Damião

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da diminuição da temperatura durante a maturação *in vitro* (MIV) em relação à utilizada rotineiramente nos protocolos de produção *in vitro* de embriões da espécie bovina no que concerne o perfil proteômico dos oócitos. Complexos *cumulus*-oócito (CCOs) obtidos de ovários de abatedouro local foram maturados *in vitro* a 38,5 °C (controle) ou a 37,5 °C. Avaliou-se a taxa de maturação nuclear dos oócitos por visualização da extrusão do primeiro corpúsculo polar e o grau de expansão do *cumulus* por metodologia de classificação subjetiva, de acordo com os espaços entre as células do *cumulus*. Após desnudamento, a quantificação das proteínas nos oócitos foi avaliada por nanoAcquity UPLC (nUPLC), conectado a um espectrômetro de massas Synapt G2-Si HDMS 210, com n=1500, em três replicatas. A partir das ferramentas de bioinformática foi possível analisar a função molecular, componente celular, processo biológico e vias de sinalização ao qual as proteínas encontradas estão relacionadas; avaliar a rede de interação proteína-proteína e os miRNAs associados aos genes reguladores das proteínas observadas na análise proteômica. Os dados foram submetidos à análise de variância ou ao teste “t” de Student, a 5% de probabilidade. Não foi observada diferença entre os grupos nas análises de maturação nuclear ($P>0,05$) e expansão do *cumulus* ($P>0,05$). O perfil proteico consistiu em 806 proteínas em comum aos dois grupos, aonde sete foram *up*-reguladas e 12 *down*-reguladas, além de 12 proteínas únicas do grupo controle e oito únicas do grupo 37,5 °C. O grupo controle apresentou proteínas únicas relacionadas a respiração celular e progressão da meiose, enquanto o grupo 37,5 °C apresentou proteínas únicas relacionadas ao dobramento de proteínas e inibição do processo de apoptose. Além disso, relatou-se acúmulo diferencial de diversas proteínas que atuam em diferentes vias metabólicas de oócitos. Conclui-se que, apesar de pequena, a diminuição da temperatura de incubação dos oócitos na MIV acarreta alterações no perfil proteômico destas células, sugerindo uma termorregulação na expressão de genes de oócitos bovinos maturados *in vitro*.

Palavras-chave: MIV, termossensível, gado, espectrometria de massas.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the effect of decreasing the temperature during *in vitro* maturation (IVM) in relation to that used routinely in the bovine *in vitro* embryo production protocols regarding the oocyte proteomic profile. Cumulus-oocyte complexes (CCOs) obtained from local slaughterhouse ovaries were matured *in vitro* at 38.5 °C (control) or at 37.5 °C. The nuclear oocyte maturation rate was evaluated by visualizing the extrusion of the first polar corpuscle and the degree of cumulus expansion by subjective classification methodology, according to the spaces between the cumulus cells. After denuding the CCOs, the quantification of proteins in the oocytes was evaluated by nanoAcquity UPLC (nUPLC), connected to a Synapt G2-Si HDMS 210 mass spectrometer, with $n=1500$, in three replicates. From the bioinformatics tools it was possible to analyze molecular function, cellular component, biological process and signaling pathways to which the proteins found are related; to evaluate the protein-protein interaction network and the miRNAs associated with the protein regulatory genes observed in the proteomic analysis. Data were subjected to either analysis of variance or by Student's "t" test, at 5% probability. There was no difference between groups in the nuclear maturation ($P > 0.05$) and cumulus expansion ($P > 0.05$) analyses. The protein profile consisted in 806 proteins in common to the two groups, where five were up-regulated and 12 down-regulated, in addition to 12 proteins unique to the control group and eight unique to the 37.5 °C group. The control group presented unique proteins related to cell respiration and progression of meiosis, while the group 37.5 °C presented unique proteins related to protein folding and inhibition of the apoptosis process. In addition, differential accumulation of several proteins has been reported acting on different metabolic pathways of oocytes. In conclusion, despite being small, the decrease in the incubation temperature of oocytes during IVM causes alterations in the proteomic profile of these cells, suggesting a thermoregulation in the expression of genes from bovine oocytes matured *in vitro*.

Key words: IVM, thermosensitive, cattle, mass spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Diagrama de Venn demonstrando a distribuição das proteínas identificadas no oócito bovino maturado <i>in vitro</i> a 38,5 °C (controle) e 37,5 °C.	90
Figura 2 Distribuição das proteínas identificadas em oócitos bovinos maturados <i>in vitro</i> a 38,5 °C (controle) e 37,5 °C de acordo com (A) processo biológico, (B) função molecular e (C) componente celular.	91
Figura 3 Análise dos genes expressos em oócitos maturados <i>in vitro</i> a 38,5 °C (controle) e 37,5 °C. (A) Vias <i>hallmark</i> indicando as vias de sinalização mais prevalentes dentro do conjunto de genes do MSigDB. (B) Vias KEGG indicando as vias de sinalização mais prevalentes.	93
Figura 4 Análise <i>in silico</i> da rede de interação proteína-proteína gerado utilizando String V.11 a partir das proteínas identificadas em oócitos bovinos maturados <i>in vitro</i> a 38,5 °C (controle) e 37,5 °C. As cores de fundo indicam as proteínas <i>up</i> -reguladas ou únicas de cada grupo. As cores das esferas representam diferentes termos e classificações de ontologia gênica. Função molecular: proteína de ligação do citoesqueleto (GO:0008092) (verde escuro) e ligação de nucleotídeo (GO: 0000166) (roxo); Vias metabólicas: metabolismo do piruvato e ciclo do ácido tricarboxílico (BTA: 71406) (vermelho), regulação da atividade de PLK1 na transição para a fase G2 da meiose (BTA: 2565942) (amarelo), biogênese e manutenção de organelas (BTA: 1852241) (azul), tráfego de membrana (BTA: 199991) (verde claro). RAB2B: proteína não caracterizada; RAB8A: proteína não caracterizada; GDI1: inibidor da dissociação de Rab GDP; TPM1: proteína não caracterizada; PRDX4: peroxirredoxina 4; DYNLL1: dineína de cadeia leve; IDH3A: isocitrato desidrogenase dependente de NAD, subunidade	95

mitocondrial; NME1: nucleosídeo-difosfato-kinase; IDH2: isocitrato desidrogenase dependente de NADP; DES: proteína de domínio de ligação IF rod; TUBA1A: cadeia de tubulina alfa; PPA1: pirofosfatase inorgânica; NME2: nucleosídeo-difosfato-kinase; GAPDHS: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; LDHC: L-lactato desidrogenase.

Figura 5 Análise da rede e análise de enriquecimento de conjunto de genes de miRNA bovino (quadrados) associados a genes (círculos) diferencialmente expressos em oócitos bovinos maturados *in vitro* a 38,5 °C (controle) e 37,5 °C. Esquema e análise obtidos por miRNet 2.0. **96**

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 Lista de artigos referente ao número de proteínas identificadas e número de oócitos utilizados em estudos proteômicos com oócitos de diferentes espécies.	31
Tabela 2 Efeito da diminuição da temperatura durante a MIV na maturação nuclear e na expansão do <i>cumulus</i> .	86
Tabela 3 Proteínas diferencialmente acumuladas/únicas e seus respectivos código de acesso, contagem de peptídeos, <i>score</i> , cobertura de sequência, descrição, processo biológico, gene relacionado e <i>fold-change</i> em oócitos maturados a 37,5 °C comparado ao controle.	87

LISTA DE ABREVIações

AA	Antibiótico e antimicótico
ATP	Adenosina trifosfato
BMP15	Proteína morfogenética óssea 15
BUB1B	Ponto de verificação mitótico serina/treonina-proteína quinase BUB1 beta
CARHSP1	Proteína 1 estável ao calor regulada por cálcio
CCNB1	G2/ciclina-B1 específica para mitose
CCO	Complexo <i>cumulus</i> -oócito
CLU	Clusterina
DES	Desmina
DIA	Aquisição independente de dados
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMT1	DNA-metiltransferase 1
DTT	Ditiotreitol
DYNLL1	Dineína de cadeia leve
eEF1A	Fator de alongamento de tradução eucariótica 1 alfa 1
EGF	Fator de crescimento epidermal
EIF	Fatores de iniciação eucariótica
ESI-LC-MS/MS	Ionização por electrospray, cromatografia líquida e espectrometria de massas
FARSA	Cadeia alfa da fenilalanil-tRNA sintetase
FASP	Preparação de amostra auxiliada por filtro

FC	<i>Fold-change</i>
FGF16	Fator de crescimento de fibroblastos 16
FSH	Hormônio folículo-estimulante
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GC	Grânulo cortical
GDF9	Fator de crescimento/diferenciação 9
GTP	Trifosfato de guanosina
H4	Histona H4
HMOX2	Heme oxigenase 2
HO	Heme oxigenase
HO-1	Heme oxigenase 1
hnRNP	Ribonucleoproteína nuclear heterogênea
HnRNPA2B1	Ribonucleoproteína nuclear A2/B1
HSF1	Fator de choque térmico 1
HSP70	Proteína do choque térmico família A membro 6
IBMX	3-isobutil-1-metilxantina
IDH	Isocitrato desidrogenase
IDH2	Isocitrato desidrogenase [NADP] mitocondrial
JG	Junção gap
KRT75	Queratina 75
LDH	Lactato desidrogenase
LDHC	L-lactato desidrogenase
LH	Hormônio luteinizante
MAD2	Parada mitótica deficiente 2
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno

M I	Metáfase I
M II	Metáfase II
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
MOS	Proto-oncogene serina/treonina-proteína quinase
MPF	Fator de promoção de maturação
miRNA	Micro ácido ribonucleico
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NAD-IDH	Isocitrato desidrogenase dependente de NAD
NADP-IDH	Isocitrato desidrogenase dependente de NADP
NDK	Nucleosídeo-difosfato-quinase
NMP2	Proteína de matriz nuclear específica de tecido 2
nUPLC	Nano acquity UPLC
OPU	<i>Ovum pick-up</i>
PBS	Tampão fosfato salino
PCNA	Antígeno nuclear da célula proliferante
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
POU5F1	Fator de transcrição de ligação de octâmero 4
PPiase	Peptidil-prolil cis-trans isomerase
PRDX4	Peroxirredoxina 4

PVA	Álcool polivinílico
RE	Retículo endoplasmático
r-hFSH	Hormônio folículo-estimulante recombinante
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RNA	Ácido ribonucleico
RNApi	Ácido ribonucleico polimerase I
RPL15	Proteína ribossomal 60S L15
S100A10	Proteína A10 de ligação ao cálcio S100
SFB	Soro fetal bovino
SPOM	Simulação fisiológica da maturação oocitária
TCM	Meio de cultura de tecidos
TDRKH	Proteína que contém o domínio Tudor e KH
TE	Transferência de embriões
TFA	Ácido trifluoroacético
TP53	Proteína de tumor
TRX	Tioredoxina
TXNDC9	Proteína 9 que contém domínio de tioredoxina
VG	Vesícula germinativa
Vtg7	Vitelogenina 7
WEE2	Proteína kinase 2 do tipo WEE1
YWHA	Proteína de ativação de tirosina 3-monooxigenase/triptofano 5-monooxigenase
ZP3	Glicoproteína 3 da zona pelúcida

SUMÁRIO

Resumo	07
Abstract	08
Lista de figuras	09
Lista de tabelas	11
Lista de abreviações	12
1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo geral	19
2.2. Objetivos específicos	19
<u>CAPÍTULO 1</u>	<u>20</u>
3. REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1. Maturação oocitária	20
3.1.1. Maturação nuclear	20
3.1.2. Maturação citoplasmática	21
3.1.3. Maturação molecular	22
3.2. Temperatura utilizada na MIV vs. temperatura intrafolicular em bovinos	24
3.3. Efeito da hipertermia no complexo <i>cumulus</i> -oócito e no embrião bovino	26
3.4. Análises proteômicas de oócitos	29
3.5. Referências	34
<u>CAPÍTULO 2</u>	<u>49</u>
4. Artigo efeito da diminuição da temperatura durante a maturação <i>in vitro</i> no perfil proteômico de oócitos bovinos	49
Resumo	49
Palavras-chave	50
Abstract	50
Key words	51
Introdução	52
Material e métodos	54
Resultados	60
Discussão	61
Conclusão	66
Referências	67

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, 345.528 embriões oriundos da produção *in vitro* foram produzidos em 2017, representando 76,2% dos embriões produzidos *in vitro* na América do Sul (BARUSELLI *et al.*, 2019). No mundo todo, a produção *in vitro* de embriões (PIVE) cresceu 48,9% ao passo que os embriões produzidos *in vivo* para programas de transferência de embriões (TE) demonstraram queda de 21,7%. Atualmente, no cenário mundial, temos 992.289 embriões produzidos *in vitro* e 459.054 embriões produzidos *in vivo*. A América do Sul era a maior produtora de embriões *in vitro* desde 2005, contudo, em 2017 a América do Norte passou à frente (VIANA, 2018).

A PIVE na espécie bovina iniciou-se com o uso de oócitos oriundos de fêmeas que eram designadas ao descarte. Essa forma de obtenção de gametas femininos foi importante para o desenvolvimento da técnica, porém não trouxe grandes avanços ao melhoramento genético (PIETERSE *et al.*, 1991). No início dos anos 90, os primeiros trabalhos com oócitos obtidos por aspiração via transvaginal de fêmeas vivas (*ovum pick-up* – OPU) foram publicados, trazendo uma nova perspectiva à PIVE. Após a coleta dos complexos cumulus-oócitos (CCOs), a maturação *in vitro* (MIV) é o primeiro passo, seguida da fertilização *in vitro* e posterior cultivo embrionário *in vitro* (KRUIP *et al.*, 1991).

O processo de maturação dos oócitos é um evento chave para um bom resultado de fertilização e desenvolvimento embrionário. Ainda durante a vida fetal, os oócitos iniciam a meiose, porém ficam parados no estágio de vesícula germinativa (VG), na prófase I, até que recebam estímulos para retomada da meiose e posterior ovulação ou atresia (LONERGAN; FAIR, 2016). Com a retomada da meiose e progressão do processo de maturação, estes oócitos alcançam a metáfase II (M II), que é caracterizada pela extrusão do primeiro corpúsculo polar, permanecendo nessa fase até a sua fertilização (HOLT; JONES, 2009).

A competência de um oócito é definida por sua capacidade de maturação, fertilização e desenvolvimento até o estágio de blastocisto (FAIR *et al.*, 1995). A capacidade de desenvolvimento do oócito é relacionada aos seguintes fatores: tamanho do folículo antral de onde foi recuperado (LONERGAN *et al.*, 1994), ao estágio da onda folicular (HENDRIKSEN *et al.*, 2004; MACHATKOVA *et al.*, 2004) e se a maturação ocorreu *in vivo* ou *in vitro* (LEIBFRIED-RUTLEDGE *et al.*, 1987; VAN

DE LEEMPUT *et al.*, 1999; DIELEMAN *et al.*, 2002; RIZOS *et al.*, 2002). Dada a sua importância no processo da PIVE, grandes esforços têm sido realizados com o intuito de mimetizar as condições observadas *in vivo* durante a MIV (TUKUR *et al.*, 2020). Destacam-se os estudos da composição do meio de cultivo em protocolos que promovam a sincronia das maturações nuclear e citoplasmática, como o método *simulated physiological oocyte maturation* (SPOM), ou seja, de simulação fisiológica da maturação oocitária (ALBUZ *et al.*, 2010; LEAL *et al.*, 2018).

Em relação à temperatura de incubação, os estudos com o intuito de mimetizar *in vitro* as condições térmicas observadas no folículo pré-ovulatório bovino *in vivo* são poucos e os resultados são conflitantes. A temperatura de 38,5 °C é utilizada nos protocolos de MIV por ter apresentado bons índices nos testes de fertilização e por ser considerada a mesma temperatura encontrada nos órgãos abdominais (LENZ *et al.*, 1983; HUNTER, 2012). Porém, no folículo pré-ovulatório, foi descrito que a temperatura encontrada é, em média, 1 °C menor que a temperatura retal em bovinos (LÓPEZ-GATIUS; HUNTER, 2019a; LÓPEZ-GATIUS; HUNTER, 2019b). Os estudos que avaliaram a utilização de menores temperaturas de incubação na MIV foram publicados nos anos 80 (LENZ *et al.*, 1983; KATSKA; SMORAG, 1985), final dos anos 90 (SHI *et al.*, 1998), 2018 (SEN; KURAN, 2018) e 2020 (PÖHLAND *et al.*, 2020). Contudo, não há na literatura, muitos dados sobre os aspectos moleculares dessa diminuição de temperatura *in vitro*. Estas análises podem identificar os mecanismos de proteção que são utilizados pelo oócito em situações de estresse metabólico, dando suporte aos estudos futuros que visem a melhoria da qualidade dos embriões produzidos em diferentes circunstâncias. Sendo assim, hipotetiza-se que CCOs cultivados em temperatura termoneutra durante a MIV apresentarão alterações em seu perfil proteômico, levando a uma competência oocitária distinta, otimizando futuramente os resultados da PIVE bovina.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Comparar o perfil proteômico de oócitos bovinos maturados *in vitro* a 38,5 °C vs. 37,5°C para identificar as mudanças no mesmo que possam alterar o desempenho destes oócitos em etapas posteriores à maturação *in vitro*, otimizando assim, os resultados da produção *in vitro* de embriões bovinos.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar os seguintes parâmetros de oócitos bovinos após a MIV realizada em temperatura de 38,5 °C (controle) e 37,5 °C:

- Expansão das células do *cumulus*;
- Taxa de maturação nuclear;
- Perfil proteômico diferencial de oócitos;
- Função molecular, componente celular, processo biológico e vias de sinalização ao qual as proteínas encontradas estão relacionadas, além da rede de interação proteína-proteína e os miRNAs associados aos genes reguladores das proteínas observadas na análise proteômica.

CAPÍTULO 1.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Maturação oocitária

A maturação oocitária é a ocorrência simultânea de vários eventos que resultam em um oócito maturado, ou seja, pronto para ser fertilizado. Esse processo pode ser dividido, didaticamente, em três etapas: maturação nuclear, citoplasmática e molecular (SIRARD, 2001). Alguns autores consideram a maturação molecular como uma parte da maturação citoplasmática (KRISHER, 2004; WATSON, 2007).

A maturação nuclear compreende as modificações dos cromossomos do estágio de VG à M II. A maturação citoplasmática abrange a redistribuição das organelas, enquanto a maturação molecular engloba ativação ou inativação de proteínas que controlam a progressão nuclear e citoplasmática (SIRARD, 2001). Ambas serão melhor detalhadas abaixo.

Para que a maturação ocorra de forma ideal, a comunicação entre as células do *cumulus* e o oócito é de fundamental importância. Um dos mais importantes tipos de comunicação que impacta na competência oocitária são as junções gap (JGs), observadas entre a membrana plasmática das células da *corona radiata* que formam os processos transzonais com a membrana plasmática do oócito (SUTTON *et al.*, 2003; LUCIANO *et al.*, 2011; MACAULAY *et al.*, 2014). Essas estruturas transportam moléculas de baixo peso molecular importantes para o desenvolvimento dos oócitos como íons, nucleotídeos e aminoácidos (THOMAS *et al.*, 2004; LODDE *et al.*, 2013).

3.1.1 Maturação nuclear

Antes do início da maturação, o oócito possui uma grande VG com grande nucléolo. Inicialmente, os cromossomos encontram-se descondensados, dispersos e transcricionalmente ativos (LUCIANO; SIRARD, 2018). Com o início da maturação, os cromossomos iniciam a condensação, a transcrição cessa e ocorre o rompimento da VG (MASUI; CLARKE, 1979).

A fase de VG do oócito pode ser dividida em quatro estádios: VG 0 – cromatina está descondensada e dispersa por todo nucleoplasma; VG 1 – ocorre o aparecimento de poucos focos de condensação; VG 2 – cromatina se encontra

condensada e compactada em agregados; e VG 3 – observa-se cromatina compactada em um único agregado, ocupando uma área restrita do nucleoplasma (LODDE *et al.*, 2007; LUCIANO; SIRARD, 2018). A VG 0 e 1 são relacionadas à oócitos em crescimento, VG 2 a oócitos em fase platô e VG 3 a oócitos atrésicos (LUCIANO; SIRARD, 2018). Oócitos recuperados em VG 2 são os mais competentes para realização da MIV, pois é a fase em que se encontram os oócitos que evoluirão até a fase pré-ovulatória *in vivo* (DIECI *et al.*, 2016; SIRARD, 2019).

Com a continuação do processo de maturação, os cromossomos homólogos emparelhados se dispõem paralelamente no fuso meiótico em formação durante a metáfase I (M I). A separação dos cromossomos homólogos paralelos resulta na formação do primeiro corpúsculo polar. Em seguida, os cromossomos restantes no citoplasma oócito são dispostos mais uma vez em um fuso meiótico na M II (HOLT; JONES, 2009).

3.1.2. Maturação citoplasmática

A maturação citoplasmática se dá pela redistribuição das organelas no citoplasma (FERREIRA *et al.*, 2009). Krisher e Bavister (1998) e Stojkovic *et al.* (2001) relataram que, durante o período de maturação, as mitocôndrias produzem a adenosina trifosfato (ATP), necessária para a produção de proteínas que atuam na maturação molecular e desenvolvimento embrionário inicial e que ocorre a migração dessas organelas para locais de maior consumo de energia. As mitocôndrias de oócitos bovinos migram da periferia e se dispersam pelo citoplasma entre 12 e 18 h de MIV (KRUIP *et al.*, 1983; HYTTEL *et al.*, 1986; HYTTEL *et al.*, 1997). Quando o oócito atinge o estágio de M II, as mitocôndrias, juntamente com as gotículas de lipídeo, assumem uma posição central na célula (HYTTEL *et al.*, 1997).

