

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

Vanessa das Graças Pereira de Souza

**EFEITO DO CHOQUE TÉRMICO DURANTE A MATURAÇÃO *IN*
VITRO NA EXPRESSÃO DE microRNAs EM OÓCITOS E
EMBRIÕES BOVINOS**

Juiz de Fora

2019

VANESSA DAS GRAÇAS PEREIRA DE SOUZA

EFEITO DO CHOQUE TÉRMICO DURANTE A MATURAÇÃO *IN VITRO* NA EXPRESSÃO DE microRNAs EM OÓCITOS E EMBRIÕES BOVINOS

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: Genética e Biotecnologia.

Orientador: Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo

Coorientadora: Dr^a. Michele Munk Pereira

Juiz de Fora

2019

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Souza, Vanessa das Graças Pereira de.

Efeito do choque térmico durante a maturação in vitro na expressão de microRNAs em oócitos e embriões bovinos / Vanessa das Graças Pereira de Souza. – 2019.

121 p.

Orientador: Luiz Sérgio de Almeida Camargo

Coorientadora: Michele Munk Pereira

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2019.

1. Dicer1. 2. Drosha. 3. Epigenética. 4. Estresse térmico. I. Camargo, Luiz Sérgio de Almeida , orient. II. Pereira, Michele Munk, coorient. III. Título.

VANESSA DAS GRAÇAS PEREIRA DE SOUZA

**EFEITO DO CHOQUE TÉRMICO DURANTE A MATURAÇÃO *IN VITRO* NA EXPRESSÃO DE
microRNAs EM OÓCITOS E EMBRIÕES BOVINOS**

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Genética e Biotecnologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 16 / 08 / 2019.

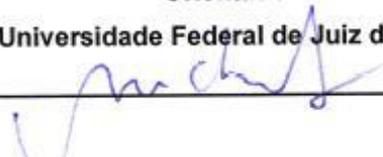
BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo

Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

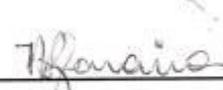

Prof.ª Dr.ª Michele Munk Pereira

Coorientadora

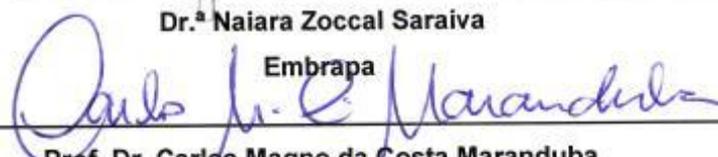
Universidade Federal de Juiz de Fora


Dr.ª Eliza Diniz de Souza

Sem Vínculo


Dr.ª Naiara Zoccal Saraiva

Embrapa


Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba

Universidade Federal de Juiz de Fora

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, pela oportunidade de realizar o mestrado.

À Embrapa Gado de Leite, por possibilitar a realização dos experimentos e pelo suporte financeiro.

Ao matadouro Fripai Alimentos, por ceder os ovários.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Sérgio, pela oportunidade e orientação; por ter confiado a mim este trabalho; por ser um grande exemplo de pesquisador.

À Prof^a Dr^a Michele Munk, que esteve presente na minha caminhada acadêmica desde o PIBID. Por todo o apoio, pelas conversas, orientações; ensinamentos; experiências compartilhadas e contribuição ao longo da vida pessoal e profissional.

Ao Giovane, por estar ao meu lado durante todos esses anos, nos momentos bons e ruins, na calma e na tormenta, sempre me oferecendo carinho, apoio e todo o suporte necessário. Me ajudando ser uma pessoa melhor a cada dia.

Ao Pedro Henrique, por ser um irmão incrível, por estudar junto comigo, ouvir minhas apresentações e explicações, me apoiar e me motivar sempre.

Às amigas queridas Tayná e Luísa, por todos os ensinamentos, parceria, amizade e companheirismo no laboratório e na vida pessoal.

Aos amigos Diana, Gustavo e Judith pela convivência; por todo o carinho e conhecimento compartilhado.

Aos queridos Myro e Joel, pela disponibilidade, apoio, prontidão e amizade.

À Carolina e aos estagiários e estagiárias, por todo o auxílio na condução das atividades.

À Dr^a Naiara, pelas palavras, ensinamentos, disponibilidade, auxílio, prontidão e amizade.

Aos meus amigos e amigas que confiaram e acreditaram em mim.

À CAPES pela bolsa concedida.

À FAPEMIG e CNPq pelo suporte financeiro para o desenvolvimento da pesquisa.

A todos, o meu muito obrigada!

“Ensinar não é transferir conhecimento, mas criar as possibilidades para a sua produção ou a sua construção.”

Paulo Freire

RESUMO

O estresse térmico é um dos principais responsáveis por perdas econômicas na produção pecuária bovina no Brasil. Na reprodução, o estresse térmico afeta a qualidade do oócito e desenvolvimento embrionário e resulta em menor eficiência reprodutiva. Os mecanismos pelos quais o aumento da temperatura compromete o desenvolvimento de oócitos e embriões ainda não estão bem estabelecidos, mas alterações à nível transcricional e traducional podem ocorrer sugerindo modificações epigenéticas causadas pela elevação da temperatura. MicroRNAs (miRNAs) são uma importante classe de RNAs não codificantes, classificados como moduladores epigenéticos essenciais e sua relação com estresse térmico ainda não está estabelecida. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do choque térmico durante a maturação *in vitro* (MIV) na expressão de microRNAs e genes envolvidos no processamento de miRNAs em oócitos bovinos e em embriões derivados de desses oócitos. Oócitos imaturos foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais para MIV: Controle (oócitos maturados *in vitro* à 38,8°C por 24h em 5% de CO₂) e Choque térmico (oócitos maturados *in vitro* à 41°C por 12h em 5% de CO₂ + 38,8°C por 12h em 7% CO₂), ambos em 100% umidade. Após a MIV os oócitos foram fecundados *in vitro* (FIV) e em seguida cultivados por oito dias em meio CR2aa em incubadora a 5% CO₂ e 38,8°C. Para análise de miRNA e mRNA, foram coletados oócitos ao final da MIV e embriões em estágio de 8-16 células com 72h após início da FIV. A quantificação relativa dos miRNAs let-7a-5p, -103, -34c, -1246, -19b, -21-5p e mRNA Drosha e Dicer1 foram realizadas por PCR em tempo real. Progressão da meiose, desenvolvimento embrionário e índices apoptóticos também foram avaliados. O choque térmico reduziu a expressão de miR-21-5p (0,51±0,34) e aumentou de Drosha (1,43±0,35) nos oócitos (p<0,05). Houve aumento na expressão de miRNAs let-7a-5p (3,0±2,0), -19b (3,96±2,29) e -1246 (2,29±1,21) nos embriões em estágio de 8 células do grupo choque térmico (p<0,05). As taxas de maturação oocitária, clivagem e desenvolvimento embrionário diminuíram (p<0,05) e o índice apoptótico embrionário aumentou (p<0,05) no grupo choque térmico. Conclui-se que o choque térmico durante a MIV promove alterações na expressão de miRNAs e genes envolvidos na sua biossíntese em oócitos bovinos. Os efeitos do choque térmico podem ainda ser observados na abundância de microRNAs nos embriões derivados dos oócitos estressados. Tais alterações podem estar relacionadas ao menor desenvolvimento embrionário, como resultado de modificações epigenéticas promovidas pelo choque térmico.

Palavras-chave: Dicer1. Drosha. Epigenética. Estresse Térmico.