Como mencionado anteriormente, a síntese proteica é de suma importância para o processo de maturação e embriogênese inicial, sendo assim, os ribossomos devem estar presentes em quantidade adequada durante a maturação. Os ribossomos são produzidos e acumulados no oócito até a prófase I (FAIR *et al.*, 2001; HYTTEL *et al.*, 2001).

Pesquisas que avaliaram a maturação oocitária *in vivo* de camundongos revelaram que no estágio de VG, o retículo endoplasmático (RE) fica distribuído de forma homogênea pelo citoplasma, conforme ocorre o avanço para M II, essas

organelas se realocam em aglomerados pelo citoplasma (KLINE, 2000; STRICKER, 2006).

Grânulos corticais (GCs) são organelas exclusivas dos oócitos e sua principal função é a prevenção da polispermia (HOSOE; SHIOYA, 1997), que ocorre pela exocitose dos GCs no espaço perivitelínico, que modificam a matriz extracelular impedindo que o oócito se fusione a mais de um espermatozoide (HALEY; WESSEL, 2004). Nos oócitos em VG, os GCs estão alocados em grupos por todo o citoplasma (HOSOE; SHIOYA, 1997), quando atingem M II estes se encontram na periferia da célula, sob a membrana plasmática (THIBAUT *et al.*, 1987; CONNER *et al.*, 1997).

As gotículas de lipídeo armazenam triglicerídeos como substrato para a síntese de ATP para a maturação oocitária (STURMEY *et al.*, 2006) e biossíntese de membranas celulares durante o desenvolvimento embrionário inicial. Kruij *et al.* (1983) descreveram aumento no volume de gotículas de lipídeo ao longo do desenvolvimento do folículo, antes do pico de hormônio luteinizante (LH). Já Dardawal *et al.* (2015) avaliaram a localização das gotículas de lipídeo em oócitos. Nas fases de crescimento, platô e atresia, as gotículas de lipídeo encontraram-se periféricas, uniformemente distribuídas e centralizadas, respectivamente.

Durante a maturação precoce dos oócitos, aglomerados mitocondriais se associam a gotículas de lipídeo e a elementos do RE liso que, juntos, são denominadas unidades metabólicas. A formação dessas unidades metabólicas facilita a conversão de lipídeos e carboidratos em ATP. Devido a reorganização do citoesqueleto durante a maturação, próximo à ovulação as unidades metabólicas migram para o centro do oócito e o aglomerado de organelas se desagrega (CHIARATTI *et al.*, 2018).

3.1.3. Maturação molecular

A maturação molecular corresponde aos eventos de transcrição, armazenamento e processamento dos RNAs mensageiros (mRNA) expressos pelos cromossomos, estes serão traduzidos em proteínas. Essas proteínas estarão envolvidas na maturação do oócito e nos processos seguintes como a fertilização e fase inicial da embriogênese até a ativação do genoma embrionário (MOORE; LINTERN-MOORE, 1978; BACHVAROVA, 1985; SIRARD, 2001; EICHENLAUB-RITTER; PESCHKE, 2002).

O mRNA sofre poliadenilação e, posteriormente, ligando-se a unidades ribossomais e outros fatores, ocorrerá a tradução em proteínas (DE MOOR; RICHTER, 2001; EICHENLAUB-RITTER; PESCHKE, 2002). Alguns transcritos são de uso imediato e outros para uso posterior, este último grupo é armazenado no ooplasma em partículas ribonucleares (EICHENLAUB-RITTER; PESCHKE, 2002).

Sabe-se que a síntese de novas proteínas é necessária para que ocorra o evento de retomada da meiose e a maioria é sintetizada logo nas primeiras horas de MIV (9 a 12 h), sendo o fator promotor da meiose (MPF) o responsável pela retomada (LEVESQUE; SIRARD, 1997; KRISCHEK; MEINECKE, 2002; RODRIGUEZ; FARIN, 2004; TREMBLAY *et al.*, 2005).

Em oócitos que se encontram em folículos de fase primária, há expressão de genes relacionados a transcrição, ciclo celular e proliferação celular. Oócitos de folículos secundários expressam transcritos ligados a biossíntese e metabolismo molecular. No estágio antral, encontra-se expressão *down*-regulada de genes envolvidos na transcrição dos promotores da Polimerase II, o que ocasiona o silenciamento da transcrição que perdurará até o momento da ativação do genoma embrionário (PAN *et al.*, 2005).

Alguns transcritos são submetidos a tradução ativa durante a maturação do oócito. Como reguladores de anáfase e montagem do fuso meiótico temos MAD2, BUB1B e SOGL2. Como reguladores do ciclo celular temos CCNB1 e MOS (CHEN *et al.*, 2011), este último é codificado pelo mRNA materno que se mantém armazenado durante o período de crescimento do oócito. Quando se inicia a maturação, esse mRNA é traduzido e sofre degradação nas fases mais avançadas do desenvolvimento. Sua função é ativar a via de sinalização das proteínas quinases ativadas por mitógenos (por extenso em inglês, MAPK) que, por sua vez, modula o MPF e promove a transição da fase G2 à meiose (BREVINI GANDOLFI; GANDOLFI, 2001).

As proteínas GDF9 e BMP15 são expressas pelo oócito e estão relacionadas ao processo de maturação. Os CCOs que não sintetizam essas moléculas apresentam bloqueio de seu desenvolvimento ainda nos estágios iniciais da foliculogênese (BRAW-TAL *et al.*, 1993; GALLOWAY *et al.*, 2000; YAN *et al.*, 2001; HANRAHAN *et al.*, 2004).

3.2. Temperatura utilizada na MIV versus temperatura intrafolicular em bovinos

A temperatura retal profunda nos bovinos adultos é em média 38,5 °C (DIRKSEN *et al.*, 1993) e essa foi considerada por anos como a mesma temperatura encontrada nos órgãos abdominais. Paralelamente, testes de reação acrossômica (importantes para a etapa da fertilização *in vitro*), apresentaram índices satisfatórios nesta temperatura. Estes fatores foram levados em consideração para determinar a temperatura média de 38,5 °C para o ajuste das incubadoras nos protocolos de PIVE. Porém, pesquisas mais recentes evidenciaram que a temperatura dos órgãos do trato reprodutivo é inferior, ao redor de 37,5 °C (HUNTER, 2012; LÓPEZ-GATIUS; HUNTER, 2019a; LÓPEZ-GATIUS; HUNTER, 2019b). Desta forma, o possível ajuste na temperatura da incubadora ao longo da PIVE pode trazer benefícios.

No contexto descrito acima, alguns trabalhos foram realizados com o intuito de identificar a melhor temperatura a ser utilizada na PIVE. Lenz *et al.* (1983) aplicaram diferentes temperaturas no processo de MIV de oócitos bovinos. A 35 °C, 37 °C, 39 °C e 41 °C a taxa de maturação nuclear de oócitos foi 75%, 69%, 66% e 19%, respectivamente; somente o último grupo apresentou diferença significativa. Posteriormente, outros autores testaram quatro diferentes temperaturas na MIV. Em temperaturas de 33 °C, 35 °C, 37 °C, 38 °C e 39 °C, a taxa de oócitos maturados foi de 2,8%, 56,1%, 72,3%, 73,3% e 73,7%, respectivamente, sendo que nos três últimos grupos não houve diferença significativa. Ainda, após avaliação da taxa de viabilidade, os autores concluíram que as temperaturas de 35 a 37 °C foram as mais apropriadas (KATSKA; SMORAG, 1985).

Shi *et al.* (1998) testaram seis diferentes gradientes de temperatura na MIV: de 0 a 24 h de maturação a 37 °C (G1); de 0 a 18 h a 37 °C e de 18 a 24 h a 38,5 °C (G2); de 0 a 10 h a 37 °C e de 10 a 24 h a 38,5 °C (G3); de 0 a 10 h a 38,5 °C e de 10 a 24 h a 37 °C (G4); de 0 a 18 h a 38,5 °C e de 18 a 24 h a 37 °C (G5); de 0 a 24 h por 38,5 °C (G6). Os autores relataram que não houve diferença estatística entre os grupos nas taxas de maturação nuclear, clivagem, blastocisto e blastocisto eclodido. Sen e Kuran (2018) realizaram o processo de MIV a 36,5 °C e 38,5 °C separando os oócitos por qualidade (graus A – citoplasma homogêneo com células do *cumulus* intactas ao redor do oócito e B – citoplasma levemente heterogêneo com células do *cumulus* ao redor do oócito). Observou-se uma taxa menor de M II,

com diferença significativa somente no grupo 36,5 °C grau B. Pöhland *et al.* (2020) testaram a MIV por 37 °C, 38,5 °C e 40 °C. A taxa de maturação nuclear não apresentou diferença entre os grupos, porém as taxas de clivagem e blastocisto foram melhores no grupo controle (38,5 °C).

É importante ressaltar que nos estudos citados anteriormente (LENZ *et al.*, 1983; KATSKA; SMORAG, 1985; SHI *et al.*, 1998; SEM; KURAN, 2018; PÖHLAND *et al.*, 2020), em que os autores testaram o efeito da temperatura na MIV bovina, não foram utilizadas metodologias para avaliação de qualidade embrionária, seja *in vitro* e/ou *in vivo*, na taxa de prenhez.

Dada a importância da PIVE e da necessidade de mimetizar ao máximo o que ocorre fisiologicamente no trato reprodutivo da fêmea, grupos de pesquisa estudaram as temperaturas dos folículos pré-ovulatórios em coelhos (GRINSTED *et al.*, 1980), suínos (HUNTER *et al.*, 1997; HUNTER *et al.*, 2000), vacas (LÓPEZ-GATIUS; HUNTER, 2017; LÓPEZ-GATIUS; HUNTER, 2019a; LOPEZ-GÁTIUS; HUNTER, 2019b) e humanos (GRINSTED *et al.*, 1985). Em geral, os autores observaram que estes folículos apresentam temperaturas mais baixas que outras estruturas reprodutivas ou do reto, o que não ocorre no folículo não-ovulatório (LÓPEZ-GATIUS; HUNTER, 2019a; LÓPEZ-GATIUS; HUNTER, 2019b).

Em vacas, a temperatura folicular *in vivo* foi descrita por meio da mensuração guiada com o aparato para OPU, sendo possível acessar o interior do folículo com o termômetro, trazendo maior confiabilidade aos resultados, já que as mensurações feitas em ovários de suínos foram realizadas com termógrafo, exteriorizando o órgão, o que pode levar a uma alteração da temperatura real (HUNTER *et al.*, 1997; HUNTER *et al.*, 2000). Observou-se que as vacas que ovularam, apresentaram temperatura média no interior dos folículos pré-ovulatórios de 36,8 °C, ao passo que as fêmeas que não ovularam, apresentaram média de 38,9 °C (LÓPEZ-GATIUS; HUNTER, 2017).

Num segundo estudo avaliando fêmeas bovinas, também utilizando a técnica de OPU para mensuração da temperatura intrafolicular, os seguintes resultados foram obtidos: folículos pré-ovulatórios que passaram pelo processo de ovulação nos ovários direito e esquerdo apresentaram temperatura média de 37,5 °C e 37,4 °C, respectivamente, e os folículos pré-ovulatórios que não ovularam

posteriormente nos ovários direito e esquerdo apresentaram temperatura média de 38,7 °C e 38,9 °C, respectivamente (LÓPEZ-GATIUS; HUNTER, 2019a).

A baixa temperatura folicular foi relacionada, também, com a taxa de gestação de vacas inseminadas com sêmen criopreservado. Os animais foram colocados em situação de estresse térmico visando dificultar o processo de ovulação e gestação. Vinte e oito dias após a inseminação artificial, os resultados mostraram que, nas vacas cujo folículo pré-ovulatório apresentou esta queda de temperatura, a taxa de gestação aumentou 3,6 vezes. Os animais que apresentaram maior diferença entre a temperatura intrafolicular e a temperatura retal apresentaram maior porcentagem de prenhez do que os animais que apresentaram menor diferença (LÓPEZ-GATIUS; HUNTER, 2019a).

Outro experimento conduzido com a mesma metodologia adotada por López-Gatius e Hunter (2019a) apresentou os seguintes resultados: os folículos pré-ovulatórios que atingiram, posteriormente, o processo de ovulação apresentaram temperatura média de 37,6 °C, já os folículos pré-ovulatórios que não ovularam apresentaram temperatura média de 38,8 °C (LÓPEZ-GATIUS; HUNTER, 2019b).

Em um levantamento geral, foi possível constatar que, 87,9% dos folículos que apresentaram temperatura abaixo da temperatura corporal ovularam, com 35,3% de prenhez, enquanto 0% dos folículos com temperatura igual ou maior a temperatura corporal chegou ao processo de ovulação (HUNTER; LÓPEZ-GATIUS, 2020).

Há alguns fatores que podem explicar esta diminuição de temperatura no folículo pré-ovulatório. Primeiramente, o folículo dominante é uma estrutura repleta de líquido e o suprimento de vasos sanguíneos, que auxilia na troca de calor dos tecidos, atinge apenas a região da teca. Reações endotérmicas, ainda não elucidadas, são candidatas a ação de absorção de parte do calor presente nestas estruturas, estas reações podem estar relacionadas com a síntese e secreção de hormônios esteroides e proteínas (HUNTER *et al.*, 1997).

3.3. Efeito do estresse metabólico no CCO e no embrião bovino

Sabe-se que o estresse térmico é deletério ao ciclo estral, a composição do fluido folicular, a qualidade oocitária e, logo, a taxa de prenhez. Ao expor animais da

raça Holandesa (*Bos taurus taurus*) e Gir (*Bos taurus indicus*) ao estresse térmico (38 °C por 12 h e 30 °C por 12 h), relatou-se, em ambos os grupos, efeito negativo no crescimento folicular e na competência de desenvolvimento oocitário. Os efeitos perduraram por alguns dias mesmo após realocar os animais em local com temperatura ideal (temperatura ambiente em local coberto) (ULBERG; BURFENING, 1967; BADINGA *et al.*, 1985; BADINGA *et al.*, 1993; ROCHA *et al.*, 1998; AL-KATANANI *et al.*, 1999; WOLFENSON *et al.*, 2000; ROTH *et al.*, 2001; ZERON *et al.*, 2001; AL-KATANANI *et al.*, 2002; LAWRENCE *et al.*, 2004; TORRES-JÚNIOR *et al.*, 2008; SHEHAB-EL-DEEN *et al.*, 2010).

Animais zebuínos colocados a pasto no sistema de integração lavoura, pecuária e floresta, que oferta maior área de sombreamento prevenindo o estresse térmico, apresentaram taxa de blastocisto 54,7% maior que fêmeas com as mesmas características mantidas em sistema de integração lavoura e pecuária (DA SILVA *et al.*, 2020).

Em estudo comparando animais taurinos em estresse térmico (38 °C) e em temperatura termoneutra (24 °C), observou-se, dentre outras, alteração na expressão dos genes fator de choque térmico 1 (HSF1) e proteína ribossomal 60S L15 (RPL15). Ambos os genes foram menos expressos nos CCOs de vacas em temperatura termoneutra, após MIV (DALANEZI *et al.*, 2019). A proteína HSF1 funciona como fator anti-apoptótico (PAGE *et al.*, 2006), enquanto a baixa expressão de RPL15 pode indicar atenuação no processo de meiose dos oócitos (SUN *et al.*, 2010). Ferreira *et al.* (2016) relataram baixa expressão de dois genes relacionados à maturação oocitária (FGF16 e GDF9) em novilhas e vacas durante o verão.

Estudos que avaliaram animais em estações frias e quentes do ano, descreveram que o oócito em VG é sensível à temperatura elevada, levando em consideração que os oócitos recuperados no verão tiveram baixa taxa de desenvolvimento (ROCHA *et al.*, 1998; GENDELMAN *et al.*, 2010; GENDELMAN *et al.*, 2012b).

Os CCOs em estágio de VG que foram submetidos ao estresse térmico (verão vs. inverno) somente demonstraram alterações após 22 h de MIV, quando encontravam-se em M II, após a fertilização e durante o desenvolvimento embrionário, principalmente durante a fase de 2, 4 e 8 células, que é antes da

ativação do genoma embrionário. Estes dados demonstram que o efeito deletério ao embrião ocorre devido a ação do estresse térmico no genoma materno (GENDELMAN; ROTH, 2012a; GENDELMAN; ROTH, 2012b).

O estresse térmico (40 °C a 41,5 °C) em oócitos durante o processo de maturação *in vitro* acarreta alterações no citoesqueleto, o que resulta em estruturas que não conseguem evoluir até M II e ficam paradas no estágio de M I (ROTH; HANSEN, 2005; PAVANI *et al.*, 2016). Além disso, pode ocorrer a interrupção do armazenamento de RNA em oócitos em estágio de VG e, também, pode ser deletério ao processo de transcrição de oócitos já maturados (GENDELMAN *et al.*, 2010).

Quanto à maturação citoplasmática, Payton *et al.* (2004) relataram prejuízo na distribuição de grânulos corticais em oócitos que sofreram estresse térmico de 41 °C. Edwards *et al.* (2005) descreveram que, os grânulos corticais de oócitos submetidos a estresse térmico (41 °C), apresentaram rápida distribuição, o que significa que a maturação citoplasmática foi, indesejavelmente, acelerada e isso explica, em parte, o prejuízo na fertilização desses oócitos. Quanto à distribuição mitocondrial dos oócitos, houve diferença significativa entre estruturas recuperadas no inverno e verão, resultando em maiores taxas de blastocisto no inverno, taxa mediana no outono e taxa baixa no verão (GENDELMAN; ROTH, 2012c).

A taxa de clivagem após a fertilização, também pode estar relacionada com alterações de temperatura as quais os oócitos foram expostos. Kalo e Roth (2011) observaram que oócitos submetidos ao estresse térmico (41°C) apresentaram diminuição da taxa de clivagem. Segundo Gendelman e Roth (2012b), a proporção de estruturas que evoluíram até o estágio de 4 células foi menor durante o verão, sendo assim, a repetição de estro de vacas devido ao estresse térmico foi associada à baixa competência dos oócitos, nesse período, para evoluírem até o estágio de blastocisto após a fertilização (FERREIRA *et al.*, 2011). Isso se deve ao fato de que, embriões nas primeiras fases de clivagem, quando submetidos ao estresse térmico, expressam de forma diferencial transcritos como, por exemplo, GDF9 e POU5F1, relacionados ao desenvolvimento embrionário inicial (GENDELMAN; ROTH, 2012b; FERREIRA *et al.*, 2016).

O estresse térmico é capaz de atuar, de forma negativa, na distribuição mitocondrial dos oócitos no processo de maturação. Durante o inverno, foi descrito maior taxa de oócitos com aglomerados mitocondriais mais homogêneos, distribuídos por todo citoplasma, enquanto durante o verão, observou-se pequeno número de mitocôndrias com localização periférica e até mitocôndrias inviáveis (GENDELMAN; ROTH, 2012c). Isso ocorre devido a necessidade das mitocôndrias de se reorganizarem utilizando os microtúbulos e os filamentos de actina (BOLDOGH; PON, 2007; ZAMPOLLA *et al.*, 2011) que, por sua vez, são muito sensíveis à elevação de temperatura (KALO; ROTH, 2011).

Alguns mecanismos de apoptose podem ser desencadeados pela elevação da temperatura, como por exemplo, a fragmentação do DNA nas primeiras 12 a 14 h de maturação (ROTH; HANSEN, 2004) e aumento na expressão de genes associados a apoptose, como ITM2B e BAX (FERREIRA *et al.*, 2016).

Além da apoptose, outro mecanismo de morte celular pode ser desencadeado pelo estresse térmico, a autofagia. Este processo é definido como um processo catabólico de proteínas pelo qual o conteúdo citoplasmático é digerido dentro de um autofagossomo de membrana dupla (Klionsky, 2007). Em oócitos submetidos ao estresse térmico de 41 °C nas primeiras 16 h de MIV observou-se aumento de transcritos relacionados a autofagia (LATORRACA *et al.*, 2020). A célula promove o processo autofágico em quadros variados de estresse para que, degradando organelas e moléculas degeneradas e/ou desnecessárias, promova a homeostase por reciclagem (YADAV *et al.*, 2018).

3.4. Análises proteômicas de oócitos

As análises proteômicas de oócitos foram descritas em humanos (VIRANT-KLUN *et al.*, 2016), bovinos (MEMILI *et al.*, 2007; PEDDINTI *et al.*, 2010; RÍOS *et al.*, 2015; LABAS *et al.*, 2017; MAREI *et al.*, 2019), caninos domésticos (PEREIRA *et al.*, 2019), felinos domésticos (LEE *et al.*, 2018; TURATHUM *et al.*, 2018; TURATHUM *et al.*, 2020), *zebrafish* (GE *et al.*, 2017), bubalinos (CHEN *et al.*, 2016) e roedores (VITALE *et al.*, 2007; MA *et al.*, 2008; CAO *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2018). Duas situações podem ser observadas na literatura: a primeira é a heterogeneidade no número de proteínas encontrados devido ao uso de diferentes metodologias para

obtenção do perfil proteômico destas células e a segunda é que, na maioria destes estudos, há a necessidade de coleta de grandes quantidades de oócitos para a realização da análise, o que explica o motivo de ainda existir poucos artigos científicos desta área, principalmente, na reprodução humana já que os gametas femininos humanos não podem ser coletados exclusivamente com finalidade de pesquisa, podendo apenas ser reaproveitados dos programas de PIVE (VIRANT-KLUN *et al.*, 2016). Dados referentes às diferentes quantidades de proteínas identificadas e aos variados números de oócitos utilizados em cada análise encontram-se descritos na tabela 1.

Memili *et al.* (2007) desenvolveram uma pesquisa descritiva do perfil proteômico de oócitos bovinos em estágio de VG e suas respectivas células do *cumulus*, o que trouxe uma visão geral do assunto para que, adiante, outros autores refinassem seus experimentos. Posteriormente, pesquisou-se a interação célula-célula entre o oócito bovino e as células do *cumulus*, onde foi possível observar a importância da MAPK e fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) na sinalização entre essas células e, ainda, que as células do *cumulus* expressam maior quantidade de proteínas relacionadas a geração de metabólitos, transporte e comunicação celular do que os oócitos (PEDDINTI *et al.*, 2010).

A partir de Peddinti *et al.*, (2010) trabalhos com oócitos bovinos envolvendo protocolos experimentais nos meios de cultivo começaram a ser publicados. A suplementação do meio de MIV com fator de crescimento epidermal (EGF) e ácido hialurônico demonstrou, com o uso da proteômica, que estes tratamentos incrementaram o desenvolvimento dos oócitos até o estágio de M II, por meio da ação de proteínas que regulam fatores de crescimento e diferenciação e outras relacionados à matriz extracelular (RÍOS *et al.*, 2015). Em meio de cultivo suplementado com ácido palmítico, um ácido graxo saturado, foi descrito disfunção mitocondrial e aumento da apoptose nas células do *cumulus*, enquanto no oócito o perfil proteômico indicou adaptações metabólicas em resposta ao estresse oxidativo como mecanismo de sobrevivência (MAREI *et al.*, 2019).

Tabela 1. Lista de artigos referente ao número de proteínas identificadas e número de oócitos utilizados em estudos proteômicos com oócitos de diferentes espécies

Autores, ano	Espécie	Meiose*	PTN*	Oócitos*
MEMILI <i>et al.</i> , 2007	Bovina	VG	1092	500
VITALE <i>et al.</i> , 2007	Roedores	VG e MII	12	500
MA <i>et al.</i> , 2008	Roedores	MII	869	-
PEDDINTI <i>et al.</i> , 2010	Bovina	VG	811	-
CAO <i>et al.</i> , 2012	Roedores	VG e MII	63	-
RÍOS <i>et al.</i> , 2014	Bovina	MII	241	400
CHEN <i>et al.</i> , 2016	Bubalina	VG e MII	3763	-
VIRANT-KLUN <i>et al.</i> , 2016	Humana	VG e MII	450	1
GE <i>et al.</i> , 2017	Zebrafish	MII	1568	200
LABAS <i>et al.</i> , 2017	Bovina	MII	386	1
LEE <i>et al.</i> , 2018	Felina	VG	174	-
TURATHUM <i>et al.</i> , 2018	Felina	MII	1712	1800
PEREIRA <i>et al.</i> , 2019	Canina	VG	312	2980
TURATHUM <i>et al.</i> , 2020	Felina	VG e MII	260	900

*Meiose: Estádio da meiose em que os oócitos encontravam-se; PTN: N^o de proteínas identificadas; Oócitos: N^o de oócitos na amostra;

Siglas: VG: vesícula germinativa; MII: Metáfase II.

Ainda tratando de ruminantes, Chen *et al.* (2016) avaliaram a maturação *in vitro* de oócitos bubalinos a partir da coleta das células nos seguintes estádios: VG e M II. O grupo M II foi subdividido em M II G que foi composto por oócitos de boa qualidade e M II B composto por oócitos de qualidade inferior. Os dados coletados revelaram que oócitos competentes, maturados, apresentaram maior expressão de

proteínas relacionadas à segregação cromossômica, fosforilação oxidativa, transporte de proteínas e função ribossomal.

Em relação aos animais de companhia, Lee *et al.* (2018) estudaram o proteoma de oócitos em VG de gatas e relataram achados importantes para aquisição de competência do oócito, como proteínas envolvidas na organização de cromatina e na transcrição e processamento de RNA. Já oócitos de gatas maturados, vitrificados/desvitrificados apresentaram aumento na expressão de proteínas relacionadas ao processo metabólico, transporte e transcrição em componentes celulares como membrana, núcleo, citoplasma e mitocôndria. Além disso, os autores reportaram diminuição na expressão de proteínas ligadas ao desenvolvimento e resposta imunológica em membrana, núcleo e região extracelular (TURATHUM *et al.*, 2018). A comparação entre oócitos de felinos domésticos em VG e M II mostrou que oócitos em M II apresentam expressão maior de proteínas ligadas à ciclo celular, desenvolvimento, crescimento celular e resposta ao estresse, enquanto menor expressão de proteínas ligadas a reparo de DNA, apoptose e organização celular (TURATHUM *et al.*, 2020). O único trabalho publicado com proteômica de oócitos de cadelas avaliou oócitos em VG coletados em diferentes fases do ciclo estral (anestro e diestro). O grupo diestro apresentou aumento na expressão de algumas proteínas como por exemplo hnRNP e hnRNPA2B1, proteínas essas conhecidas por formarem complexos relacionados a modificações pós-transcricionais de RNAs recentemente sintetizados e seu transporte subsequente, estando ligadas a capacidade do oócito de passar pelo processo de maturação (PEREIRA *et al.*, 2019).

Em oócitos maturados de *zebrafish*, proteínas como VTG7 (desenvolvimento embrionário inicial), ZP3 (atua no rompimento da VG e fertilização), S100A10 (fosforilação, regulação enzimática, proliferação e diferenciação celular e organização do citoesqueleto), eEF1A e EIF (transporte de RNA) e YWHA (sinalização celular, desenvolvimento e crescimento) foram acumuladas em maior quantidade (GE *et al.*, 2017).

Com oócitos de roedores, Vitale *et al.* (2007) e Cao *et al.* (2012) descreveram o perfil proteômico de gametas femininos em VG e M II, já Ma *et al.* (2008) demonstraram o proteoma apenas de oócitos em M II. Esses três estudos trazem em comum a proteína NPM2 *up*-regulada, que está relacionada com a fertilização.

Oócitos de roedores obesos apresentam baixo acúmulo da proteína TP53, o que gera estresse oxidativo e erros no processo de meiose (WANG *et al.*, 2018).

Como citado anteriormente, trabalhos com análise proteômica de oócitos humanos ainda são difíceis de serem realizados, porém foi descrita uma técnica que trabalha com a extração de proteínas de apenas um oócito. Este mesmo trabalho demonstrou que a proteína TDRKH (biogênese de RNApi em células germinativas) foi altamente expressa em oócitos imaturos, enquanto DNMT1 (metilação), WEE2 e PCNA (retomada da meiose) foram encontrados em maior quantidade em oócitos em M II (VIRANT-KLUN *et al.*, 2016).

3.5. Referências bibliográficas

- ALBUZ, F. K.; SASSEVILLE, M.; LANE, M.; ARMSTRONG, D. T.; THOMPSON, J. G.; GILCHRIST, R. B. Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel in vitro maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. **Human Reproduction**, v. 25, n. 12, p. 2999-3011, 2010.
- AL-KATANANI, Y. M.; WEBB, D. W.; HANSEN, P. J. Factors affecting seasonal variation in 90-day non-return rate to first service in lactating Holstein cows in hot climate. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 12, p. 2611-2616, 1999.
- AL-KATANANI, Y. M.; PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 2, p. 390-396, 2002.
- BACHVAROVA, R. Gene expression during oogenesis and oocyte development in mammals. **Developmental Biology**, v. 1, n. 1, p. 453-424, 1985.
- BADINGA, L.; COLLIER, R. J.; THATCHER, W. W.; WILCOX, C. J. Effects of climatic and management factors on conception rate of dairy cattle in subtropical environment. **Journal of Dairy Science**, v. 68, n. 1, p. 78-85, 1985.
- BADINGA, L.; THATCHER, W. W.; DIAZ, T.; DROST, M.; WOLFENSON, D. Effect of environmental heat stress on follicular development and steroidogenesis in lactating Holstein cows. **Theriogenology**, v. 39, n. 4, p. 797-810, 1993.
- BARUSELLI, P. S.; CATUSSI, B. L. C.; ABREU, L. A.; ELLIFF, F. M.; SILVA, L. G.; BATISTA, E. O. S. Challenges to increase the AI and ET markets in Brazil. **Animal Reproduction**, v. 16, n. 3, p. 364-375, 2019.
- BOLDOGH, I. R.; PON, L. A. Mitochondria on the move. **Trends in Cell Biology**, v. 17, n. 10, p. 502-510, 2007.
- BRAW-TAL, R.; MCNATTY, K. P.; SMITH, P.; HEATH, D. A.; HUDSON, N. L.; PHILLIPS, D. J.; MCLEOD, B. J.; DAVIS, G. H. Ovaries of ewes homozygous for the x-linked inverdale gene (FecXI) are devoid of secondary and tertiary follicles but contain many abnormal structures. **Biology of Reproduction**, v. 49, n. 5, p. 895-907, 1993.

BREVINI GANDOLFI, T. A. L.; GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1255-1276, 2001.

CAO, S.; GUO, X.; ZHOU, Z.; SHA, J. Comparative proteomic analyses of proteins involved in oocyte meiotic maturation in mice. **Molecular Reproduction and Development**, n. 79, n. 6, p. 413-422, 2012.

CHEN, J.; MELTON, C.; SUH, N.; OH, J. S.; HORNER, K.; XIE, F.; SETTE, C.; BLELLOCH, R.; CONTI, M. Genome-wide analysis of translation reveals a critical role for deleted in azoospermia-like (Dazl) at the oocyte-to-zygote transition. **Genes & Development**, v. 25, n. 7, p. 755-766, 2011.

CHEN, L.; ZHAI, L.; QU, C.; ZHANG, C.; LI, S.; WU, F.; QI, Y.; LU, F.; XU, P.; LI, X.; SHI, D. Comparative proteomic analysis of buffalo oocytes matured in vitro using iTRAQ technique. **Scientific Reports**, v. 6, n. 31795, 2016.

CHIARATTI, M. R.; GARCIA, B. M.; CARVALHO, K. F.; MACABELLI, C. H.; RIBEIRO, F. K. S.; ZANGIROLAMO, A. F.; SARAPIÃO, F. D.; SENEDA, M. M.; MEIRELLES, F. V.; GUIMARÃES, F. E. G.; MACHADO, T. S. Oocyte mitochondria: role on fertility and disease transmission. **Animal Reproduction**, v. 15, n. 3, p. 231-238, 2018.

CONNER, S.; LEAF, D.; WESSEL, G. Members of the SNARE hypothesis are associated with cortical granule exocytosis in the sea urchin eggs. **Genetics, Cell Biology and Development**, v. 48, n. 1, p. 106-118, 1997.

DALANEZI, F. M.; GARCIA, H. D. M.; FERRAZZA, R. A.; FRANCHI, F. F.; FONTES, P. K.; CASTILHO, A. C. S.; NOGUEIRA, M. F. G.; SCHMIDT, E. M. S.; SARTORI, R.; FERREIRA, J. C. P. Extracellular vesicles of follicular fluid from heat-stressed cows modify the gene expression of in vitro-matured oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 205, n. p. 94-104, 2019.

DARDAWAL, D.; ADAMS, G. P.; HYTTEL, P.; BROGLIATTI, G. M.; CALDWELL, S.; SINGH, J. Organelle reorganization in bovine oocytes during dominant follicle growth and regression. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 13, n. 124, p. 1-11, 2015.

DA SILVA, W. A. L.; POEHLAND, R.; DE OLIVEIRA, C. C.; FERREIRA, M. G. C. R.; DE ALMEIDA, R. G.; CÁCERES, M. B. S.; MACEDO, G. G.; E SILVA, E. V. C.; ALVES, F. V.; NOGUEIRA, E.; MELO-STERZA, F. A. Shading effect on physiological parameters and in vitro embryo production of tropical adapted Nellore heifers in integrated crop-livestock-forest systems. **Tropical Animal Health and Production**, v. 52, n. 1, p. 2273-2281, 2020.

DE MOOR, C. H.; RICHTER, J. D. Translational control in vertebrate development. **International Review of Cytology**, v. 203, n.1, p. 567-608, 2001.

DIECI, C.; LODDE, V.; LABREQUE, R.; DUFORT, I.; TESSARO, I.; SIRARD, M. A.; LUCIANO, A. M. Differences in cumulus cells gene expression indicate the benefit of a pre-maturation step to improve in-vitro bovine embryo production. **Molecular Human Reproduction**, v. 22, n. 12, p. 882-897, 2016.

DIELEMAN, S. J.; HENDRIKSEN, P. J. M.; VIUFF, D.; THOMSEN, P. D.; HYTTEL, P.; KNIJN, H. M.; WRENZYCKI, C.; KRUIP, T. A. M.; NIEMANN, H.; GADELLA, B. M.; BEVERS, M. M.; VOS, P. L. A. M. Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-impantation embryos. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 5-20, 2002.

DIRKSEN, G.; GRÜNDER, H. D.; STÖBER, M. **Exame clínico dos bovinos**, ed. 3, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993, 419p.

EDWARDS, J. L.; SAXTON, A. M.; LAWRENCE, J. L.; PAYTON, R. R.; DUNLAP, J. R. Exposure to a physiologically relevant elevated temperature hastens in vitro maturation in bovine oocytes. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 12, p. 4326-4333, 2005.

EICHENLAUB-RITTER, U.; PESCHKE, M. Expression in in-vivo and in-vitro growing and maturing oocytes: focus on regulation of expression and the translational level. **Human Reproduction Update**, v. 8, n.1, p. 21-41, 2002.

FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. **Molecular Reproduction and Development**, v. 42, n. 4, p. 437-442, 1995.

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.

FAIR, T.; HYTTEL, P.; LONERGAN, P.; BOLAND, M. P. Immunolocalization of nucleolar proteins during bovine oocyte growth, meiotic maturation and fertilization. **Biology of Reproduction**, v. 54, n. 5, p. 1516-1525, 2001.

FERREIRA, E. M.; VIREQUE, A. A.; ADONA, P. R.; MEIRELLES, F. V.; FERRIANI, R. A.; NAVARRO, P. A. A. S. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71, p. 836-848, 2009.

FERREIRA, R. M.; AYRES, H.; CHIARATTI, M. R.; FERRAZ, M. L.; ARAÚJO, A. B.; RODRIGUES, C. A.; WATANABE, Y. F.; VIREQUE, A. A.; JOAQUIM, D. C.; SMITH, L. C.; MEIRELLES, F. V.; BARUSELLI, P. S. The low fertility of repeat-breeder cows during summer heat stress is related to a low oocyte competence to develop into blastocysts. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 5, p. 2383-2392, 2011.

FERREIRA, R. M.; CHIARATTI, M. R.; MACABELLI, C. H.; RODRIGUES, C. A.; FERRAZ, M. L.; WATANABE, Y. F.; SMITH, L. C.; MEIRELLES, F. V.; BARUSELLI, P. S. The infertility of repeat-breeder cows during summer is associated with decreased mitochondrial DNA and increased expression of mitochondrial and apoptotic genes in oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 94, n. 3, p. 1-10, 2016.

GALLOWAY, S. M.; MCNATTY, K. P.; CAMBRIDGE, L. M.; LAITINEN, M. P.; JUENGEL, J. L.; JOKIRANTA, T. S.; MCLAREN, R. J.; LUIRO, K.; DODDS, K. G.; MONTGOMERY, G. W.; BEATTIE, A. E.; DAVIS, G. H.; RITVOS, O. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. **Nature Genetics**, v. 25, n. 3, p. 279-283, 2000.

GE, C.; LU, W.; CHEN, A. Quantitative proteomic reveals the dynamic of protein profile during final oocyte maturation in zebrafish. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 490, n. 3, p. 657-663, 2017.

GENDELMAN, M.; AROYO, A.; YAVIN, S.; ROTH, Z. Seasonal effects on gene expression, cleavage timing and developmental competence of bovine preimplantation embryos. **Reproduction**, v. 140, n. 1, p. 73-82, 2010.

GENDELMAN, M.; ROTH, Z. In vivo vs. in vitro models for studying the effects of elevated temperature on the GV-stage oocyte, subsequent developmental competence and gene expression. **Animal Reproduction Science**, v. 134, n. 3-4, p. 125-134, 2012a.

GENDELMAN, M.; ROTH, Z. Seasonal effect on germinal vesicle-stage bovine oocytes is further expressed by alterations in transcript levels in the developing embryos associated with reduced developmental competence. **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 1, p. 1-9, 2012b.

GENDELMAN, M.; ROTH, Z. Incorporation of coenzyme Q10 into bovine oocytes improves mitochondrial features and alleviates the effects of summer thermal stress on developmental competence. **Biology of Reproduction**, v. 87, n. 5, p. 1-12, 2012c.

GRINSTED, J.; BLENDSTRUP, K.; ANDREASEN, M. P.; BYSKOV, A. G. Temperature measurements of rabbit antral follicles. **Journal of Reproduction and fertility**, v. 60, n. 1, p. 149-155, 1980.

GRINSTED, J.; KJER, J. J.; BLENDSTRUP, K.; PEDERSEN, J. F. Is low temperature of the follicular fluid prior to ovulation necessary for normal oocyte development? **Fertility and Sterility**, v. 43, n. 1, p. 34-39, 1985.

HALEY, S. A.; WESSEL, G. M. Regulated proteolysis by cortical granule serine protease 1 at fertilization. **Molecular Biology of the Cell**, v. 15, n. 5, p. 2049-2522, 2004.

HANRAHAN, J. P.; GREGAN, S. M.; MULSANT, P.; MULLEN, M.; DAVIS, G. H.; POWELL, R.; GALLOWAY, S. M. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis ares*). **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 4, p. 900-909, 2004.

HENDRIKSEN, P. J. M.; STEENWEG, W. N. M.; HARKEMA, J. C.; MERTON, J. S.; BEVERS, M. M.; VOS, P. L. A. M.; DIELEMAN, S. J. Effect of different stages of the follicular wave on in vitro developmental competence of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 61, n. 5, p. 909-920, 2004.

- HOLT, J.; JONES, K. Control of homologous chromosome division in the mammalian oocyte. **Molecular Human Reproduction**, v. 15, n. 3, p. 139-147, 2009.
- HOSOE, M.; SHIOYA, Y. Distribution of cortical granules in bovine oocytes classified by cumulus complex. **Zygote**, v. 5, n. 4, p. 371-376, 1997.
- HUNTER, R. H. F. Temperature gradients in female reproductive tissues. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 24, p. 377-380, 2012.
- HUNTER, R. H. F.; BOGH, I. B.; EINER-JENSEN, N.; MÜLLER, S.; GREVE, T. Pre-ovulatory Graafian follicles are cooler than neighbouring stroma in pig ovaries. **Human Reproduction**, v. 15, n. 2, p. 273-283, 2000.
- HUNTER, R. H. F.; EINER-JENSEN, N.; GREVE, T. Presence and significance of temperature gradients among different ovarian tissues. **Microscopy Research & Technique**, v. 69, n. 6, p. 501-507, 2006.
- HUNTER, R. H. F.; GRONDAHL, C.; GREVE, T.; SCHMIDT, M. Graafian follicles are cooler than neighbouring ovarian tissues and deep rectal temperatures. **Human Reproduction**, v. 12, n. 1, p. 95-100, 1997.
- HUNTER, R. H. F.; LÓPEZ-GATIUS, F. Intra-follicular temperature acts to regulate mammalian ovulation. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, v. 99, n. 3, p. 301-302, 2020.
- HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 47, n. 1, p. 23-32, 1997.
- HYTTEL, P.; VIUFF, D.; FAIR, T.; LAURINCIK, J.; THOMSEN, P. D.; CALLESEN, H.; VOS, P. L. A. M.; HENDRIKSEN, P. J. M.; DIELEMAN, S.; SCHELLANDER, K.; BASENFELDER, U.; GREVE, T. Ribosomal RNA gene expression and chromosome aberrations in bovine oocytes and preimplantation embryos. **Reproduction**, v. 122, n. 1, p. 21-30, 2001.
- HYTTEL, P.; XU, K. P.; SMITH, S.; GREVE, T. Ultrastructure of in-vitro oocyte maturation in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 78, n. 2, p. 615-625, 1986.
- IRVING-RODGERS, H. F.; MUSSARD, M. L.; KINDER, J. E.; RODGERS, R. J. Composition and morphology of the follicular basal lamina during atresia of bovine antral follicles. **Reproduction**, v. 123, n. 1, p. 97-106, 2002.

KALO, D.; ROTH, Z. Involvement of the sphingolipid ceramide in heat-shock induced apoptosis of bovine oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, n. 7, p. 876-888, 2011.

KATSKA, L.; SMORAG, Z. The influence of culture temperature on in vitro maturation of bovine oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 9, p. 205-212, 1985.

KLINE, D. Attributes and dynamics of the endoplasmic reticulum in mammalian eggs. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 50, p. 125-154, 2000.

KLIONSKY, D.J. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 8, p. 931–937, 2007.

KRISCHEK, C.; MEINECKE, B. In vitro maturation of bovine oocytes requires polyadenylation of mRNAs coding proteins for chromatin condensation, spindle assembly, MPF and MAP kinase activation. **Animal Reproduction Science**, v. 73, n. 3-4, p. 129-140, 2002.

KRISHER, R. L.; BAVISTER, B. D. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. **Theriogenology**, v. 49, n. 1, p. 103-114, 1998.

KRISHER, R. L. The effect of oocyte quality on development. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 13, p. 14-23, 2004.

KRUIP, T. A.; PIETERSE, M. C.; VAN BENEDEN, T. H.; VOS, P. L.; WURTH, Y. A.; TAVERNE, M. A. A new method for bovine embryo production: a potential alternative to superovulation. **Veterinary Record**, v. 128, n. 9, p. 208-210, 1991.

KRUIP, T. A. M.; CRAN, D. G.; VAN BENEDEN, T. H.; DIELEMAN, S. J. Structural changes in bovine oocytes during final maturation in vivo. **Molecular Reproduction and Development**, v. 8, n. 1, p. 29-47, 1983.

LABAS, V.; TEIXEIRA-GOMES, A. P.; BOUGUEREAU, L.; GARGAROS, A.; SPINA, L.; MARESTAING, A.; UZBEKOVA, S. Intact cell MALDI-TOF mass spectrometry on single bovine oocyte and follicular cells combined with top-down proteomics: a novel approach to characterize markers of oocyte maturation. **Journal of Proteomics**, v. 20, n. 175, p. 56-74, 2018.