ABSTRACT

Thermal stress is one of the main causes for loss of economic productivity in cattle, in Brazil. Regarding reproductive capacity, heat stress affects oocyte quality and embryonic development and results in lower reproductive efficiency. The mechanisms by which the increase in temperature compromises the development of oocytes and embryos are not yet well established; however, the occurrence of transcriptional and translational suggests epigenetic changes to be caused by the elevation of the temperature. MicroRNAs (miRNAs) are an important class of non-coding RNAs classified as essential epigenetic modulators and their relation with thermal stress is not yet established. This study aimed to evaluate the effect of heat shock during *in vitro* maturation (IVM) on the expression of microRNAs and of genes involved in the processing of miRNAs in bovine oocytes and in embryos derived from these oocytes. Briefly, immature oocytes were randomly distributed in two experimental groups during IVM: 1) Control group (oocytes matured *in vitro* at 38.8°C for 24h with 5% CO₂), and 2) Thermal shock group (oocytes matured *in vitro* at 41°C for 12h with 5% CO₂ + 38.8°C for 12h in 7% CO₂), both remained in an atmosphere with 100% humidity. Following IVM, the oocytes were *in vitro* fertilized (IVF) and then cultured for eight days in CR2aa medium in an incubator with 5% CO₂ and at 38.8°C. For miRNA and mRNA analysis, oocytes were collected at the end of the IVM and embryos at the 8-16 cell stage with 72h after the initiation of IVF. Real-time PCR was used for the relative quantification of the following miRNAs: let-7a-5p, -103, -34c, -1246, -19b, and -21-5p, as well as of the mRNAs: Drosha, and Dicer1. We have also evaluated: meiosis progression, embryonic development, and apoptotic index. Thermal shock reduced miR-21-5p (0,51±0,34) expression and increased Drosha (1,43±0,35) in oocytes (p<0.05). There was an increase in the expression of (3,0±2,0), -19b (3,96±2,29) and -1246 (2,29±1,21) in 8-cell stage embryos in the heat shock group (p<0.05). The rates of oocyte maturation, embryonic cleavage and development decreased (p<0.05) and the embryonic apoptotic index increased (p<0.05) in the thermal shock group. We concluded that the thermal shock during IVM promotes changes in the expression of miRNAs and genes involved in their biosynthesis in bovine oocytes. The effects of thermal shock may still be observed due to the alteration of the abundance of microRNAs in embryos derived from stressed oocytes. These alterations may be related to the lower embryonic development, as a result of epigenetic modifications promoted by heat shock.

Keywords: Dicer1. Drosha. Epigenetics. Thermal Stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Organização estrutural da cromatina.	15
Figura 2: Metilação do DNA	18
Figura 3: Biogênese miRNAs.	27
Figura 4: Complementariedade dos miRNAs.	28
Figura 5: Delineamento experimental.....	35
Figura 6: Curvas de dissociação dos microRNAs (A):bta-miR-let-7a-5p, (B) bta-miR-20a e (C) bta-miR-19b resultantes da PCR em Tempo Real.....	47
Figura 7: Curvas de dissociação dos microRNAs (A): bta-miR-1246 e (B) bta-miR-27b resultantes da PCR em Tempo Real	48
Figura 8: Curvas de dissociação dos microRNAs (A): bta-miR-21-5p, (B) bta-miR-148a e (C) bta-miR-34c resultantes da PCR em Tempo Real.....	49
Figura 9: Curvas de dissociação dos microRNAs (A): bta-miR-106a e (B) bta-miR-103 resultantes da PCR em Tempo Real	50
Figura 10: Curvas de dissociação dos genes (A): YWHAZ, (B) β -actina, (C) Drosha e (D) Dicer1 resultantes da PCR em Tempo Real	51
Figura 11: Gel de agarose mostrando a presença dos transcritos dos microRNAs	52
Figura 12: Gel de agarose mostrando a presença dos transcritos dos genes: A) Dicer1; B) Drosha; C) YWHAZ; D) β -actina.....	53
Figura 13: Imagem representativa dos oócitos bovinos corados com Hoechst 33342	56
Figura 14: Avaliação da taxa de maturação nuclear em oócitos bovinos expostos a diferentes temperaturas durante a MIV	57
Figura 15: Imagens representativas dos embriões no estágio de blastocisto obtidos a partir da fertilização de oócitos submetidos ou não ao choque térmico durante a maturação <i>in vitro</i>	58
Figura 16: Gráficos de expressão gerados por geNorm para A) oócitos e B) Embriões	61
Figura 17: Gráficos de variação pareada para os microRNAs em: A) oócitos e B) Embriões bovinos.	62

Figura 18: Abundância relativa dos transcritos dos miR-let-7a-5p, -103, -34c, -1246, -19b, -21-5p, Drosha e Dicer1 em oócitos bovinos submetidos ao choque térmico durante a MIV 63