LATORRACA, L. B.; FEITOSA, W. B.; MARIANO, C.; MOURA, M. T.; FONTES, P. K.; NOGUEIRA, M. F. G.; PAULA-LOPES, F. F. Autophagy is a pro-survival adaptive

response to heat shock in bovine cumulus-oocyte complexes. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 13711-13723, 2020.

LAWRENCE, J. L.; PAYTON, R. R.; GODKIN, J. D.; SAXTON, A. M.; SCHRICK, F. N.; EDWARDS, J. L. Retinol improves development of bovine oocytes compromised by heat stress during maturation. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 8, p. 2449-2454, 2004.

LEAL, G. R.; MONTEIRO, C. A. S.; SARAIVA, H. F. R. A.; CAMARGO, A. J. R.; OLIVEIRA, C. S.; VASCONCELOS, C. O. P.; NOGUEIRA, L. A. G.; SERAPIÃO, R. V. Evaluation of the simulated physiological oocyte maturation (SPOM) system on F1 Gyr x Holstein oocytes and embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 59, n. 4 p. 634-640, 2018.

LEE, P. C.; WILDT, D. E.; COMIZZOLI, P. Proteomic analysis of germinal vesicles in the domestic cat model reveals candidate nuclear proteins involved in oocyte competence acquisition. **Molecular Human Reproduction**, v. 24, n. 1, p. 14-26, 2018.

LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; CRITSER, E. S.; EYESTONE, W. H.; NORTHEY, D. L.; FIRST, N. L. Development potential of bovine oocytes matured in vitro or in vivo. **Biology of Reproduction**, v. 36, n. 2, p. 376-383, 1987.

LENZ, R. W.; BALL, G. D.; LEIBFRIED, M. L.; AX, R. L.; FIRST, N. L. In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature-dependent processes. **Biology of Reproduction**, v. 29, n. 1, p. 173-179, 1983.

LEVESQUE, J.; SIRARD, M. A. Resumption of meiosis is initiated by the accumulation of Cyclin B in bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 6, p. 1427-1436, 1997.

LODDE, V.; FRANCIOSI, F.; TESSARO, I.; MODINA, S. C.; LUCIANO, A. M. Role of gap junction-mediated communications in regulating large-scale chromatin configuration remodeling and embryonic developmental competence acquisition in fully grown bovine oocyte. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 30, n. 9, p. 1219-1226, 2013.

LODDE, V.; MODINA, S.; GALBUSERA, C.; FRANCIOSI, F.; LUCIANO, A. M. Large-scale chromatin remodeling in germinal vesicle bovine oocytes: Interplay with gap

junction functionality and developmental competence. **Molecular, Reproduction and Development**, v. 74, n. 6, p. 740-749, 2007.

LONERGAN, P.; MONAGHAN, P.; RIZOS, D.; BOLAND, M. P.; GORDON, I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization and culture in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 37, n. 1, p. 48-53, 1994.

LONERGAN, P.; FAIR, T. Maturation of oocytes in vitro. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 4, p. 255-268, 2016.

LÓPEZ-GATIUS, F.; HUNTER, R. H. F. Clinical relevance of pre-ovulatory follicular temperature in heat-stressed lactating dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, n. 3, p. 1-5, 2017.

LÓPEZ-GATIUS, F.; HUNTER, R. H. F. Pre-ovulatory follicular cooling correlates positively with the potential for pregnancy in dairy cows: Implications for human IVF. **Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction**, v. 48, n. 6, p. 419-422, 2019a.

LÓPEZ-GATIUS, F.; HUNTER, R. H. F. Pre-ovulatory follicular temperature in bi-ovular cows. **The Journal of Reproduction and Development**, v. 65, n. 2, p. 191-194, 2019b.

LUCIANO, A. M.; FRANCIOSI, F.; MODINA, S. C.; LODDE, V. Gap junction-mediated communications regulate chromatin remodeling during bovine oocyte growth and differentiation through cAMP-dependent mechanism(s). **Biology of Reproduction**, v. 85, n. 6, p. 1252-1259, 2011.

LUCIANO, A. M.; SIRARD, M. A. Successful in vitro maturation of oocytes: a matter of follicular differentiation. **Biology of Reproduction**, v.98, n. 2, p. 162-169, 2018.

MA, M.; GUO, X.; WANG, F.; ZHAO, C.; LIU, Z.; SHI, Z.; WANG, Y.; ZHANG, P.; ZHANG, K.; WANG, N.; LIN, M.; ZHOU, Z.; LIU, J.; LI, Q.; WANG, L.; HUO, R.; SHA, J.; ZHOU, Q. Protein expression profile of the mouse metaphase-II oocyte. **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 11, p. 4821-4830, 2008.

MACAULAY, A. D.; GILBERT, I.; CABALLERO, J.; BARRETO, R.; FOURNIER, E.; TOSSOU, P.; SIRARD, M. A.; CLARCKE, H. J.; KHANDIJAN, E. W.; RICHARD, F.

J.; HYTTEL, P.; ROBERT, C. The gametic synapse: RNA transfer to the bovine oocyte. **Biology of Reproduction**, v. 91, n. 4, p. 1-12, 2014.

MACHATKOVA, M.; KRAUSOVA, K.; JOKESOVA, E.; TOMANEK, M. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. **Theriogenology**, v. 61, n. 2-3, p. 329-335, 2004.

MAREI, W. F. A.; RAEMDONCK, G. V.; BAGGERMAN, G.; BOLS, P. E. J.; LEROY, J. L. M. R. Proteomic changes in oocytes after in vitro maturation in lipotoxic conditions are different from those in cumulus cells. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 3673, 2019.

MASUI, Y.; CLARKE, H. J. Oocyte maturation. **International Review of Cytology**, v. 57, p. 185-282, 1979.

MEMILI, E.; PEDDINTI, D.; SHACK, L. A.; NANDURI, B.; MCCARTHY, F.; SAGIRKAYA, H.; BURGESS, S. C. Bovine germinal vesicle oocyte and cumulus cell proteomics. **Reproduction**, v. 133, n. 6, p. 1107-1120, 2007.

MOORE, G. P.; LINTERN-MOORE, S. Transcription of the mouse oocyte genome. **Biology of Reproduction**, v. 18, n. 5, p. 865-870, 1978.

ORIMOTO, A. M.; DUMARESQ-DOIRON, K.; JIANG, J. Y.; TANPHAICHITR, N.; TSANG, B. K.; CARMONA, E. Mammalian hyaluronidase induces ovarian granulosa cell apoptosis and is involved in follicular atresia. **Endocrinology**, v. 149, n. 11, p. 5835-5847, 2008.

PAGE, T. J.; SIKDER, D.; YANG, L.; PLUTA, L.; WOLFINGER, R. D.; KODADEK, T.; THOMAS, R. S. Genome-wide analysis of human HSF1 signaling reveals a transcriptional program linked to cellular adaptation and survival. **Molecular BioSystems**, v. 2, n. 12, p. 627-639, 2006.

PAN, H.; O'BRIEN, M. J.; WIGGLESWORTH, K.; EPPIG, J. J.; SCHULTZ, R. M. Transcript profiling during mouse oocyte development and the effect of gonadotropin priming and development in vitro. **Developmental Biology**, v. 286, n. 2, p. 493-506, 2005.

PAVANI, K. C.; BARON, E.; CORREIA, P.; LOURENÇO, J.; BETTENCOURT, B. F.; SOUSA, M.; DA SILVA, F. M. Gene expression, oocyte nuclear maturation and

developmental competence of bovine oocytes and embryos produced after in vivo and in vitro heat shock. **Zygote**, v. 24, n. 5, p. 748-759, 2016.

PAYTON, R. R.; ROMAR, R.; COY, P.; SAXTON, A. M.; LAWRENCE, J. L.; EDWARDS, J. L. Susceptibility of bovine germinal vesicle-stage oocytes from antral follicles to direct effects of heat stress in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 4, p. 1303-1308, 2004.

PEDDINTI, D.; MEMILI, E.; BURGESS, S. C. Proteomics-based systems biology modeling of bovine germinal vesicle stage oocyte and cumulus cell interaction. **Plos One**, v. 5, n. 6, p. 11240, 2010.

PEREIRA, L. M. C.; BERSANO, P. R. O.; MOURA, A. A.; LOPES, M. D. First proteomic analysis of diestrus and anestrus canine oocytes and the germinal vesicle reveals candidate proteins involved in oocyte meiotic competence. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, n. 12, p. 1532-1542, 2019.

PIETERSE, M. C.; VOS, P. L. A. M.; KRUIP, T. A. M.; WURTH, Y. A.; VAN BENEDEEN, T. H.; WILLEMSE, A. H.; TAVERNE, M. A. M. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 35, n. 1, p. 857-862, 1991.

PÖHLAND, R.; SOUZA-CÁCARES, M. B.; DATTA, T. K.; VANSELOW, J.; MARTINS, M. I. M.; DA SILVA, W. A. L.; CARDOSO, C. J. T.; MELO-STERZA, F. A. Influence of long-term thermal stress on the *in vitro* maturation on embryo development and heat shock protein abundance in zebu cattle. **Animal Reproduction**, v. 17, n. 3, p. 1-10, 2020.

RÍOS, G. L.; BUSCHIAZZO, J.; MUCCI, N. C.; KAISER, G. G.; CESARI, A.; ALBERIO, R. H. Combined epidermal growth factor and hyaluronic acid supplementation of in vitro maturation medium and its impact on bovine oocyte proteome and competence. **Theriogenology**, v. 83, n. 5, p. 874-880, 2015.

RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, n. 2, p. 234-248, 2002.

ROCHA, A.; RANDEL, R. D.; BROUSSARD, J. R.; LIM, J. M.; BLAIR, R. M.; ROUSSEL, J. D.; GODKE, R. A.; HANSEL, W. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, v. 49, n. 3, p. 657-665, 1998.

RODRIGUEZ, K. F.; FARIN, C. E. Gene transcription and regulation of oocyte maturation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 12, n. 2, p. 55-67, 2004.

ROTH, Z.; ARAV, A.; BOR, A.; ZERON, Y.; BRAW-TAL, R.; WOLFENSON, D. Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heat-stressed cows. **Reproduction**, v. 122, n. 5, p. 737-744, 2001.

ROTH, Z.; HANSEN, P. J. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. **Reproduction**, v. 129, n. 2, p. 235-244, 2005.

SEN, U.; KURAN, M. Low incubation temperature successfully supports the in vitro bovine oocyte maturation and subsequent development of embryos. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 31, n. 6, p. 827-834, 2018.

SHEHAB-EL-DEEN, M. A.; LEROY, J. L.; FADEL, M. S.; SALEH, S. Y.; MAES, D.; VAN SOOM, A. Biochemical changes in the follicular fluid of the dominant follicle of high producing dairy cows exposed to heat stress early post-partum. **Animal Reproduction Science**, v. 117, n. 3-4, p. 189-200, 2010.

SHI, D. S.; AVERY, B.; GREVE, T. Effects of temperature gradients on in vitro maturation of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 50, p. 667-674, 1998.

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

SIRARD, M. A. Folliculogenesis and acquisition of oocyte competence in cows. **Animal Reproduction**, v. 16, n. 3, p. 449-454, 2019.

STOJKOVIC, M.; MACHADO, S. A.; STOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONÇALVES, P. B.; WOLF, E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: Correlation with morphological criteria and developmental capacity after

in vitro fertilization and culture. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 3, p. 904-909, 2001.

STRICKER, S. A. Structural reorganization of the endoplasmic reticulum during egg maturation and fertilization. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 17, n. 2, p. 303-313, 2006.

STURMEY, R. G.; O'TOOLE, P. J.; LEESE, H. J. Fluorescence resonance energy transfer analysis of mitochondrial:lipid association in the porcine oocyte. **Reproduction**, v. 132, n. 6, p. 829-837, 2006.

SUN, S. C.; LIN, S. L.; ZHANG, D. X.; LU, S. S.; SUN, Q. Y.; KIM, N. H. Borelian regulates bipolar spindle formation but may not act as chromosomal passenger during mouse oocyte meiosis. **Frontiers in bioscience (Elite edition)**, v. 2, n. 3, p. 991-1000, 2010.

SUTTON, M. L.; GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. **Human Reproduction Update**, v. 9, n. 1, p. 35-48, 2003.

THIBAUT, C.; SZÖLLÖSI, D.; GÉRARD, M. Mammalian oocyte maturation. **Reproduction Nutrition Development**, v. 27, n. 5, p. 865-896, 1987.

THOMAS, R. E.; ARMSTRONG, D. T.; GILCHRIST, R. B. Bovine cumulus cell-oocyte gap junctional communication during in vitro maturation in response to manipulation of cell-specific cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate levels. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 3, p. 548-556, 2004.

TORRES-JÚNIOR, J. R. DE S.; PIRES, M. DE F. A.; DE SÁ, W. F.; FERREIRA, A. DE M.; VIANA, J. H. M.; CAMARGO, L. S. A.; RAMOS, A. A.; FOLHADELLA, I. M.; POLISSENI, J.; DE FREITAS, C.; CLEMENTE, C. A. A.; DE SÁ FILHO, M. F.; PAULA-LOPES, F. F.; BARUSELLI, P. S. Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v. 69, n. 2, p. 155-166, 2008.

TREMBLAY, K.; VIGNEAULT, C.; MCGRAW, S.; SIRARD, M. A. Expression of Cyclin B1 messenger RNA isoforms and initiation of cytoplasmic polyadenylation in the bovine oocyte. **Biology of Reproduction**, v. 72, n. 4, p. 1037-1044, 2005.

TUKUR, H. A.; ALJUMAAH, R. S.; SWELUM, A. A-A.; ALOWAIMER, A. N.; SAADELDIN, I. M. The making of a competent oocyte – a review of oocyte development and its regulation. **Journal of Animal Reproduction and Biotechnology**, v. 35, p. 2-11, 2020.

TURATHUM, B.; ROYTRAKUL, S.; CHANGSANGFA, C.; SROYRAYA, M.; TANASAWET, S.; KITIYANANT, Y.; SAIKHUN, K. Missing and overexpressing proteins in domestic cat oocytes following vitrification and in vitro maturation as revealed by proteomic analyses. **Biological Research**, v. 51, n. 27, p. 1-12, 2018.

TURATHUM, B.; SAIKHUN, K.; ROYTRAKUL, S.; CHANGSANGFA, C.; TANASAWET, S.; SROYRAYA, M.; KITIYANANT, Y. Comparative proteomic analysis of mature and immature oocytes in domestic cats. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v. 9, n. 1, p. 22-30, 2020.

ULBERG, L. C.; BURFENING, P. J. Embryo death resulting from adverse environment on spermatozoa or ova. **Journal of Animal Science**, v. 26, n. 3, p. 571-577, 1967.

VAN DE LEEMPUT, E. E.; VOS, P. L. A. M.; ZEINSTRA, E. C.; SEVERS, M. M.; VAN DER WEIJDEN, G. C.; DIELEMAN, S. J. Improved in vitro embryo development using in vivo matured oocytes from heifers superovulated with a controlled preovulatory LH surge. **Theriogenology**, v. 52, n. 2, p. 335-349, 1999.

VIANA, J. H. M. 2017 statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals: Is it a turning point? In 2017 more in vitro-produced than in vivo-derived embryos were transferred worldwide. **Embryo Technology Newsletter**, v. 36, n. 4, p. 08-25, 2018.

VIRANT-KLUN, I.; LEICHT, S.; HUGHES, C.; KRIJGSVELD, J. Identification of maturation-specific proteins by single-cell proteomics of human oocytes. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 15, n. 8, p. 2616-2627, 2016.

VITALE, A. M.; CALVERT, M. E. K.; MALLAVARAPU, M.; YURTTAS P.; PERLIN, J.; HERR, J.; COONROD S. Proteomic profiling of murine oocyte maturation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, n. 5, p. 608-616, 2007.

WANG, H.; CHENG, Q.; LI, X.; HU, F.; HAN, L.; ZHANG, H.; LI, L.; GE, J.; YING, X.; GUO, X.; WANG, Q. Loss of TIGAR induces oxidative stress and meiotic defects in

oocytes from obese mice. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 17, n. 7, p. 1354-1364, 2018.

WATSON, A. J. Oocyte cytoplasmic maturation: A key mediator of oocyte and embryo developmental competence. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 13, p. 1-3, 2007.

WOLFENSON, D.; ROTH, Z.; MEIDAN, R. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 535-547, 2000.

YADAV, P. K.; TIWARI, M.; GUPTA, A.; SHARMA, A.; PRASAD, S.; PANDEY, A. N.; CHAUBE, S. K. Germ cell depletion from mammalian ovary: possible involvement of apoptosis and autophagy. **Journal of Biomedical Science**, v. 25, n. 36, p. 1-7.

YAN, C.; WANG, P.; DEMAYO, J.; DEMAYO, F. J.; ELVIN, J. A.; CARINO, C.; PRASAD, S. V.; SKINNER, S. S.; DUNBAR, B. S.; DUBE, J. L.; CELESTE, A. J.; MATZUK, M. M. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. **Molecular Endocrinology**, v. 15, n. 6, p. 854-866, 2001.

ZAMPOLLA, T.; SPIKINGS, E.; RAWSON, D.; ZHANG, T. Cytoskeleton proteins F-actin and tubulin distribution and interaction with mitochondria in the granulosa cells surrounding stage III zebrafish (*Danio rerio*) oocytes. **Theriogenology**, v. 76, n. 6, p. 1110-1119, 2011.

ZERON, Y.; OCHERETNY, A.; KEDAR, O.; BOROCHOV, A.; SKLAN, D.; ARAV, A. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. **Reproduction**, v. 121, n. 3, p. 447-454, 2001.

CAPÍTULO 2.

4. Artigo: Artigo original assegurando as normas da revista *Ciência Rural*, ISSN: 1678-4596, qualificada como B2 pelo QUALIS – CAPES.

Uso da análise proteômica comparativa para avaliar os efeitos da utilização da temperatura de 37,5 °C, mais próximo da fisiológica, na maturação *in vitro* de oócitos bovinos

Use of comparative proteomic analysis to evaluate the effects of using a temperature of 37.5 °C, closer to bovine biology, on *in vitro* maturation of bovine oocytes

Winy Caldas Moreno Tavares, Vinicius Maretto, Vanildo Silveira, Vitor Batista Pinto, Ivan Cunha Bustamante Filho, Maria Clara Caldas-Bussiere

Resumo

A etapa de maturação é de fundamental importância para a produção *in vitro* de embriões e, por isso, grandes esforços têm sido feitos para mimetizar o que ocorre *in vivo*. Estudos prévios constataram que no interior dos folículos pré-ovulatórios de fêmeas bovinas a temperatura é aproximadamente 1 °C menor que a temperatura retal, ou seja, em torno de 37,5 °C. Contudo, a temperatura utilizada durante a maturação *in vitro* (MIV) continua sendo de 38,5 °C. Assim, este estudo avaliou o efeito no perfil proteômico da diminuição de 1 °C da temperatura durante a MIV em relação à utilizada rotineiramente na espécie bovina. Complexos *cumulus*-oócitos (CCOs) foram maturados *in vitro* a 38,5 °C (controle) ou a 37,5 °C (tratamento). Após a MIV, a taxa de maturação nuclear e o grau de expansão das células do *cumulus* foram avaliados. O acúmulo de proteínas foi avaliado por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplado a Espectrometria de Massas (nUPLC-MS/MS) (no total, n=1500 para o controle e

n=1500 para o tratamento, em três replicatas). A partir das ferramentas de bioinformática foi possível analisar função molecular, componente celular, processo biológico e vias de sinalização às quais as proteínas encontradas estão relacionadas e avaliar a rede de interação proteína-proteína e os miRNAs associados aos genes reguladores das proteínas observadas na análise proteômica. Não foi observada diferença entre os grupos nas análises de maturação nuclear ($P > 0,05$) e expansão do *cumulus* ($P > 0,05$). A análise proteômica comparativa identificou 806 proteínas, das quais sete foram *up*- e 12 *down*-acumuladas, além de 12 proteínas únicas no grupo controle e oito no grupo tratamento. O grupo controle apresentou proteínas únicas relacionadas à respiração celular e progressão da meiose, enquanto o grupo tratado apresentou proteínas únicas relacionadas ao dobramento de proteínas e inibição do processo de apoptose. Houve ainda acúmulo diferencial de diversas proteínas que atuam em diferentes vias metabólicas de oócitos. Conclui-se que, apesar de pequena, a diminuição da temperatura de incubação dos oócitos na MIV acarreta alterações no perfil proteômico destas células, sugerindo uma termorregulação na expressão de genes de oócitos bovinos maturados *in vitro*. Mais estudos são necessários para confirmar se estas alterações proteômicas observadas em oócitos maturados à 37,5 °C estão ligadas à diminuição do estresse metabólico, podendo ter impactos positivos mais tardios no desenvolvimento embrionário.

Palavras-chave: MIV, termossensível, gado, espectrometria de massas, proteômica comparativa

Abstract

The maturation stage is of fundamental importance for the *in vitro* production of embryos and, therefore, great efforts have been made to mimic what occurs *in vivo*. Previous studies found that inside the pre-ovulatory follicles of bovine females, the temperature is approximately

1 °C lower than the rectal temperature, that is, around 37.5 °C. However, the temperature used during *in vitro* maturation (IVM) is still 38.5 °C. Thus, this study evaluated the effect of a 1 °C decrease in temperature during IVM in relation to that used routinely in bovine species. Cumulus-oocyte complexes (COCs) were matured *in vitro* at 38.5 °C (control) or at 37.5 °C (treatment). After IVM, the rate of nuclear maturation and the degree of expansion of cumulus cells were evaluated. Protein accumulation was evaluated by Ultra Performance Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry (nUPLC-MS/MS) (in total, n=1500 for the control and n=1500 for the treatment, in three replicates). From the bioinformatics tools it was possible to analyze molecular function, cellular component, biological process, and signaling pathways to which the proteins found are related to evaluate the protein-protein interaction network and the miRNAs associated with the regulatory genes of the proteins observed in the proteomic analysis. No difference was observed between the groups in the analysis of nuclear maturation ($P > 0.05$) and cumulus expansion ($P > 0.05$). Comparative proteomic analysis identified 806 proteins, of which seven were up- and 12 down-accumulated, in addition to 12 unique proteins in the control group and eight in the treatment group. The control group presented unique proteins related to cellular respiration and meiosis progression, while the treated group presented unique proteins related to protein folding and inhibition of the apoptosis process. There was also differential accumulation of several proteins that act in different metabolic pathways of oocytes. It is concluded that, despite being small, the decrease in the incubation temperature of oocytes in IVM causes alterations in the proteomic profile of these cells, suggesting a thermoregulation in the expression of genes from bovine oocytes matured *in vitro*. More studies are needed to confirm whether these proteomic changes observed in oocytes matured at 37.5 °C are linked to a decrease in metabolic stress, which may have positive impacts later on in embryonic development.

Key words: IVM, thermosensitive, cattle, mass spectrometry, comparative proteomics.

INTRODUÇÃO

A técnica de produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos é amplamente utilizada no mercado agropecuário, representando 66% dos embriões produzidos no mundo (BARUSELLI et al., 2019). A etapa de maturação *in vitro* (MIV) consiste na progressão meiótica do complexo *cumulus*-oócito (CCO) até o estágio de metáfase II (M II) quando será possível a fertilização dessa célula (SIRARD, 2001; SIRARD et al., 2006). Contudo, oócitos maturados *in vitro* não são tão competentes quanto os maturados *in vivo* (RIZOS et al., 2002; GILCHRIST & THOMPSON, 2007; TUKUR et al., 2020) e, por isso, protocolos de MIV vem sofrendo adaptações em relação a composição do meio de cultivo para mimetizar ao máximo o processo que ocorre naturalmente *in vivo* (LUCIANO et al., 1999; ALBUZ et al., 2010; GUIMARÃES et al., 2015; LEAL et al., 2018).

Sabe-se que a temperatura retal profunda nos bovinos adultos é em média 38,5 °C (DIRKSEN et al., 1993) e essa foi considerada por anos como a mesma temperatura encontrada nos órgãos abdominais (LENZ et al., 1983). Paralelamente, testes de reação acrossômica (importantes para a etapa da fertilização *in vitro*), apresentaram índices satisfatórios nesta temperatura. Estes fatores foram levados em consideração para determinar a temperatura média de 38,5 °C para o ajuste das incubadoras nos protocolos de PIVE. Porém, pesquisas mais recentes evidenciaram que a temperatura dos órgãos do trato reprodutivo é inferior, ao redor de 37,5 °C (HUNTER, 2012; LÓPEZ-GATIUS; HUNTER, 2019a; LÓPEZ-GATIUS; HUNTER, 2019b).

Um grupo de pesquisadores adaptou um sistema durante o procedimento de *ovum pick up* a fim de detectar a temperatura interna dos folículos dominantes de fêmeas bovinas. Estes autores demonstraram que em vacas monovulares, os folículos revelaram uma temperatura cerca de 1,5 °C mais baixa do que as temperaturas retais em vacas que ovularam, enquanto

não foram detectadas diferenças de temperatura em vacas que não ovularam (LÓPEZ-GATIUS & HUNTER, 2019b). Posteriormente, o mesmo grupo avaliou as temperaturas em vacas bi-ovulares (contendo um folículo por ovário) sob estresse térmico. Similarmente, as temperaturas dos folículos ovulatórios foram significativamente mais frias (cerca de 0,9 °C) do que as temperaturas retais, sem diferença significativa na temperatura dos folículos não ovulatórios. A ovulação dos folículos apresentando temperatura mais baixa resultou em um aumento de 3,6 vezes na taxa de prenhez das fêmeas, demonstrando que o resfriamento folicular é necessário para desencadear a ovulação e correlaciona-se positivamente com o potencial de prenhez em vacas (LÓPEZ-GATIUS & HUNTER, 2019a). Desta forma, o possível ajuste na temperatura da incubadora ao longo da PIVE pode trazer benefícios.

Há alguns fatores que podem explicar esta diminuição de temperatura no folículo pré-ovulatório. Primeiramente, o folículo dominante é uma estrutura repleta de líquido e o suprimento de vasos sanguíneos, que auxilia na troca de calor dos tecidos, atinge apenas a região da teca, o que pode contribuir para que a temperatura oocitária seja menor. Reações endotérmicas, ainda não elucidadas, são candidatas a ação de absorção de parte do calor presente nestas estruturas, estas reações podem estar relacionadas com a síntese e secreção de hormônios esteroides e proteínas, com a expansão do *cumulus* e com a hidratação dos proteoglicanos podendo gerar um resfriamento localizado (HUNTER et al., 1997). A exposição a temperaturas mais altas (41°C) que o ideal, causa alterações na fisiologia reprodutiva dos animais e, também, possui efeito nos oócitos, como por exemplo no processo de apoptose (ROTH & HANSEN, 2004; FERREIRA et al., 2016), autofagia (LATORRACA et al., 2020), baixa taxa de clivagem pós-fertilização (KALO & ROTH, 2011; GENDELMAN & ROTH, 2012b; FERREIRA et al., 2016) e alterações na conformação do citoesqueleto (ROTH & HANSEN, 2005; GENDELMAN & ROTH, 2012a; PAVANI et al., 2016).

Estudos prévios que utilizaram temperaturas mais baixas de incubação nos protocolos de MIV não apresentaram diferença significativa nas taxas de maturação, clivagem, blastocisto e eclosão (LENZ et al., 1983; KATSKA & SMORAG, 1985; SHI et al., 1998; SEN & KURAN, 2018; PÖHLAND et al., 2020). Contudo, *in vivo*, a taxa de prenhez em vacas onde houve o resfriamento folicular foi maior (LÓPEZ-GATIUS & HUNTER, 2019a), sugerindo que a qualidade da maturação oocitária aumenta. Estudos proteômicos podem identificar marcadores de competência oocitária e, futuramente, contribuir com a possível reavaliação da temperatura ideal a ser utilizada na MIV bovina. Assim, o objetivo deste estudo foi comparar o perfil proteômico de CCOs bovinos maturados *in vitro* a 38,5 °C vs. 37,5 °C para identificar as diferentes vias metabólicas que são utilizadas pelos oócitos.

MATERIAL E MÉTODOS

Meios e reagentes

Todos os meios e reagentes utilizados foram da Sigma-Aldrich[®], São Paulo, Brasil, exceto os especificados no texto.

Coleta dos ovários

Os ovários de animais predominantemente mestiços da raça Nelore foram trazidos de abatedouros locais para o laboratório em caixa isotérmica contendo solução salina a 0,9% estéril suplementada com 0,01% de antibiótico (Agrovet 5.000.000, Elanco[®], São Paulo, Brasil) a 30 °C. No laboratório, os ovários foram lavados e transferidos para um *becker* contendo solução salina a 0,9% estéril suplementada com 0,01% de antibiótico.

Coleta e seleção dos complexos *cumulus*-oócito

Com uma seringa de 10 mL acoplada a agulha 18G foram puncionados os folículos que apresentaram 3-8 mm. Os CCOs, juntamente com o fluido folicular, foram depositados em tubo cônico de 50 mL contendo TCM-199 com HEPES suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB - Cultilab[®], São Paulo, Brasil), 10 µL/mL de solução de antibiótico e antimicótico (AA), 1 mM de glutamina e 0,5 mM de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) para inibição da retomada de meiose durante a manipulação dos CCOs (VIANA et al., 2007). Após a decantação, foi feita a triagem dos CCOs graus I e II, segundo de LOOS et al. (1989). Posteriormente, esse oócitos foram lavados em gotas de meio TCM-199 com HEPES suplementado com 5% de SFB, 10 µL/mL de AA e 1 mM de glutamina para retirada de debris e do IBMX e em seguida foram lavados em gotas de meio MIV [TCM-199 suplementado com 10% de SFB, 0,7 µg/mL de hormônio foliculo-estimulante recombinante (r-hFSH – Gonal-F, Merck[®] Serono S.p.A., Bari, Itália), 10 µL/mL de AA, 0,2 mM de piruvato de sódio e 0,4 mM de glutamina] e foram submetidos ao processo de MIV.

Maturação *in vitro*

Os grupos de CCOs foram transferidos para placas de 4 poços (NUNC[®] Rochester, Nova Iorque, EUA), contendo 30 CCOs por poço com 500 µL (VIANA et al., 2007) de meio MIV, e incubados por 22 h nas seguintes temperaturas: 38,5 °C (grupo controle) ou 37,5 °C (grupo tratado).

Avaliação da expansão do *cumulus*

A expansão do *cumulus* foi avaliada 22 h após o início da MIV, utilizando-se um método de classificação subjetiva: 0 – nenhuma resposta observada; 1 – resposta mínima; 2 – expansão das camadas externas; 3 – expansão de todas as camadas, exceto *corona radiata*; 4 – expansão de todas as camadas (TAO et al., 2004; MATTA et al., 2009). Dez repetições foram realizadas (n=4410).

Avaliação da maturação nuclear

Após a classificação subjetiva de expansão das células do *cumulus*, os CCOs foram lavados em solução de tampão fosfato salino (PBS) acrescido de 0,1% de álcool polivinílico (PVA). Os CCOs foram desnudados mecanicamente por sucessivas pipetagens e lavados novamente em gotas de PBS acrescido de 0,1% de PVA e analisados em microscópio estereoscópico (200x, SMZ745, Nikon®, Tóquio, Japão). Os oócitos foram considerados em M II quando foi observada a presença do primeiro corpúsculo polar (TURATHUM et al., 2020). Um total de 440 oócitos obtidos de 10 repetições foram analisados. Em seguida, os oócitos maturados foram centrifugados a $3000 \times g$ por 5 minutos, o sobrenadante foi retirado e o *pellet* foi armazenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a realização da análise proteômica (LABAS et al., 2017).

Análise proteômica - Extração de proteínas

A extração total das proteínas das amostras de oócitos foi realizada de acordo com o protocolo descrito por WANG et al. (2014) e MACIEL Jr et al. (2018), com modificações. Amostras (500 oócitos em cada repetição, em solução de PBS, com três repetições por tratamento) foram maceradas em nitrogênio líquido contendo 100 μL de tampão de extração

que consistiu em 7M ureia (GE Healthccare, NJ, USA), 2M thiourea (GE Healthcare), 2% Triton X-100 (GE Healthcare), 1% dithiothreitol (DTT, GE Healthcare), 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF, Sigma-Aldrich, MO, USA). Em seguida, as células foram lisadas em cinco ciclos de 10 segundos de sonicação e um minuto em gelo, vortexadas por 30 min e centrifugadas a $16.000 \times g$ por 20 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram coletados e a concentração de proteínas foi determinada usando o 2-D Quant Kit[®] (GE Healthcare).

Análise proteômica - Digestão de proteínas

Um total de 100 µg de proteínas foi utilizado para a digestão. A digestão foi realizada usando unidades de filtro Microcon-30 kDa (Merck Millipore, MA, USA) com a metodologia de preparação de amostra auxiliada por filtro (FASP) (REIS et al., 2021). A concentração dos peptídeos obtidos de cada repetição biológica foi determinada utilizando o espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) a 205 nm.

Análise proteômica - Espectrometria de massas e análise de dados

As amostras foram injetadas em um espectrômetro de massa de cromatografia líquida ultra-pura (UPLC) nanoAcquity conectado a um instrumento Q-TOF SYNAPT G2-Si (Waters[®], Manchester, Reino Unido). As corridas consistiram em três réplicas biológicas de 1,945 µg de amostra de peptídeo. A espectrometria de massa foi realizada no modo positivo e de resolução (modo V), com mobilidade iônica e no modo de aquisição independente de dados (DIA). A energia de colisão de transferência aumentou de 19 V para 55 V no modo de alta energia e voltagens de cone e capilares de 30 V e 2750 V, respectivamente. Este experimento foi conduzido com uma temperatura de fonte de 70 °C. O [Glu1]-fibrinopeptídeo

B humano a 100 fmol/ μ L 217 foi usado como um calibrante externo e a aquisição de massa de bloqueio foi realizada a cada 30 segundos. A aquisição do espectro de massa foi realizada usando o *software* MassLynx v.4.0 (Waters[®], Manchester, Reino Unido).

O processamento dos espectros e as condições de pesquisa em bancos de dados foram realizados usando o *software* ProteinLynx Global SERVER (PLGS) v.3.02 (Waters[®], Manchester, Reino Unido). A análise HDMS^E utilizou os seguintes parâmetros: Apex3D de 150 contagens para o limite de baixa energia, 50 contagens para o limite de energia elevada e 750 contagens para o limite de intensidade; uma clivagem perdida; íons de fragmento mínimo por peptídeo igual a três; fragmento mínimo de íons por proteína igual a sete; peptídeos mínimos por proteína igual a dois; modificações fixas de carbamidometil (C) e modificações variáveis de oxidação (M) e fosforil (STY); taxa de falsa descoberta (FDR) de 1%. Para a identificação de proteínas, utilizamos o banco de dados de proteínas de *Bos indicus* x *Bos taurus* (ID: UP000314981, janeiro 2021), disponível no UniProtKB (www.uniprot.org). As análises de quantificação *label free* foram realizadas usando o *software* ISOQuant v.1.8 (DISTLER et al., 2014). Para garantir a qualidade dos resultados, após o processamento dos dados apenas as proteínas presentes nas três corridas foram aceitas para análise diferencial de abundância. As proteínas foram consideradas *up*-acumuladas se o valor \log_2 de *fold change* (FC) fosse maior que 0,60 e *down*-acumuladas se o valor de \log_2 FC fosse menor que 0,60, de acordo com o teste *t* de Student (bicaudal, $P < 0,05$). A análise de enriquecimento funcional foi realizada utilizando o *software* OmicsBox versão 1.2.4 (<https://www.biobam.com/omicsbox>).

Os agrupamentos e interações de proteínas foram estudados usando banco de dados para análise de anotação, visualização e descoberta integrada (DAVID) (<https://david.ncifcrf.gov/>, versão 6.8) (HUANG et al., 2009) e ferramenta de pesquisa para recuperação de interação genes/proteínas (STRING) (<http://string-db.org/>, versão 11.0) com

agrupamento de *k-means* (SZKLARCZYK et al., 2017). Os grupamentos foram tratados manualmente para melhor visualização das interações proteína-proteína.

Os genes associados ao proteoma do oócito bovino foram analisados usando o módulo GENE2FUNC da plataforma mapeamento funcional e anotação de estudos de associação de todo genoma (FUMA) (WATANABE et al., 2017). Conjuntos de genes expressos diferencialmente foram pré-calculados no GENE2FUNC por meio de teste “t” bilateral para cada tecido contra todos os outros. Além disso, as análises incluíram as vias KEGG e *Hallmark*, bem como ontologia de genes baseada no banco de dados de assinaturas moleculares (MSigDB) (LIBERZON et al., 2015). Primeiro, genes selecionados foram analisados para alvos de microRNA (miRNA) usando os conjuntos de dados *Bos indicus* x *Bos taurus* dos servidores TargetScan (<http://targetscan.org>) (AGARWAL et al., 2015) e miRBASE (<http://mirbase.org>) (KOZOMARA & GRIFFITHS-JONES, 2011). Para evitar erros de anotação, todos os miRNAs identificados foram verificados para conservação entre os mamíferos utilizando miRBASE. Para visualizar a interação entre miRNAs e genes, os dados foram submetidos ao servidor miRNet 2.0 (<https://www.mirnet.ca>) (CHANG et al., 2020).

Análise estatística

Todos os CCOs foram distribuídos ao acaso dentro de cada grupo experimental e cada experimento foi repetido dez vezes (maturação nuclear e expansão do *cumulus*). Foram realizadas a análise de consistência dos dados e a estatística descritiva (PROC UNIVARIATE, SAS, 2019). O efeito dos diferentes tratamentos sobre as variáveis estudadas foi avaliado pela análise de variância (ANOVA) ou pelo teste “t” de Student, a 5% de probabilidade.

RESULTADOS

Taxa de maturação nuclear e expansão das células do *cumulus*

As médias e desvio padrão para taxa de maturação nuclear e expansão do *cumulus* estão apresentados na Tabela 2. Não foi observada diferença ($P > 0,05$) na taxa de maturação nuclear, bem como na taxa de expansão das células do *cumulus*.

Análise proteômica

A partir da análise proteômica, foram identificadas 806 proteínas (Tabela Suplementar S1) comuns aos grupos de oócitos maturados *in vitro* a 38,5 °C (controle) e a 37,5 °C (tratado). Além disso, foram descritas 12 proteínas únicas no grupo controle e oito proteínas únicas no grupo tratado (Figura 1). Em relação ao acúmulo diferencial de proteínas, observou-se cinco proteínas *up*-acumuladas e 12 *down*-acumuladas. Na Tabela 3, são apresentadas as proteínas únicas e diferencialmente acumuladas identificadas no contraste 37,5 °C / 38,5 °C.

A análise de enriquecimento gênico (Figura 2) demonstrou que os dois grupos atuam de forma similar, com pequenas variações. No processo biológico, o processo de secreção aparece levemente aumentado no grupo 37,5 °C (Figura 2A). A função molecular relacionada a ligação de complexo de proteína é discretamente maior no grupo controle (Figura 2B). Na classe componente celular não houve diferença entre os grupos.

Na via *hallmark* (Figura 3-A) foi possível observar a presença de importantes rotas metabólicas, como alvos MYC V1, fosforilação oxidativa, sinalização MTORC 1, metabolismo de ácidos graxos e glicólise. Já na via KEGG (Figura 3-B) foram enriquecidas as vias glicólise/gliconeogênese, regulação de actina no citoesqueleto, ciclo do ácido cítrico e metabolismo do piruvato. Na via *hallmark*, proteínas relacionadas a espermatogênese e na via

KEGG, proteínas relacionadas a via da glicólise/gliconeogênese estão em maior quantidade no grupo controle.

A análise *in silico* da rede de interação proteína-proteína (Figura 4) demonstrou interação entre as proteínas únicas do grupo 37,5 °C. Também é possível observar que as proteínas relacionadas ao metabolismo do piruvato e ao ciclo do ácido tricarboxílico são únicas ou *up*-acumuladas no grupo controle.

Das proteínas encontradas como diferencialmente acumuladas na análise proteômica (n=20), 13 possuem descrição de relação com genes. Desses 13 genes, o servidor miRNet reconheceu seis genes (DES, HMOX2, KRT75, FARSA, IDH2, CARHSP1) que são sabidamente regulados por 43 miRNAs bovinos (Figura 5).

DISCUSSÃO

Estudo objetivou comparar, pela primeira vez, o perfil proteômico de oócitos bovinos maturados *in vitro* a 38,5 °C vs. 37,5 °C, a fim de identificar possíveis mecanismos de proteção que são utilizados pelo oócito em situações de estresse metabólico. Apesar da taxa de maturação nuclear e expansão das células do *cumulus* não terem diferido, a análise proteômica identificou 806 proteínas comuns aos grupos de oócitos maturados *in vitro* sob diferentes temperaturas. Além disso, foram descritas 12 proteínas únicas no grupo controle e oito proteínas únicas no grupo tratado. Em relação ao acúmulo diferencial de proteínas, observou-se sete proteínas *up*-acumuladas e 12 *down*-acumuladas. Os dados do presente estudo indicam que, apesar de pequena, a diminuição da temperatura de incubação dos oócitos na MIV acarreta alterações no perfil proteômico destas células, sugerindo um mecanismo de termorregulação no controle da expressão de genes de oócitos bovinos maturados *in vitro*. Até o presente momento, há apenas seis artigos científicos publicados nas plataformas

tradicionais de busca em que tenha sido utilizada a análise proteômica de oócitos bovinos. Ressalta-se que em nenhum deles, o foco do estudo foi a comparação de diferentes temperaturas na MIV.

A ausência de diferença significativa na taxa de maturação nuclear (78,7 vs. 78,5%) e expansão das células do *cumulus* já era esperada, em razão dos resultados encontrados em estudos prévios avaliando-se temperaturas mais baixas na MIV. Exemplos de tais estudos envolvem o uso de temperaturas como 35 °C, 37 °C, 39 °C, que resultaram em taxas de maturação entre 66 e 75% (LENZ et al., 1983). Em outro estudo, em temperaturas de 33 °C, 35 °C, 37 °C, 38 °C e 39 °C, a taxa de oócitos maturados foi de 2,8%, 56,1%, 72,3%, 73,3% e 73,7%, respectivamente, sendo que nos três últimos grupos não houve diferença significativa. Ainda, após avaliação da taxa de viabilidade, os autores concluíram que as temperaturas de 35 a 37 °C foram as mais apropriadas (KATSKA; SMORAG, 1985). Desta forma, os resultados similares encontrados no presente estudo já eram esperados, sendo realizados para fins de controle de nosso sistema de maturação *in vitro*.

No grupo controle, foram identificadas 12 proteínas únicas. A nucleosídeo-difosfatocinase (NDK), proteína relacionada ao gene NME2, tem ação descrita na diferenciação e proliferação celular (BOISSAN et al., 2009; MARINO et al., 2012). Porém, sua função foi relatada apenas em oócitos de *Xenopus* em estágio de vesícula germinativa (VG) (OUATAS et al. 1998). De acordo com estes autores, estas proteínas se acumulam próximo às mitocôndrias e participam do processo de transcrição a partir de trifosfato de guanosina (GTP). A histona H4 (H4) está relacionada à progressão da meiose e ao alinhamento dos cromossomos (HAN et al., 2015; LU et al., 2017), bem como a tubulina alfa que atua na dinâmica dos microtúbulos do fuso meiótico (FENG et al., 2016). A L-lactato desidrogenase (LDHC) ainda não foi descrita em oócitos, porém, em outras células esta molécula é convertida em piruvato a partir da lactato desidrogenase (LDH) (BROWN & WHITELEY,

2009). A LDH foi descrita em oócitos participando da via da glicólise (BRINSTER, 1968; CETICA et al., 1999; KUMAR et al., 2013), bem como gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (BERMEJO-ÁLVAREZ et al., 2010).