Figura 19: Abundância relativa dos transcritos dos miR-let-7a-5p, -103, -34c, -1246, -19b, -21-5p, Drosha e Dicer1 em embriões bovinos 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Alterações celulares e moleculares induzidas por elevação da temperatura em oócitos.....	6
Tabela 2: Leitura e interpretação de modificações pós-traducionais de histonas	14
Tabela 3: Modulação epigenética mediada por miRNAs.	23
Tabela 4: Quantificação de RNA total obtido a partir do <i>pool</i> de 80 oócitos e <i>pool</i> de 15 embriões em cada repetição, por tratamento.	41
Tabela 5: Genes, função e referências bibliográficas.	42
Tabela 6: Sequências de primers usadas para análise de expressão gênica relativa por reação em cadeia da polimerase em tempo real de oócitos expostos ou não a choque térmico.....	44
Tabela 7: Componentes da reação de PCR em tempo real.	45
Tabela 8: Eficiência média da reação para cada gene utilizado para o estudo de expressão gênica em oócitos e embriões bovinos nas condições padronizadas da PCR em Tempo Real.....	46
Tabela 9: Taxas de clivagem e de produção de embriões bovinos nos dias 7 (D7%) e 8 (D8%) para os tratamentos controle e choque térmico durante a maturação <i>in vitro</i>	57
Tabela 10: Número de células totais, número de células apoptóticas e índice apoptótico em embriões submetidos a diferentes temperaturas durante a MIV.	59
Tabela 11: Estabilidade média de expressão dos microRNAs.	60

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	“Adenosine Diphosphate” - Difosfato de Adenosina
APOA2	“Apolipoprotein A-II” - Apolipoproteína A-II
ATP	“Adenosine Triphosphate” - Trifosfato de Adenosina
CCOs	Complexo <i>Cumulus</i> -Oócito
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CDX2	“Homeobox protein CDX-2” - Proteína homeobox CDX-2
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CV	Coeficiente de Variação
DAPI	“4'6-diamidino-2-phenylindole” - 4',6-diamidino-2-fenilindol
DNA	“Deoxyribonucleic acid” - Ácido desoxirribonucleico
DNAJB1	“DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member B1” - Família de proteínas de choque térmico DnaJ (Hsp40) membro B1
DNMT	“DNA methyltransferase” - DNA metiltransferase
D3	dia 3 de desenvolvimento embrionário
D7	dia 7 de desenvolvimento embrionário
D8	dia 8 de desenvolvimento embrionário
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FSH	“Follicular Stimulating Hormone” - Hormônio Folículo Estimulante
GAPDH	“glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase” – Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase
GVBD	“Germinal Vesicle Breakdown” - quebra da vesícula germinativa
HAT	“Histone acetyltransferases” - histona acetiltransferase

HDAC	“Histone deacetylases” - histona deacetilase
HMT	“Histone methyltransferases” - histona metiltransferase
HPX	“Hemopexin” - hemopexina
HSPA1A	“Heat shock 70 kDa protein 1” - Proteína do Choque Térmico de 70 KDa membro 1
HSPB1	“Heat shock protein beta-1” Proteína de choque térmico beta-1
HSF1	“Heat Shock Factor 1” - Fator de Transcrição do Choque Térmico 1
HSP	“Heat Shock Protein” - Proteína do Choque Térmico
IGF-I	“Insulin-Like Growth Factor I” - Fator de crescimento semelhante à insulina tipo I
IPCC	“Intergovernmental Panel on Climate Change” - Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas
MAPK	“Mitogen-activated protein kinases” - Proteína quinase ativada por mitógeno
Mg	miligrama
MI	Meiose I
MII	Meiose II
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
MI	Meiose I
Mm	milímetros
ng	nanograma
PBS	“Phosphate-buffered saline” - Tampão fosfato salino
PCBP2	“Poly(rC)-binding protein 2” - proteína 2 de ligação a poli (rC)
PCR	“Polymerase chain reaction” - Reação em cadeia de polimerase

PDCD4	“Programmed cell death protein 4” - proteína 4 da morte celular programada
PKM2	“Pyruvate kinase isozymes M1/M2 (PKM1/M2)” - Isoenzima piruvato quinase M1/M2
PRC1	“Polycomb repressive complex 1” - Complexo repressivo polycomb 1
PRC2	“Polycomb repressive complex 2” - Complexo repressivo polycomb 2
PLAC8	“Placenta Specific 8” - Proteína Gene 8 Específica da Placenta
PVA	“Polyvinyl alcohol” - Álcool polivinílico
REST	“Relative expression software tool” - Ferramenta de software de expressão relativa
RNAi	“RNA interference” - RNA interferente
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
RT-qPCR	“Real-time reverse transcription polymerase chain reaction” - Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real
SFB	Soro Fetal Bovino
STAT3	“Signal transducer and activator of transcription 3” - transdutor de sinal e ativador da transcrição 3
TALP	“Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate”
TCM199	“Tissue Culture Medium 199” - meio de cultura de tecidos
TUNEL	“Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling”
YWHAZ	“tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5 monooxygenase activation protein zeta” - tirosina 3-monoxigenase / triptofano 5 proteína de ativação da monooxygenase zeta
ZCT	Zona de conforto térmico