No tratamento a 37,5 °C, foram identificadas oito proteínas únicas. A proteína peptidil-prolil cis-trans isomerase (PPIase) atua na estabilização, dobramento, maturação e tráfego de proteínas em oócitos (LO et al., 2007). A clusterina (CLU) ainda não foi descrita em oócitos, porém sua ação já foi relatada nas células da granulosa atuando na inibição do processo de apoptose (ZWAIN & AMATO, 2000; LUCKENBACH et al., 2011).

Nos oócitos bovinos maturados *in vitro* a 37,5 °C, há sete proteínas *up*-reguladas quando comparado ao grupo controle, sendo que quatro delas possuem informação descrita na literatura relacionada à oócitos: peroxirredoxina 4 (PRDX4), proteína de ligação do espermatozoide a zona pelúcida 3 (ZP3), proteína do choque térmico família A membro 6 (HSP70) e isocitrato desidrogenase dependente de NAD (NAD-IDH), subunidade mitocondrial.

A presença de PRDX4 já foi relatada anteriormente em oócitos (LEYENS et al., 2004), porém sua atividade ainda não foi descrita de forma isolada. Sabe-se que as proteínas que fazem parte da família PRDX apresentam função na organização cromossômica e montagem do fuso meiótico (JEON et al., 2017). Além disso, também atuam na regulação de sinais modulando os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) ou regulando a interação de proteínas vizinhas por meio da sinalização redox. No caso de oócitos, essa ação ocorre no fuso meiótico (RHEE et al., 2012; JEON et al., 2017).

A ZP3 está relacionada ao processo de fertilização, durante a ligação do espermatozoide à zona pelúcida do oócito, auxiliando no desencadeamento da reação acrossômica (FLORMAN et al., 1984; FLORMAN & WASSARMAN, 1985; KINLOCH et

al., 1995; CHEN et al., 1998; SIGNORELLI et al., 2012; KASHIR et al., 2014) e, logo em seguida, perde esta função, atuando assim na prevenção da polispermia (RINGUETTE et al., 1988). Além disso, também tem ação no rompimento da VG, atuando em vias que regulam a organização do citoesqueleto (GAO et al., 2017).

A HSP 70 é uma proteína chaperona que protege outras proteínas da ação do estresse térmico (DAUGAARD et al., 2007) e também auxilia na sobrevivência da célula inibindo o processo de apoptose quando o oócito é submetido ao estresse térmico moderado (ZERON et al., 2001). Yadav et al. (2013) descreveram aumento da expressão de HSP 70 em oócitos bubalinos maturados sob estresse térmico, porém, curiosamente, nossa análise, assim como Pöhland et al. (2020), sugeriram que a HSP70 foi *up*-regulada nos oócitos bovinos maturados em menor temperatura. Uma hipótese que justifique este achado é que, sob a temperatura de 38,5 °C, esta proteína seja degradada mais rapidamente devido estar sendo utilizada, porém faz-se necessário estudos mais aprofundados para elucidar este acúmulo diferencial.

Ainda no grupo tratado, há sete proteínas *up*-reguladas quando comparado ao grupo controle. Foram observadas 12 proteínas *down*-acumuladas, sendo cinco relacionadas previamente a oócitos: NDK, heme oxigenase (HO), dineína de cadeia leve (DYNLL1), tioredoxina (TRX) e isocitrato desidrogenase dependente de NADP (NADP-IDH). Nesta seção, NDK surge relacionada ao gene NME1 e sua função geral foi descrita previamente neste artigo. As vias metabólicas dos genes NME1 e NME2 ainda não foram diferenciadas em oócitos.

A função da HO ainda não foi detalhadamente descrita em oócitos, porém sabe-se que a HO-1 pode ser considerada um marcador de competência oocitária uma vez que sua deficiência resulta em falha na ovulação e na fertilização desses oócitos (ZENCLUSSEN et al., 2012). A DYNLL1 integra o complexo de proteínas dineína que atuam no oócito na

organização dos microtúbulos, sendo assim, participa da maturação oocitária citoplasmática (NAVARRO et al., 2004; MIAO et al., 2017). Um membro da família TRX, a TXNDC9 foi descrita participando da conformação do fuso meiótico e do equilíbrio redox durante a meiose (MA et al., 2017), bem como PRDX4.

A proteína isocitrato desidrogenase (IDH) foi identificada duas vezes em nosso estudo, a isoforma NAD-IDH, subunidade mitocondrial como *up*-acumulada e a isoforma NADP-IDH como *down*-acumulada. A proteína IDH é considerada importante para o ciclo do ácido tricarboxílico, a subunidade mitocondrial desta molécula indica que há utilização de NAD (nicotinamida adenina dinucleotídeo) e NADP (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) como aceptores de elétrons, já na subunidade citosólica há apenas a presença de NADP. O NAD-IDH até então não havia sido descrito em oócitos, diferente da isoforma NADP-IDH. Normalmente, em outras células de mamíferos, NADP-IDH aparece em maiores concentrações que NAD-IDH (CETICA et al., 2003). O NAD está relacionado aos processos catabólicos de produção de energia gerando ROS, enquanto NADP atua na defesa antioxidante (BLACKER & DUCHEN, 2016). É importante citar que as ROS em quantidade ideal são importantes para sinalização celular (redox), sendo prejudicial à célula somente em quantidades exacerbadas (HENSLEY et al., 2000; SCHIEBER & CHANDEL, 2014). Desta forma, a redução do acúmulo de NADP-IDH pode ser devido à ação de NAD-IDH, uma vez que não é necessária a ação antioxidante por não gerar uma quantidade prejudicial de ROS.

Os miRNAs são pequenas moléculas não-codificantes que regulam os eventos pós-transcricionais por meio da inibição ou bloqueio da tradução do RNA mensageiro (mRNA) (AMBROS, 2004; KIM & NAM, 2006). A ação dos miRNAs foi descrita previamente no processo de maturação oocitária de bovinos (TESFAYE et al., 2009; PASQUARIELLO et al., 2020). Segundo PASQUARIELLO et al. (2020), as vias de sinalização são inibidas quando os miRNAs relacionados apresentam expressão *up*-regulada. A isoforma do miR-1343-5p aqui

relacionado a HO e CARHSP1, também está relacionado ao desenvolvimento folicular, na transição para o estágio de folículo pré-ovulatório (GEBREMEDHN et al., 2015). Isoformas do miR-339a (aqui relacionado ao gene CARHSP1) e miR-423-3p (gene IDH2) e miR-140 (gene DES) foram descritos anteriormente regulando a maturação oocitária (TESFAYE et al., 2009). Curiosamente, todos os miRNAs aqui relatados estão ligados às proteínas encontradas na análise proteômica como *down*-reguladas. Faz-se necessário estudos mais aprofundados para averiguar se estas moléculas se encontram em menor acúmulo em oócitos bovinos maturados *in vitro* à 37,5 °C devido a ação silenciadora destes miRNAs ou outro mecanismo.

CONCLUSÃO

Este é o primeiro estudo de proteômica comparativa de oócitos bovinos submetidos à diferentes temperaturas durante a MIV. É possível concluir que mesmo uma pequena diminuição de temperatura de incubação durante a MIV modula o metabolismo dos oócitos, não apenas promovendo a *up* ou *down* regulação de acúmulo de proteínas, mas modulando a ocorrência de proteínas únicas tanto a 38,5 °C como a 37,5 °C. De forma geral, a 38,5 °C (controle), foram identificadas proteínas únicas relacionadas à respiração celular e progressão da meiose, enquanto a 37,5 °C, foram identificadas àquelas relacionadas ao dobramento de proteínas e inibição do processo de apoptose, possivelmente por serem menos requeridas pelo oócito. As proteínas encontradas neste estudo que ainda não tiveram suas funções descritas em oócitos são importantes candidatas para futuras avaliações funcionais em relação à maturação oocitária. Mais estudos são necessários para se definir se 37,5 °C é a temperatura ideal para ser utilizada na MIV de oócitos bovinos e a função destas proteínas únicas, assim como das proteínas ainda não descritas em oócitos.

Agradecimentos

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

Declaração de conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses. Os patrocinadores fundadores não tiveram nenhum papel no desenho do estudo, na coleta, análise ou interpretação de dados, na redação do manuscrito e na decisão de publicar os resultados.

Contribuição dos autores

W. C. M. Tavares conduziu o experimento com a colaboração de V. Maretto, e R. S. Reis. Dados referentes à proteômica foram analisados pela W.C.M. Tavares, M.C. Caldas-Bussiere, V. Silveira, V.B. Pinto e I. C. Bustamante Filho. M. C. Caldas-Bussiere e V. Silveira são os autores sênior. M. C. Caldas-Bussiere é a coordenadora do projeto. Todos os autores participaram do delineamento experimental e preparação do manuscrito.

Referências

AGARWAL, V. et al. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife*, v. 4, 2015. Available from: <<https://elifesciences.org/articles/05005>>. Accessed: Feb. 10, 2021. doi: 10.7554/eLife.05005.

ALBUZ, F.K. et al. Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel in vitro maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. **Human Reproduction**, v. 25, n. 12, p. 2999-3011, 2010. Available from: <<https://academic.oup.com/humrep/article/25/12/2999/550764>>. Accessed: Feb. 08, 2021. doi: 10.1093/humrep/deq246.

AMBROS, V. The functions of animal microRNAs. **Nature**, v. 431, n. 7006, p. 350-355, 2004. Available from: <<https://www.nature.com/articles/nature02871>>. Accessed: Feb. 14, 2021. doi: 10.1038/nature02871.

ASHBURNER, M. et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. **Nature Genetics**, v. 25, p. 25-29, 2000. Available from: <https://www.nature.com/articles/ng0500_25>. Accessed: Feb. 10, 2021. doi: 10.1038/75556.

BARUSELLI, P.S. et al. Challenges to increase the AI and ET markets in Brazil. **Animal Reproduction**, v. 16, n. 3, p. 364-375, 2019. Available from: <<https://www.animal-reproduction.org/article/doi/10.21451/1984-3143-AR2019-0050>>. Accessed: Feb. 08, 2021. doi: 10.21451/1984-3143-AR2019-0050.

BERMEJO-ÁLVAREZ, P. et al. Low oxygen tension during IVM improves bovine oocyte competence and enhances anaerobic glycolysis. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 20, n. 3, p. 341-349, 2010. Available from: <[https://www.rbmojournal.com/article/S1472-6483\(09\)00283-1/fulltext](https://www.rbmojournal.com/article/S1472-6483(09)00283-1/fulltext)>. Accessed: Feb. 13, 2021. doi: 10.1016/j.rbmo.2009.12.006.

BLACKER, T.S.; DUCHEN, M.R. Investigating mitochondrial redox state using NADH and NADPH autofluorescence. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 100, p. 53-65, 2016. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584916303926?via%3Dihub>>. Accessed: Feb. 13, 2021. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.08.010.

BOISSAN, M. et al. The mammalian nm23/NDPK family: from metastasis control to cilia movement. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 329, n. 1-2, p. 51-62, 2009. Available from: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11010-009-0120-7>>. Accessed: Feb. 13, 2021. doi: 10.1007/s11010-009-0120-7.

BREVINI-GANDOLFI, T.A.L.; GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1255-1276, 2001. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X01004812>>. Accessed: Feb. 12, 2021. doi: 10.1016/S0093-691X(01)00481-2.

BRINSTER, R.L. Lactate dehydrogenase activity in the oocytes of mammals. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 17, n. 1, p. 139-146, 1968. Available from: <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/17/1/jrf_17_1_017.xml>. Accessed: Feb. 13, 2021. doi: 10.1530/jrf.0.0170139.

BROWN, S.A.; WHITELEY, M. Characterization of the L-lactate dehydrogenase from *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **Plos One**, v. 4, n. 11, p. 1-5, 2009. Available from: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0007864>>. Accessed: Feb. 13, 2021. doi: 10.1371/journal.pone.0007864.

CETICA, P.D. et al. Effect of lactate dehydrogenase activity and isoenzyme localization in bovine oocytes and utilization of oxidative substrates on in vitro maturation. **Theriogenology**, v. 51, n. 3, p. 541-550, 1999. Available from: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X99000084>>. Accessed: Feb. 13, 2021. doi: 10.1016/s0093-691x(99)00008-4.

CETICA, P.D. et al. Involvement of enzymes of amino acid metabolism and tricarboxylic acid cycle in bovine oocyte maturation in vitro. **Reproduction**, v. 126, n. 6, p. 753-763, 2003.

Available from: <<https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/126/6/753.xml>>. Accessed: Feb. 13, 2021. doi: 10.1530/rep.0.1260753.

CHEN, J. et al. Inactivation of the mouse sperm receptor, mZP3, by site-directed mutagenesis of individual serine residues located at the combining site for sperm. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 11, p. 6193-6197, 1998. Available from: <<https://www.pnas.org/content/95/11/6193>>. Accessed: Feb. 13, 2021. doi: 10.1073/pnas.95.11.6193.

CHANG, L. et al. miRNet 2.0: network-based visual analytics for miRNA functional analysis and systems biology. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. W1, p. W244-W251, 2020. Available from: <<https://academic.oup.com/nar/article/48/W1/W244/5850315>>. Accessed: Feb. 10, 2021. doi: 10.1093/nar/gkaa467.

DA SILVA, W.A. et al. Shading effect on physiological parameters and in vitro embryo production of tropical adapted Nellore heifers in integrated crop-livestock-forest systems. **Tropical Animal Health and Production**, v. 52, p. 2273-2281, 2020. Available from: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11250-020-02244-3#citeas>>. Accessed: Feb. 20, 2021. doi: 10.1007/s11250-020-02244-3.

DE LOOS, F. et al. Morphology of immature bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 24, n. 2, p. 197-204, 1989. Available from: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mrd.1120240207>>. Accessed: Feb. 08, 2021. doi: 10.1002/mrd.1120240207.

DISTLER, U. et al. Drift time-specific collision energies enable deep-coverage data-independent acquisition proteomics. **Nature Methods**, v. 11, p. 167-170, 2014. Available from: <<https://www.nature.com/articles/nmeth.2767#citeas>>. Accessed: Feb. 08, 2021. doi: 10.1038/nmeth.2767.

FENG, R. et al. Mutations in TUBB8 and human oocyte meiotic arrest. **The New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 3, p. 223-232, 2016. Available from: <<https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1510791>>. Accessed: Feb. 13, 2021. doi: 10.1056/NEJMoa1510791.

FERREIRA, R.M. et al. The infertility of repeat-breeder cows during summer is associated with decreased mitochondrial DNA and increased expression of mitochondrial and apoptotic genes in oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 94, n. 3, p. 1-10, 2016. Available from: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article/94/3/66,%201-10/2434451>>. Accessed: Feb. 08, 2021. doi: 10.1095/biolreprod.115.133017.

FLORMAN, H.M. et al. Enzymatic dissection of the functions of the mouse egg's receptor for sperm. **Developmental Biology**, v. 106, n. 1, p. 243-255, 1984. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0012160684900794?via%3Dihub>>. Accessed: Feb. 13, 2021. doi: 10.1016/0012-1606(84)90079-4.

FLORMAN, H.M.; WASSARMAN, P.M. O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. **Cell**, v. 41, n. 1, p. 313-324, 1985. Available from: <[https://www.cell.com/cell/pdf/0092-8674\(85\)90084-4.pdf](https://www.cell.com/cell/pdf/0092-8674(85)90084-4.pdf)>. Accessed: Feb. 13, 2021. doi: 10.1016/0092-8674-(85)90084-4.

GAO, L.L. et al. ZP3 is required for germinal vesicle breakdown in mouse oocyte meiosis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 41272, 2017. Available from: <<https://www.nature.com/articles/srep41272>>. Accessed: Feb. 13, 2021. doi: 10.1038/srep.41272.

GEBREMEDHN, S. et al. MicroRNA expression profile in bovine granulosa cells of preovulatory dominant and subordinate follicles during the late follicular phase of the estrous cycle. **Plos One**, v. 10, n. 5, p. 1-26, 2015. Available from:

<<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0125912>>. Accessed: Feb. 14, 2021. doi: 10.1371/journal.pone.0125912.

GENDELMAN, M.; ROTH, Z. Incorporation of coenzyme Q10 into bovine oocytes improves mitochondrial features and alleviates the effects of summer thermal stress on developmental competence. **Biology of Reproduction**, v. 87, n. 5, p. 1-12, 2012a. Available from: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article/87/5/118,%201-12/2514091>>. Accessed: Feb. 08, 2021. doi: 10.1095/biolreprod.112.101881.

GENDELMAN, M.; ROTH, Z. Seasonal effect on germinal vesicle-stage bovine oocytes is further expressed by alterations in transcript levels in the developing embryos associated with reduced developmental competence. **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 1, p. 1-9, 2012b. Available from: <<https://europepmc.org/article/med/21957191>>. Accessed: Feb. 08, 2021. doi: 10.1095/biolreprod.111.092882.

GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. **Theriogenology**, v. 67, n. 1, p. 6-15, 2007. Available from: <<https://europepmc.org/article/med/17092551>>. Accessed: Feb. 08, 2021. doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.09.027.

GÖTZ, S. et al. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 10, p. 3420-3435, 2008. Available from: <<https://academic.oup.com/nar/article/36/10/3420/2410320>>. Accessed: Feb. 10, 2021. doi: 10.1093/nar/gkn176.

GUIMARÃES, A.L.S. et al. Evaluation of the simulated physiological oocyte maturation system for improving bovine *in vitro* embryo production. **Theriogenology**, v. 83, n. 1, p. 52-57, 2015. Available from:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X14005226>>. Accessed: Feb. 08, 2021. doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.07.042.

HAN, L. et al. Sirt6 depletion causes spindle defects and chromosome misalignment during meiosis of mouse oocyte. **Scientific Reports**, v. 5, n. 15366, p. 1-10, 2015. Available from: <<https://www.nature.com/articles/srep15366>>. Accessed: Feb. 13, 2021. doi: 10.1038/srep15366.

HENSLEY, K. et al. Reactive oxygen species, cell signaling and cell injury. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, n. 10, p. 1456-1462, 2000. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0891584900002525?via%3Dihub>>. Accessed: Feb. 14, 2021. doi: 10.1016/s0891-5849(00)00252-5.

HERMAN, A.B. et al. Regulation of stress granule formation by inflammation, vascular injury and atherosclerosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 39, n. 10, p. 2014-2027, 2019. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6761003/pdf/nihms-1537613.pdf>>. Accessed: Feb. 20, 2021. doi: 10.1161/ATVBAHA.119.313034.

HERNANDEZ-VALLADARES, M. et al. Reliable FASP-based procedures for optimal quantitative proteomic and phosphoproteomic analysis on samples from acute myeloid leukemia patients. **Biological Procedures Online**, v. 18, n. 13, p. 1-10, 2016. Available from: <<https://biologicalproceduresonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12575-016-0043-0#citeas>>. Accessed: Feb. 08, 2021. doi: 10.1186/s12575-016-0043-0.

HUANG, D.W. et al. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. **Nature Protocols**, v. 4, p. 44-57, 2009. Available from: <<https://www.nature.com/articles/nprot.2008.211>>. Accessed: Feb. 10, 2021. doi: 10.1038/nprot.2008.211.

HUNTER, R.H.F. Temperature gradients in female reproductive tissues. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 24, p. 377-380, 2012. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1472648312000090>>. Accessed: Feb. 08, 2021. doi: doi.org/10.1016/j.rbmo.2011.12.007.

HUNTER, R.H.F. et al. Graafian follicles are cooler than neighbouring ovarian tissues and deep rectal temperatures. **Human Reproduction**, v. 12, n. 1, p. 95-100, 1997. Available from: <<https://academic.oup.com/humrep/article/12/1/95/806682>>. Accessed: Feb. 22, 2021. doi: 10.1093/humrep/12.1.95.

HYTTEL, P. et al. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 47, n. 1, p. 23-32, 1997. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X96003366>>. Accessed: Feb. 12, 2021. doi: 10.1016/S0093-691X(96)00336-6.

JEON, H.J. et al. Peroxiredoxins are required for spindle assembly, chromosome organization and polarization in mouse oocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 489, n. 2, p. 193-199, 2017. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006291X17310203?via%3Dihub>>. Accessed: Feb. 13, 2021. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.05.127.

KALO, D.; ROTH, Z. Involvement of the sphingolipid ceramide in heat-shock induced apoptosis of bovine oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, n. 7, p. 876-888, 2011. Available from: <<https://www.publish.csiro.au/rd/rd10330>>. Accessed: Feb. 08, 2021. doi: 10.1071/RD10330.

KASHIR, J. et al. Sperm-induced Ca²⁺ release during egg activation in mammals. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 450, n. 3, p. 1204-1211, 2014. Available from:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006291X14007293?via%3Dihub>>.

Accessed: Feb. 13, 2021. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.04.078.

KATSKA, L.; SMORAG, Z. The influence of culture temperature on in vitro maturation of bovine oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 9, p. 205-212, 1985. Available from:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/037843208590003X>>. Accessed: Feb.

08, 2021. doi: 10.1016/0378-4320(85)90003-X.

KHONG, A. et al. The stress granule transcriptome reveals principles of mRNA accumulation in stress granules. **Molecular Cell**, v. 68, n. 4, p. 808-820, 2017. Available from:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5728175/pdf/nihms914863.pdf>>. Accessed:

Feb. 20, 2021. doi: 10.1016/j.molcel.2017.10.015.

KIM, V.B.; NAM, J.W. Genomics of microRNA. **Trends in Genetics**, v. 22, n. 3, p. 165-173,

2006. Available from: <<https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.01.003>>. Accessed: Feb. 14, 2021.

doi: 10.1016/j.tig.2006.01.003.

KINLOCH, R.A. et al. Mapping the mouse ZP3 combining site for sperm by exon swapping and site-directed mutagenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the**

United States of America, v. 92, n. 1, p. 263-267, 1995. Available from:

<<https://www.pnas.org/content/92/1/263>>. Accessed: Feb. 13, 2021. doi:

10.1073/pnas.92.1.263.

KOZOMARA, A.; GRIFFITHS-JONES, S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. suppl_1, p. D152-D157, 2011.

Available from: <https://academic.oup.com/nar/article/39/suppl_1/D152/2506002>.

Accessed: Feb. 10, 2021. doi: 10.1093/nar/gkq1027.

KUMAR, P. et al. Expression pattern of glucose metabolism genes in relation to development rate of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocyte and in-vitro produced embryos. **Theriogenology**, v.

80, n. 8, p. 914-922, 2013. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X13002896?via%3Dihub>.

Accessed: Feb. 13, 2021. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.07.018.

LABAS, V. et al. Intact cell MALDI-TOF mass spectrometry on single bovine oocyte and follicular cells combined with top-down proteomics: a novel approach to characterize markers of oocyte maturation. **Journal of Proteomics**, v. 20, n. 175, p. 56-74, 2018. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1874391917301185>. Accessed:

Feb. 08, 2021. doi: doi.org/10.1016/j.jprot.2017.03.027.

LEAL, G.R. et al. Evaluation of the simulated physiological oocyte maturation (SPOM) system on F1 Gyr x Holstein oocytes and embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 59, n. 4 p. 634-640, 2018. Available from: <https://www.publish.csiro.au/an/AN17895>. Accessed: Feb. 08, 2021. doi: doi.org/10.1071/AN17895.

LEE, C.Y.; SEYDOUX, G. Dynamics of mRNA entry into stress granules. **Nature Cell Biology**, v. 21, n. 2, p. 116-117, 2019. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6779317/pdf/nihms-1053233.pdf>.

Accessed: Feb. 20, 2021. doi: 10.1038/s41556-019-0278-5.

LENZ, R.W. et al. In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature-dependent processes. **Biology of Reproduction**, v. 29, n. 1, p. 173-179, 1983. Available from: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/29/1/173/2766329>. Accessed: Feb. 08, 2021. doi: 10.1095/biolreprod29.1.173.

LEYENS, G. et al. Expression of peroxiredoxins in bovine oocyte and embryos produced in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 69, n. 3, p. 243-251, 2004. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mrd.20145>. Accessed: Feb. 13, 2021. doi: 10.1002/mrd.20145.

LIBERZON, A. et al. The molecular signatures database hallmark gene set collection. **Cell Systems**, v. 1, n. 6, p. 417-425, 2015. Available from: <<https://doi.org/10.1016/j.cels.2015.12.004>>. Accessed: Feb. 10, 2021. doi: 10.1016/j.cels.2015.12.004.

LIPECKA, J. et al. Sensitivity of mass spectrometry analysis depends on the shape of the filtration unit used for filter aided sample preparation. **Proteomics**, v. 16, n. 13, p. 1852-1857, 2016. Available from: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pmic.201600103>>. Accessed: Feb. 08, 2021. doi: 10.1002/pmic.201600103.

LO, T.S. et al. Molecular coordinated regulation of gene expression during ovarian development in the penaeid shrimp. **Marine Biotechnology**, v. 9, n. 4, p. 459-468, 2007. Available from: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10126-007-9006-4>>. Accessed: Feb. 13, 2021. doi: 10.1007/s10126-007-9006-4.

LÓPEZ-GATIUS, F.; HUNTER, R.H.F. Clinical relevance of pre-ovulatory follicular temperature in heat-stressed lactating dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, n. 3, p. 1-5, 2017. Available from: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/rda.12916>>. Accessed: Feb. 08, 2021. doi: 10.1111/rda.12916.

LÓPEZ-GATIUS, F.; HUNTER, R.H.F. Pre-ovulatory follicular cooling correlates positively with the potential for pregnancy in dairy cows: Implications for human IVF. **Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction**, v. 48, n. 6, p. 419-422, 2019a. Available from: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2468784719300182>>. Accessed: Feb. 08, 2021. doi: 10.1016/j.jogoh.2019.03.005.

LÓPEZ-GATIUS, F.; HUNTER, R.H.F. Pre-ovulatory follicular temperature in bi-ovular cows. **The Journal of Reproduction and Development**, v. 65, n. 2, p. 191-194, 2019b.

Available from: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/65/2/65_2018-111/article>.

Accessed: Feb. 08, 2021. doi: 10.1262/jrd.2018-111.

LU, Y. et al. Cohesin acetyltransferase Esco2 regulates SAC and kinetochore functions via maintaining H4K16 acetylation during mouse oocyte meiosis. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 16, p. 9388-9397, 2017. Available from: <<https://academic.oup.com/nar/article/45/16/9388/3894175>>. Accessed: Feb. 13, 2021. doi: 10.1093/nar/gkx563.

LUCKENBACH, J.A. et al. Follicle-stimulating hormone regulation of ovarian transcripts for steroidogenesis-related protein and cell survival, growth and differentiation factors in vitro during early secondary oocyte growth in coho salmon. **General and Comparative Endocrinology**, v. 171, n. 1, p. 52-63, 2011. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016648010004715?via%3Dihub>>.

Accessed: Feb. 13, 2021. doi: 10.1016/j.ygcen.2010.12.016.

MACIEL JR, V.L. et al. L-arginine alters the proteome of frozen-thawed bovine sperm during in vitro capacitation. **Theriogenology**, v. 119, n. 1, p. 1-9, 2018. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X18303893?via%3Dihub>>.

Accessed: Feb. 08, 2021. doi: 10.1016/j.theriogenology.2018.06.018.

MARINO, N. et al. Insights into the biology and prevention of tumor metastasis provided by the nm23 metastasis suppressor gene. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 31, n. 3-4, p. 593-603, 2012. Available from: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10555-012-9374-8>>.

Accessed: Feb. 13, 2021. doi: 10.1007/s10555-012-9374-8.

MATTA, S.G.C. et al. Effect of inhibition of synthesis of inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide by aminoguanidine on the in vitro maturation of oocyte-cumulus complexes of cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 111, n. 2-4, p. 189-201, 2009.

Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378432008000869>. Accessed: Feb. 08, 2021. doi: doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.03.002.

MIAO, Y. et al. Dynein promotes porcine oocyte meiotic progression by maintaining cytoskeletal structures and cortical granule arrangement. **Cell Cycle**, v. 16, n. 21, p. 2139-2145, 2017. Available from: <https://doi.org/10.1080/15384101.2017.1380133>. Accessed: Feb. 14, 2021. doi: 10.1080/15384101.2017.1380133.

NAVARRO, C. et al. Egalitarian binds dynein light chain to establish oocyte polarity and maintain oocyte fate. **Nature Cell Biology**, v. 6, n. 5, p. 427-435, 2004. Available from: <https://www.nature.com/articles/ncb1122>. Accessed: Feb. 14, 2021. doi: 10.1038/ncb1122.

OUATAS, T. et al. Differential expression of nucleoside diphosphate kinases (NDPK/NM23) during *Xenopus* early development. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 42, n. 1, p. 43-52, 1998. Available from: <http://www.ijdb.ehu.es/web/paper.php?doi=9496785>. Accessed: Feb. 13, 2021. doi: 9496785.

PASQUARIELLO, R. et al. Implications of miRNA expression. Pattern in bovine oocytes and follicular fluids for developmental competence. **Theriogenology**, v. 145, p. 77-85, 2020. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X20300339?via%3Dihub>. Accessed: Feb. 15, 2021. doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.01.027.

PAVANI, K.C. et al. Gene expression, oocyte nuclear maturation and developmental competence of bovine oocytes and embryos produced after in vivo and in vitro heat shock. **Zygote**, v. 24, n. 5, p. 748-759, 2016. Available from:

<<https://doi.org/10.107/S0967199416000071>>. Accessed: Feb. 08, 2021. doi: 10.107/S0967199416000071.

PÖHLAND, R. et al. Influence of long-term thermal stress on the in vitro maturation on embryo development and heat shock protein abundance in zebu cattle. **Animal Reproduction**, v. 17, n. 3, p. 1-10, 2020. Available from: <https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-31432020000300203&tlng=en>. Accessed: Feb. 14, 2021. doi: 10.1590/1984-3143-AR2019-0085.

PROTTER, D.S.W.; PARKER, R. Principles and properties of stress granules. **Trends in Cell Biology**, v. 26, n. 9, p. 668-679, 2016. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4993645/pdf/nihms794274.pdf>>. Accessed: Feb. 20, 2021. doi: 10.1016/j.tcb.2016.05.004.

REIS, R.S. et al. Pretreatment free of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid improves the differentiation of sugarcane somatic embryos by affecting the hormonal balance and the accumulation of reserves. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 145, p. 101-115, 2021. Available from: < <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11240-020-01995-z>>. Accessed: Jan. 30, 2022. doi: <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01995-z>.

RHEE, S.G. et al. Peroxiredoxin functions as a peroxidase and a regulator and sensor of local peroxides. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 7, p. 4403-4410. Available from: <[https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(20\)48096-2/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)48096-2/fulltext)>. Accessed: Feb. 13, 2021. doi: 10.1074/jbc.R111.283432.

RINGUETTE, M.J. et al. Molecular analysis of cDNA coding for ZP3, a sperm binding protein of the mouse zona pellucida. **Developmental Biology**, v. 127, n. 2, p. 287-295, 1988. Available from:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0012160688903156?via%3DIihub>>.

Accessed: Feb. 13, 2021. doi: 10.1016/0012-1606(88)90315-6.

RIZOS, D. et al. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality.

Molecular Reproduction and Development, v. 61, n. 2, p. 234-248, 2002. Available from:

<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mrd.1153>>. Accessed: Feb. 08, 2021. doi:

10.1002/mrd.1153.

ROTH, Z. et al. Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heat-stressed cows. **Reproduction**, v. 122, n. 5,

p. 737-744, 2001. Available from:

<<https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/122/5/737.xml>>. Accessed: Feb. 08, 2021.

doi: 10.1530/rep.0.1220737.

ROTH, Z.; HANSEN, P.J. Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. **Biology of Reproduction**, v.

71, n. 6, p. 1898-1906, 2004. Available from:

<<https://academic.oup.com/biolreprod/article/71/6/1898/3028821>>. Accessed: Feb. 08, 2021.

doi: 10.1095/biolreprod.104.031690.

ROTH, Z.; HANSEN, P.J. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation.

Reproduction, v. 129, n. 2, p. 235-244, 2005. Available from:

<<https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/129/2/1290235.xml>>. Accessed: Feb. 08,

2021. doi: 10.1530/rep.1.00394.

SCHIEBER, M.; CHANDEL, N.S. ROS function in redox signaling and oxidative stress.

Current Biology, v. 24, n. 10, p. 453-462, 2014. Available from:

<<https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>>. Accessed: Feb. 14, 2021. doi: 10.1016/j.cub.2014.03.034.

SEN, U.; KURAN, M. Low incubation temperature successfully supports the in vitro bovine oocyte maturation and subsequent development of embryos. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 31, n. 6, p. 827-834, 2018. Available from: <<https://www.animbiosci.org/journal/view.php?doi=10.5713/ajas.17.0569>>. Accessed: Feb. 08, 2021. doi: 10.5713/ajas.17.0569.

SHI, D.S. et al. Effects of temperature gradients on in vitro maturation of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 50, p. 667-674, 1998. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X9800171X?via%3Dihub>>. Accessed: Feb. 08, 2021. doi: 10.1016/s0093-691x(98)00171-x.

SIGNORELLI, J. et al. Kinases, phosphatases and proteases during sperm capacitation. **Cell and Tissue Research**, v. 349, n. 3, p. 765-782, 2012. Available from: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00441-012-1370-3>>. Accessed: Feb. 13, 2021. doi: 10.1007/s00441-012-1370-3.

SIRARD, M.A. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1241-1254, 2001. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X01004800?via%3Dihub>>. Accessed: Feb. 08, 2021. doi: 10.1016/s0093-691x(01)00480-0.

SIRARD, M.A. et al. Contribution of oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 123-136, 2006. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X05004103?via%3Dihub>>. Accessed: Feb. 08, 2021. doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.09.020.

SZKLARCZYK, D. et al. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accesible. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D362-D368, 2017. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article/45/D1/D362/2290901>>. Accessed: Feb. 10, 2021. doi: 10.1093/nar/gkw937.

TAO, Y. et al. Exposure to L-ascorbic acid of alpha-tocopherol facilitates de development of porcine denuded oocytes from metaphase I to metaphase II and prevents cumulus cells from fragmentation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 39, n. 1, p. 52-57, 2004. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1439-0531.2003.00478.x>>. Accessed: Feb. 08, 2021. doi: 10.1046/j.1439-0531.2003.00478.x.

TESFAYE, D. et al. Identification and expression profiling of microRNAs during bovine oocyte maturation using heterologous approach. **Molecular Reproduction and Development**, v. 76, n. 7, p. 665-677, 2009. Available from: <https://doi.org/10.1002/mrd.21005>>. Accessed: Feb. 15, 2021. doi: 10.1002/mrd.21005.

TUKUR, H.A. et al. The making of a competent oocyte – a review of oocyte development and its regulation. **Journal of Animal Reproduction and Biotechnology**, v. 35, n. 1, p. 2-11, 2020. Available from: <https://www.e-jarb.org/journal/view.html?doi=10.12750/JARB.35.1.2>. Accessed: Jan. 30, 2022.

TURATHUM, B. et al. Comparative proteomic analysis of mature and immature oocytes in domestic cats. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v. 9, n. 1, p. 22-30, 2020. Available from: <https://www.apjr.net/article.asp?issn=2305-0500;year=2020;volume=9;issue=1;spage=22;epage=30;aulast=Turathum>>. Accessed: Feb. 08, 2021. doi: 10.4103/2305-0500.275525.

VIANA, K.S. et al. Effect of sodium nitroprusside, a nitric oxide donor, on the in vitro maturation of bovine oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 102, n. 3-4, p. 217-227, 2007. Available from:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378432006005203?via%3Dihub>>.

Accessed: Feb. 08, 2021. doi: 10.1016/j.anireprosci.2006.11.004.

WANG, H. et al. Mass spectrometry-based, label-free quantitative proteomics of round spermatids in mice. **Molecular Medicine Reports**, v. 10, n. 4, p. 2009-2024, 2014. Available from: <<https://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2014.2460>>. Accessed: Feb. 08, 2021. doi: 10.3892/mmr.2014.2460.

WATANABE, K. et al. Functional mapping and annotation of genetic associations with FUMA. **Nature Communications**, v. 8, n. 1826, 2017. Available from: <<https://www.nature.com/articles/s41467-017-01261-5>>. Accessed: Feb. 10, 2021. doi: 10.1038/s41467-017-01261-5.

YADAV, A. et al. Effect of physiologically relevant heat shock on development, apoptosis and expression of some genes in buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos produced in vitro. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, n. 5, p. 858-865, 2013. Available from: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/rda.12175>>. Accessed: Feb. 14, 2021. doi: 10.1111/rda.12175.

ZENCLUSSEN, M.L. et al. Heme oxygenase-1 expression in the ovary dictates a proper oocyte ovulation, fertilization and corpora lutea maintenance. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 67, n. 5, p. 376-382, 2012. Available from: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1600-0897.2011.01096.x>>. Accessed: Feb. 14, 2021. doi: 10.1111/j.1600-0897.2011.01096.x.

ZERON, Y. et al. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. **Reproduction**, v. 121, n. 3, p. 447-454, 2001. Available from: <<https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/121/3/447.xml>>. Accessed: Feb. 14, 2021. doi: 10.1530/rep.0.1210447.

ZWAIN, I.; AMATO, P. Clusterin protects granulosa cells from apoptotic cell death during follicular atresia. **Experimental Cell Research**, v. 257, n. 1, p. 101-110, 2000. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0014482700948857?via%3Dihub>>. Accessed: Feb. 13, 2021. doi: 10.1006/excr.2000.4885.

Tabela 2. Efeito da diminuição da temperatura durante a MIV na maturação nuclear e na expansão das células do *cumulus*.

Temperatura (°C)	M II (%)	Expansão do <i>cumulus</i> (%)				
		G0	G1	G2	G3	G4
38,5 (controle)	78,7±3,7 ^a	0,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^a	26,0±3,3 ^a	74,0±3,3 ^a
37,5 (tratado)	78,5±1,8 ^a	0,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^a	27,5±8,8 ^a	72,5±8,8 ^a

Médias na mesma coluna seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste “t” de Student a nível de 5% de probabilidade (dez replicatas, n=4410). M II: oócitos que apresentaram extrusão do primeiro corpúsculo polar; G0: grau 0, nenhuma resposta observada; G1: grau 1, resposta mínima; G2: grau 2, expansão das camadas externas; G3: grau 3, expansão de todas as camadas, exceto corona *radiata*; G4: grau 4, expansão de todas as camadas.

Tabela 3. Proteínas diferencialmente acumuladas ou únicas associadas à alteração de temperatura na maturação *in vitro* de oócitos bovinos.

ID UniProtKB	Gene	Description	Biological process	Log ₂ FC	Regulação diferencial (37,5 °C / 38,5 °C)
A0A4W2F122	HSPA6	Heat shock protein family A (Hsp70) member 6	Resposta celular ao calor, redobramento de proteínas	0.60	UP
A0A4W2DK74	-	Zona pellucida sperm-binding protein 3	Ligação do espermatozoide à ZP, formação de blastocisto, regulação negativa da transcrição, modelação do DNA, desenvolvimento do oócito, sinalização mediada por fosfatidilinositol, regulação positiva da reação acrossomica, regulação positiva do crescimento do folículo antral, regulação positiva da produção de interferon-gama, regulação positiva da interleucina-4, regulação positiva da migração de leucócitos, regulação positiva do processo biosintético de fosfatidilinositol	0,74	UP
A0A4W2BLY1	PRDX4	Peroxiredoxin 4	-	0.86	UP
A0A4W2E9H1	?	Tubulin beta chain	?	0.91	UP
A0A4W2EG40	IDH3ASL	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit, mitochondrial	Ciclo do ácido tricarbóxico	1.10	UP
A0A4W2EKU9	-	Tubulin alpha chain	Processo de microtúbulos	1,36	UP
A0A4W2BX19	SLC25A31	Solute carrier family 25 member 31	Transporte transmembrana de ADP mitocondrial, transporte transmembrana de ATP mitocondrial	2.36	UP
A0A4W2DE74	RAB8A	Uncharacterized protein	-	-	Unique 37.5 °C
A0A4W2DYK7	-	Rab GDP dissociation inhibitor	Transporte de proteínas, pequena transdução de sinal mediada por GTPase	-	Unique 37.5 °C
A0A4W2ETA0	-	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Dobramento de proteína	-	Unique 37.5 °C
A0A4W2EPQ2	RAB2B	Uncharacterized protein	-	-	Unique 37.5 °C
A0A4W2D705	-	Clusterin	-	-	Unique 37.5 °C
A0A4W2DIF2	GFPT1	Glutamine--fructose-6-phosphate transaminase (isomerizing)	Processo metabólico de derivados de carboidratos, processo metabólico de glutamina	-	Unique 37.5 °C
A0A4W2EXY1	-	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Dobramento de proteína	-	Unique 37.5 °C

A0A4W2DBL6	TPM1	Uncharacterized protein	-	-	Unique 37.5 oC
A0A4W2C6J7	IDH2	Isocitrate dehydrogenase [NADP	Ciclo do glioxilato, processo metabólico de isocitrato, ciclo de ácido tricarboxílico	-0.64	DOWN
A0A4W2C1C8	NME1	Nucleoside diphosphate kinase	Processo biossintético de CTP, de GTP e de UTP, lactação, regulação positiva da ligação ao DNA, regulação positiva da proliferação de células epiteliais	-0.75	DOWN
A0A4W2BJR7	CARHSP1	CSD domain-containing protein	Regulação da estabilidade do RNAm	-0.81	DOWN
A0A4W2HF60	HMOX2	Heme oxygenase (biliverdin-producing)	Oxidação do grupo heme	-0.85	DOWN
A0A4W2D3J6	KRT75	Keratin 75	-	-0.95	DOWN
A0A4W2E0S0	-	Dynein light chain	-	-0.99	DOWN
A0A4W2HHF4	MARS1	Methionine--tRNA ligase, cytoplasmic	Aminoacilação de metionil-tRNA	-1.01	DOWN
A0A4W2E576	-	Histone H2B	-	-1.05	DOWN
A0A4W2D795	LOC113893778	IF rod domain-containing protein	-	-1.07	DOWN
A0A4W2EKX7	-	Aldo_ket_red domain-containing protein	-	-1.22	DOWN
A0A4W2CS91	-	Uncharacterized protein	-	-1.37	DOWN
A0A4W2F2G1	-	Thioredoxin domain-containing protein	-	-3.51	DOWN
A0A4W2C6E9	-	Histone H4	Transcrição DNA modelado	-	Unique 38.5 °C
A0A4W2BV44	LOC113886404	GST class-pi	-	-	Unique 38.5 °C
A0A4W2G7I1	PPA1	Inorganic diphosphatase	Processo metabólico de composto contendo fosfato	-	Unique 38.5 °C
A0A4W2CEF3	GAPDHS	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Processo metabólico da glicose, processo glicolítico	-	Unique 38.5 °C
A0A4W2BQL0	LDHC	L-lactate dehydrogenase	Processo metabólico de carboidratos, processo metabólico de ácido carboxílico	-	Unique 38.5 °C
A0A4W2FPY3	LOC113903410	Aldo_ket_red domain-containing protein	-	-	Unique 38.5 °C
A0A4W2EP82	KRT75	Keratin 75	-	-	Unique 38.5 °C
A0A4W2E5C2	NEFH	IF rod domain-containing protein	Resposta celular ao fator inibidor da leucemia, organização do citoesqueleto dos microtúbulos, montagem do feixe de neurofilamento, organização do citoesqueleto do neurofilamento, montagem do nucleossomo	-	Unique 38.5 °C