μL

microlitro

μM

micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Temperatura ambiente e reprodução	3
1.2	Implicações do estresse térmico na maturação do oócito	4
1.3	Implicações do estresse térmico no desenvolvimento do embrião	7
1.4	Fatores epigenéticos	10
1.4.1	Metilação de histonas	11
1.4.2	Acetilação de histonas	15
1.4.3	Metilação de DNA	17
1.4.4	RNAs não codificantes	19
1.5	microRNAs	21
1.5.1	microRNAs como moduladores epigenéticos	22
1.5.2	Biogênese de microRNAs	25
1.5.3	Repressão traducional mediada por miRNA	27
1.5.4	microRNAs e o desenvolvimento de oócitos e embriões	28
1.5.5	microRNAs e estresse térmico	30
2	HIPÓTESE	32
3	OBJETIVOS	33
3.1	Geral	33
3.2	Específicos	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	Delineamento experimental	34
4.2	Obtenção e maturação <i>in vitro</i> dos oócitos	36
4.3	Choque térmico em oócitos	36
4.4	Avaliação da taxa de maturação nuclear	37
4.5	Fecundação <i>in vitro</i> (FIV)	38

4.6	Cultivo <i>in vitro</i> (CIV)	38
4.7	Avaliação da taxa de clivagem e desenvolvimento embrionário	39
4.8	Avaliação do índice apoptótico dos embriões	39
4.9	Extração de RNA total e síntese de dna complementar (cDNA)	40
4.10	Seleção de genes e design de primers	41
4.11	Análise quantitativa da expressão gênica por PCR em tempo real...	45
4.11.1	Padronização da PCR em tempo real	45
4.12	Identificação dos microRNAs de referência para normalização de dados.....	53
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	55
6	RESULTADOS	56
6.1	Choque térmico durante a maturação <i>in vitro</i> compromete a maturação nuclear.....	56
6.2	As taxas de clivagem e de desenvolvimento embrionário são reduzidos pela exposição de oócitos ao choque térmico durante a maturação <i>in vitro</i>	57
6.3	O índice apoptótico no D8 é maior em oócitos submetidos ao choque térmico durante a maturação <i>in vitro</i>	58
6.4	Seleção dos microRNAs de referência para normalização de dados..	59
6.5	Análise quantitativa da expressão gênica por PCR em tempo real.....	62
7	DISCUSSÃO	65
8	CONCLUSÃO.....	75
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

1 INTRODUÇÃO

O clima tem um efeito importante em todos os aspectos da vida animal, desde o desenvolvimento, passando pelo comportamento, até a reprodução. O aumento da temperatura terrestre é uma realidade e tem sido alvo de diferentes estudos. Dados publicados no relatório do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC) (2014) descrevem o aumento de 0,85°C na temperatura da superfície global entre os anos de 1880 e 2012 e projetam o aumento de até 4,8 °C até o ano de 2100 (IPCC, 2014). Um relatório especial publicado pelo IPCC em 2018, relata que o aquecimento global deve atingir 1,5° C entre 2030 e 2052, comprometendo sistemas naturais e humanos, bem como ecossistemas terrestres e oceânicos e os serviços que eles oferecem (IPCC, 2018).

Os sistemas de produção pecuária além de contribuir para os fatores que causam as mudanças climáticas, são altamente afetados pelas mudanças na temperatura terrestre (RUST, 2018). Sabe-se que bovinos são extremamente susceptíveis não só a condições térmicas extremas, mas também a rápidas mudanças climáticas. Os impactos da elevada temperatura na produção pecuária bovina podem ser diretos ou indiretos, e incluem principalmente diminuição do desempenho reprodutivo, taxa de crescimento, bem como redução na qualidade de produtos e serviços relacionados com a produção animal (HOFFMANN, 2010). Estima-se que o impacto econômico do estresse térmico na produção pecuária global seja de mais de US\$ 1,2 bilhão (BAUMGARD; RHOADS, 2013).

Entre os efeitos adversos do estresse térmico sobre o desempenho reprodutivo, destacam-se os impactos deletérios na maturação oocitária e desenvolvimento embrionário precoce. Oócitos e embriões em estágios iniciais são extremamente susceptíveis às elevações de temperatura (SAKATANI, 2017). Os mecanismos pelos quais a elevada temperatura compromete a viabilidade de oócitos e embriões ainda não estão bem estabelecidos. No entanto, é possível que fatores ou estímulos externos resultem em alterações epigenéticas que comprometam a expressão gênica e proteica e,

consequentemente, influencia no desempenho reprodutivo (MARTÍNEZ-FRÍAS, 2010; CAMARGO et al., 2016; TRIANTAPHYLLOPOULOS; IKONOMOPOULOS; BANNISTER, 2016).

Entre os mecanismos epigenéticos, destacam-se a metilação do DNA, as modificações pós-traducionais das histonas e o controle pós-transcricional da expressão gênica mediado por RNAs não codificantes (ncRNAs) (MATTICK et al., 2009). MicroRNAs (miRNAs) são, atualmente, uma das mais importantes classes de ncRNAs, classificados como moduladores epigenéticos essenciais, uma vez que afetam os níveis de tradução proteica dos mRNAs alvo sem modificar a sua sequência de DNA (WANG et al., 2017). Além de moduladores epigenéticos, os miRNAs podem ser alvo de modificações epigenéticas que modulam seus níveis de transcrição, através da metilação do DNA e/ou modificações histônicas específicas (MOUTINHO; ESTELLER, 2017). Adicionalmente, eles podem reprimir a expressão de enzimas envolvidas no remodelamento epigenético e também se ligar a promotores gênicos, recrutando complexos de proteínas que modulam a estrutura da cromatina e a expressão de genes específicos (MOUTINHO; ESTELLER, 2017).

MicroRNAs estão envolvidos em uma ampla gama de processos biológicos, entre eles oôgenese e embriogênese (GROSS; KROPP; KHATIB, 2017). Recentemente, diversos estudos têm mostrado mudanças consideráveis nos perfis de expressão de miRNAs relacionadas a resposta ao estresse térmico (NEHAMMER et al., 2015; SENGAR et al., 2018). Os resultados desses estudos apontam para o perfil da expressão de miRNAs como uma importante ferramenta para fornecer novos conhecimentos sobre como o estresse térmico afeta o desempenho reprodutivo bovino.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi identificar o efeito do choque térmico durante a maturação *in vitro* na expressão de miRNAs em oócitos bovinos e nos embriões derivados desses oócitos após a fertilização *in vitro*.

1.1 Temperatura ambiente e reprodução

A zona de conforto térmico (ZCT) para bovinos, que é o intervalo de temperatura no qual o animal não apresenta sinais de desconforto térmico, varia de 5°C a 25°C (YOUSEF, 1985); podendo alcançar limite superior de até 27°C (FUQUAY, 1981). Dentro desse limiar a temperatura corporal fisiológica se mantém entre 38,4°C a 39,1°C (YOUSEF, 1985). Além da temperatura, outro parâmetro utilizado para determinar a ZCT é a umidade relativa do ar, que em animais domésticos deve variar de 60% a 70% (MÜLLER, 1989).

Quando a ZCT é ultrapassada, os animais aumentam o ganho de calor além do perdido pelo corpo e estabelece-se o estresse térmico (KUMAR; AJEET; MEENA, 2011). O estresse térmico pode ser definido como um conjunto de fatores abióticos que atuam sobre um animal, causando um aumento na temperatura corporal (DIKMEN; HANSEN, 2009). Como resultado, são observadas diversas alterações fisiológicas, aumento da temperatura na superfície corporal, taxa de respiração (FR), frequência cardíaca e temperatura retal (TR) (DALCIN et al., 2016). Esses fatores influenciam diretamente no consumo de ração e água bem como na eficiência produtiva e reprodutiva dos animais (DAS et al., 2016; DASH et al., 2016).