A0A4W2EVJ9	BMP1	Metalloendopeptidase	-	-	Unique 38.5 °C
A0A4W2HLZ0	NME2	NDK domain-containing protein	Processo biossintético de CTP, de GTP e de UTP		Unique 38.5 °C
A0A4W2DN76	-	Tubulin alpha chain	Processo de microtúbulos	-	Unique 38.5 °C
A0A4W2D3G3	LOC113893778	IF rod domain-containing protein	-	-	Unique 38.5 °C

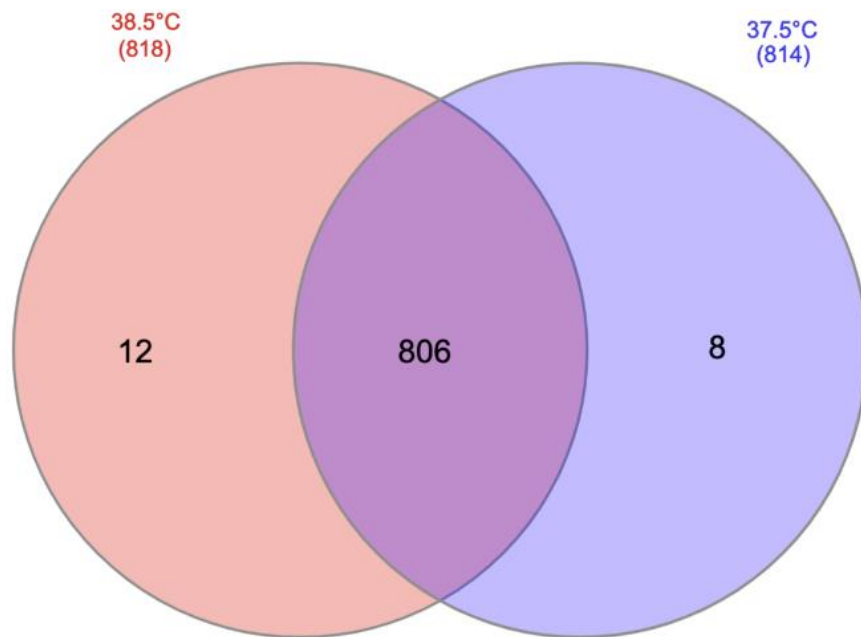
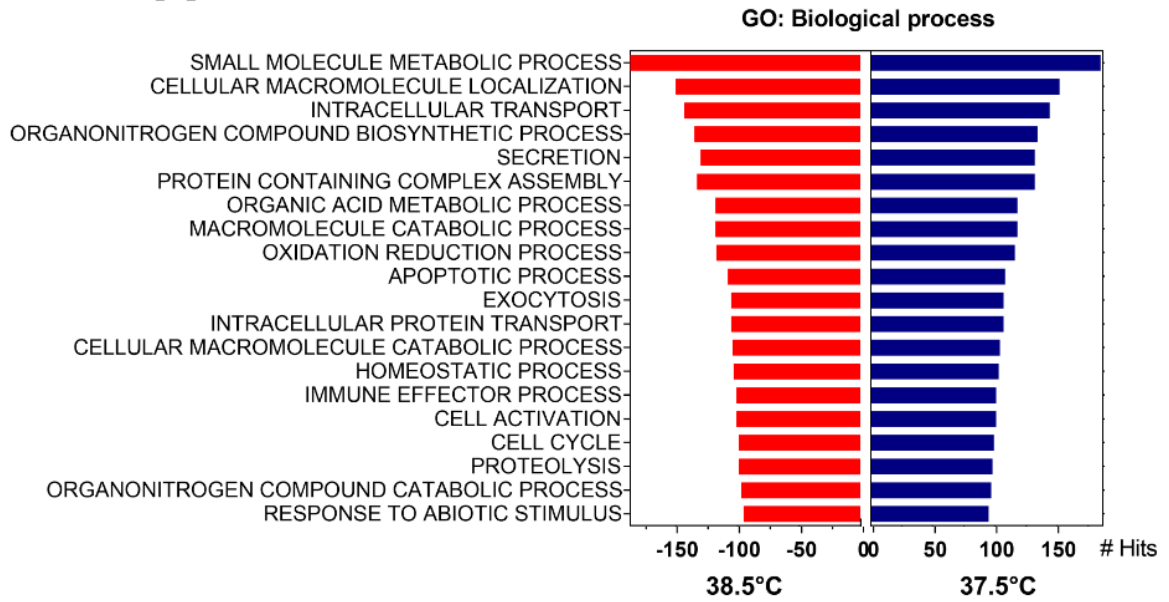
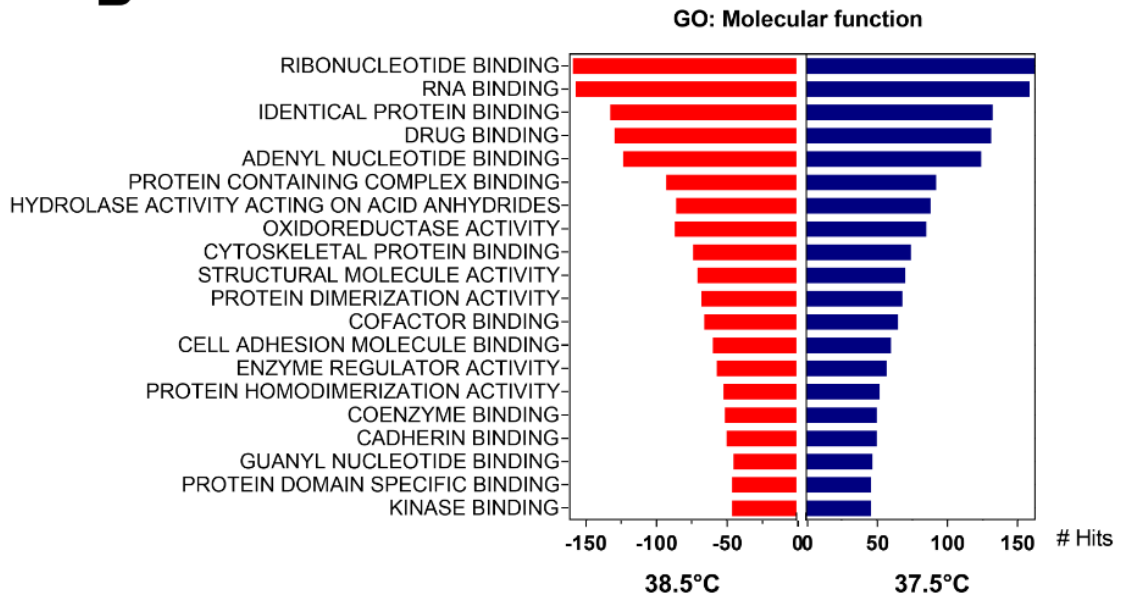


Figura 1. Diagrama de Venn demonstrando a distribuição das proteínas identificadas no oócito bovino maturado *in vitro* a 38,5 °C (controle) e 37,5 °C (tratado).

A



B



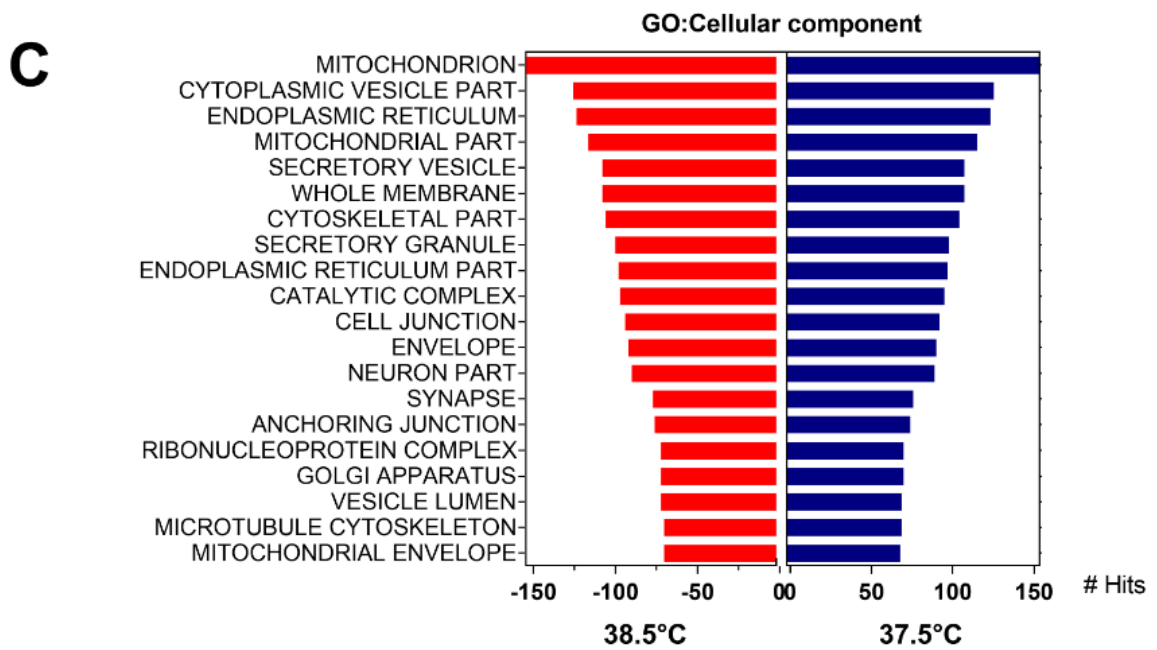


Figura 2. Distribuição das proteínas identificadas em oócitos bovinos maturados *in vitro* a 38,5 °C (controle) e 37,5 °C de acordo com (A) processo biológico, (B) função molecular e (C) componente celular.

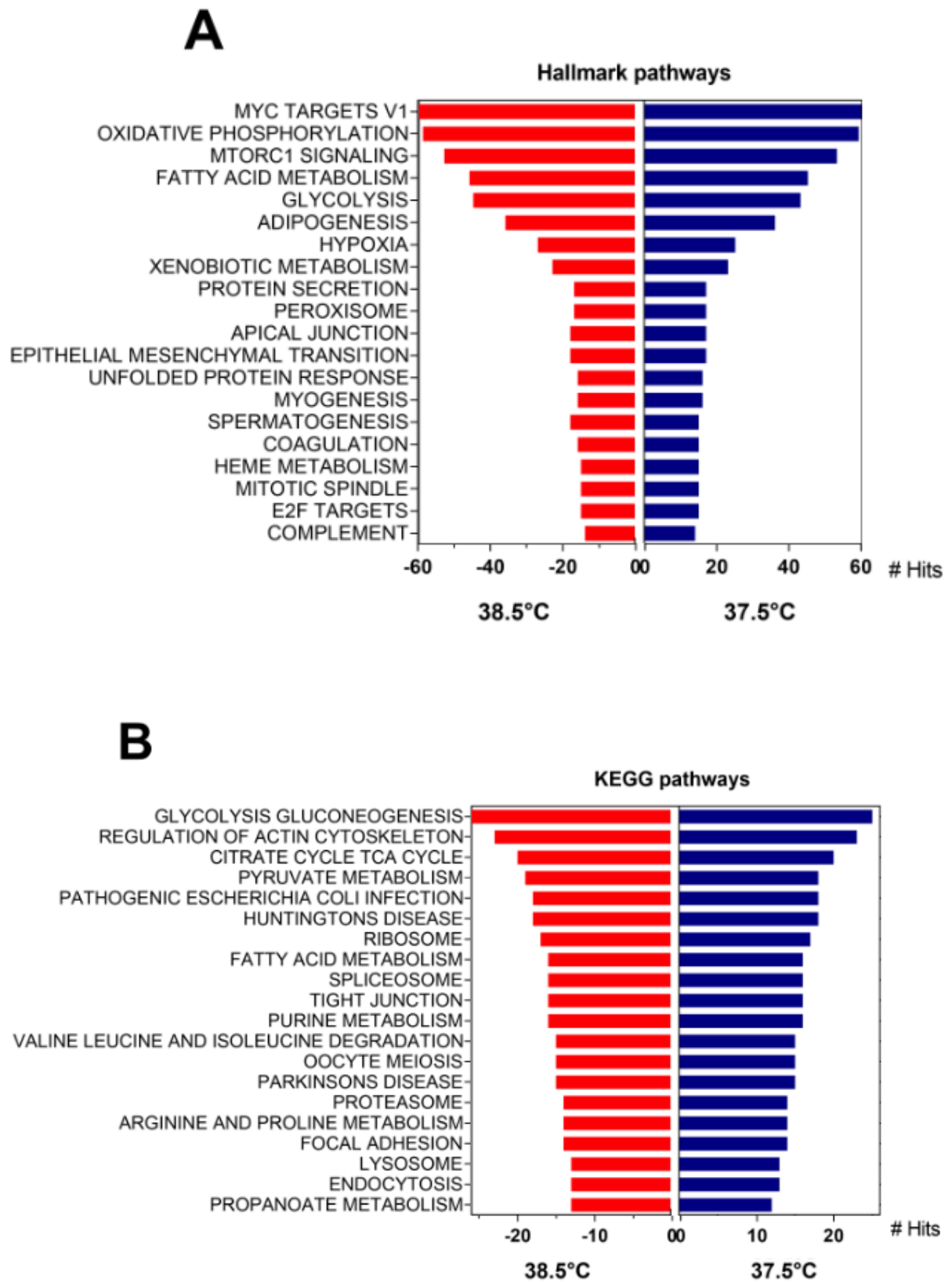


Figura 3. Análise dos genes expressos em oócitos maturados *in vitro* a 38,5°C (controle) e 37,5°C. (A) Vias *hallmark* indicando as vias de sinalização mais prevalentes dentro do

conjunto de genes do MSigDB. (B) Vias KEGG indicando as vias de sinalização mais prevalentes.

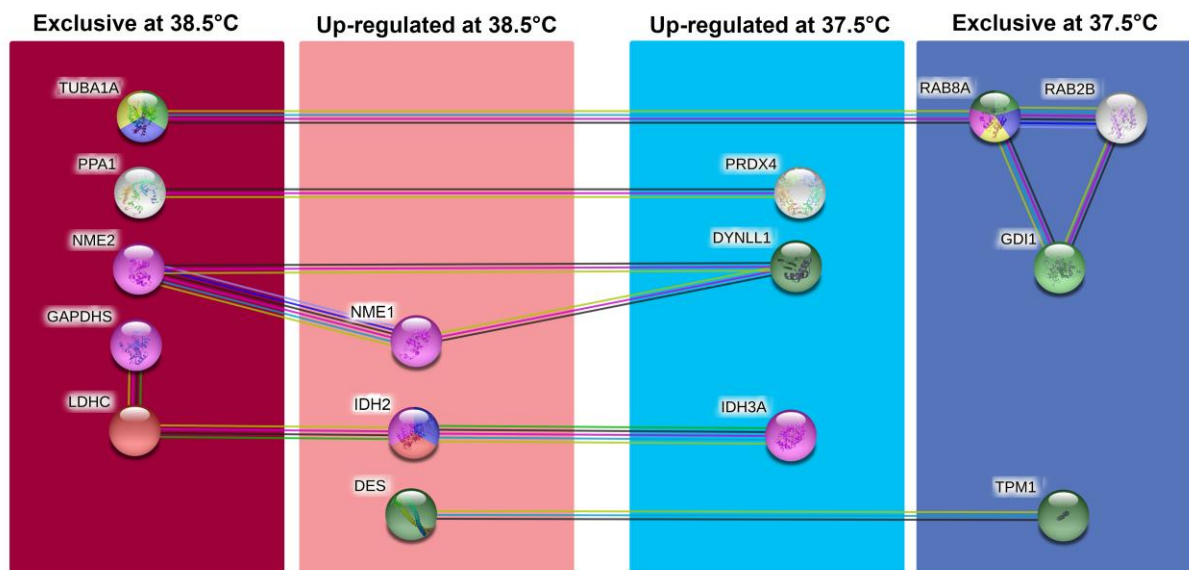


Figura 4. Análise *in silico* da rede de interação proteína-proteína gerado utilizando String V.11 a partir das proteínas identificadas em oócitos bovinos maturados *in vitro* a 38.5°C (controle) e 37.5°C. As cores de fundo indicam as proteínas *up*-reguladas ou únicas de cada grupo. As cores das esferas representam diferentes termos e classificações de ontologia gênica. Função molecular: proteína de ligação do citoesqueleto (GO:0008092) (verde escuro) e ligação de nucleotídeo (GO: 0000166) (roxo); Vias metabólicas: metabolismo do piruvato e ciclo do ácido tricarboxílico (BTA: 71406) (vermelho), regulação da atividade de PLK1 na transição para a fase G2 da meiose (BTA: 2565942) (amarelo), biogênese e manutenção de organelas (BTA: 1852241) (azul), tráfego de membrana (BTA: 199991) (verde claro). RAB2B: proteína não caracterizada; RAB8A: proteína não caracterizada; GDI1: inibidor da dissociação de Rab GDP; TPM1: proteína não caracterizada; PRDX4: peroxirredoxina 4; DYNLL1: dineína de cadeia leve; IDH3A: isocitrato desidrogenase dependente de NAD, subunidade mitocondrial; NME1: nucleosídeo-difosfato-kinase; IDH2: isocitrato desidrogenase dependente de NADP; DES: proteína de domínio de ligação IF rod; TUBA1A: cadeia de tubulina alfa; PPA1: pirofosfatase inorgânica; NME2: nucleosídeo-difosfato-kinase; GAPDHS: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; LDHC: L-lactato desidrogenase.

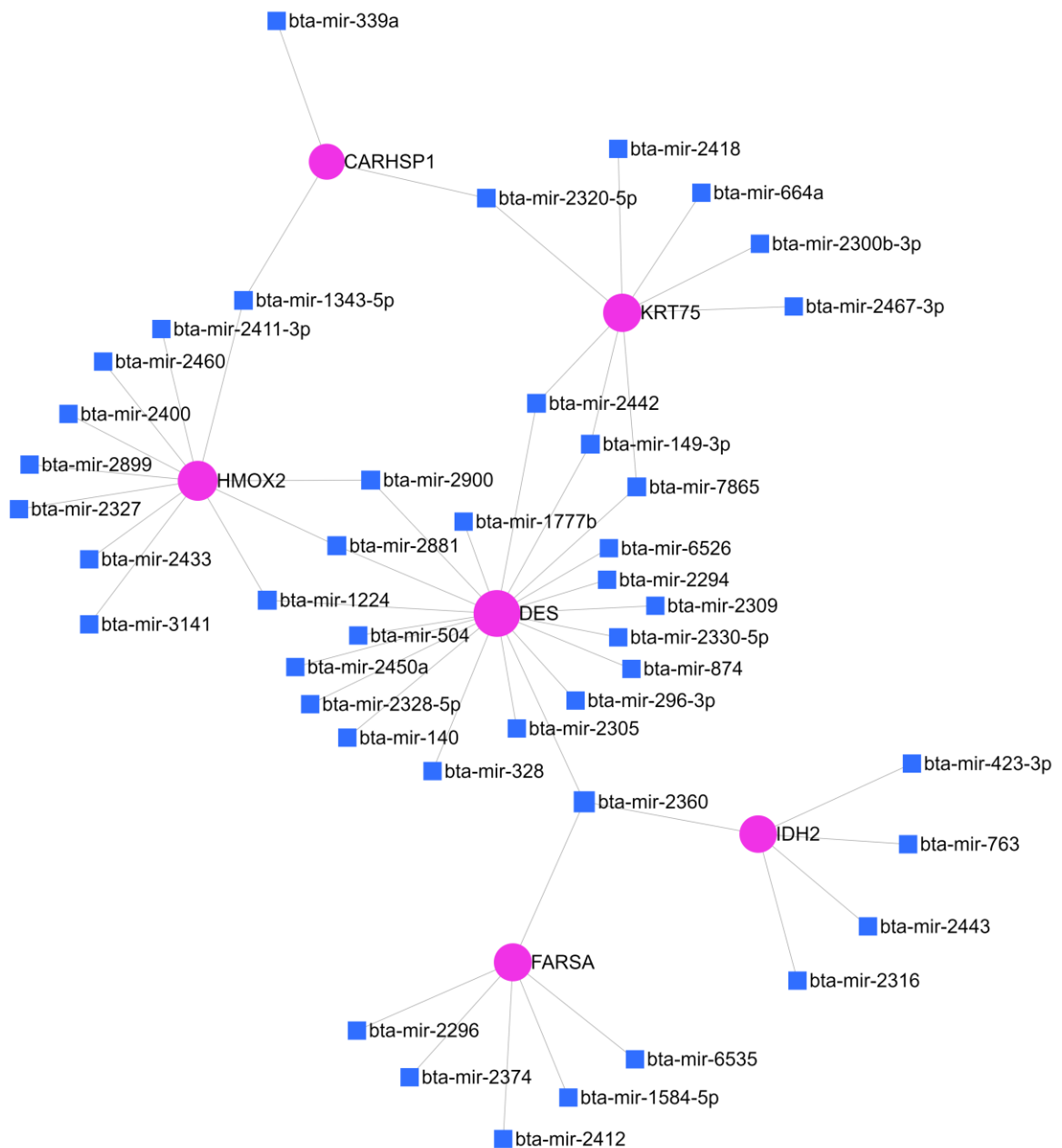


Figura 5. Análise da rede e análise de enriquecimento de conjunto de genes de miRNA bovino (quadrados) associados a genes (círculos) diferencialmente expressos em oócitos bovinos maturados *in vitro* a 38,5 °C (controle) e 37,5 °C (tratado). Esquema e análise obtidos por miRNet 2.0.