Na produção pecuária bovina, o estresse térmico é um dos principais fatores contribuintes para a redução do desempenho reprodutivo, sendo refletido principalmente nas baixas taxas de concepção. Foi relatado que as taxas de concepção de vacas mestiças expostas ao estresse térmico diminuíram de 43,72 para 26,90% quando o Índice Temperatura e Umidade (ITU) aumentou de 71 (inverno) para 75 (verão) (AYRES et al., 2014). Resultados semelhantes foram obtidos em vacas Holstein e Japanese Black (NABENISHI et al., 2018). Os mecanismos pelos quais a elevada temperatura compromete a qualidade do oócito e o sucesso do desenvolvimento embrionário ainda não estão bem estabelecidos, nem como as condições fisiológicas maternas sob condições de estresse podem influenciar o desempenho reprodutivo.

Medidas para reduzir o efeito já existente das alterações climáticas sobre a produção e reprodução pecuária tem sido adotadas. Algumas delas incluem: otimizar a produtividade de culturas e forragens, melhorar a capacidade dos animais de lidar com o estresse ambiental por meio de manejo e seleção (NARDONE et al., 2010), direcionar o período reprodutivo para épocas menos quentes, uso de tratamentos hormonais para a fertilidade e sistemas de resfriamento (FRIEDMAN et al., 2014; DE RENSIS; GARCIA-ISPIERTO; LÓPEZ-GATIUS, 2015). Apesar dos efeitos positivos, essas medidas são pouco representativas no universo pecuário, principalmente em países em desenvolvimento, nos quais os recursos são limitados para adaptação às novas tecnologias. Além disso, há pouco conhecimento sobre o comportamento de uma variedade de raças diante de eventos de estresse, bem como os eventos moleculares responsáveis por quedas na eficiência reprodutiva. Por este motivo, há um grande interesse, em se compreender melhor como animais de produção reagem diante de estressores climáticos.

1.2 Implicações do estresse térmico na maturação do oócito

A qualidade do oócito determina o sucesso da fertilização e afeta o consequente desenvolvimento do embrião. Mamíferos possuem uma quantidade finita de células germinativas que é estabelecida na vida fetal e depois usada durante a foliculogênese. Em bovinos, existem aproximadamente 150.000 folículos primordiais, cada um com um oócito estacionado na primeira prófase meiótica rodeado por uma única camada de células pré-granulosas achatadas (ROTH, 2017). Neste estágio, o oócito é caracterizado por uma estrutura nuclear denominada vesícula germinativa (VG) (ERICKSON, 1966).

Durante a parada meiótica, o oócito passa por uma fase de crescimento que dura de 80 a 100 dias, caracterizado por expansão do volume celular (de 20 a 130 μm), alterações morfológicas e altas taxas de transcrição e tradução (HYTTEL; FAIR; CALLESEN; GREVE, 1997). O acúmulo de mRNA materno durante a fase de crescimento fornece ao oócito a sua competência de desenvolvimento, isto é, o potencial para sofrer maturação, fertilização e

sustentar o desenvolvimento embrionário inicial (MOUSSA et al., 2015). Esta etapa representa um dos períodos mais críticos do ciclo reprodutivo e qualquer perturbação fisiológica pode levar a redução na competência oocitária. Tem sido demonstrado que oócitos nas primeiras 12 horas de maturação, são mais suscetíveis à elevação da temperatura porque a sua exposição ao estresse térmico levaria ao envelhecimento precoce associado ao aumento da produção de radicais livres (PAYTON et al., 2004; EDWARDS et al., 2005).

Diversos autores procuraram responder os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na resposta ao choque térmico (Tabela 1). Nos modelos *in vitro*, a exposição de Complexos *Cumulus*-Oócito (CCOs) ao choque térmico resultou no comprometimento da organização do citoesqueleto, redução nas taxas de maturação oocitária, aumento nos índices apoptóticos e modificações na distribuição de grânulos corticais (EDWARDS et al., 2005; PAVANI et al., 2016; RODRIGUES et al., 2016). Microtúbulos e microfilamentos são estruturas essenciais para o sucesso no transporte nuclear e de organelas, portanto, alterações no citoesqueleto podem comprometer a maturação do oócitos através de falhas no transporte e distribuição de organelas citoplasmáticas (FERREIRA et al., 2009).

Adicionalmente, mudanças induzidas por choque térmico na organização do citoesqueleto e subsequente redução na proporção de oócitos bovinos que atingem a metáfase II sugerem que o choque térmico durante a maturação *in vitro* pode retardar ou bloquear a progressão meiótica, possivelmente através de falhas na segregação cromossômica (RODRIGUES et al., 2016). Complementar a esses dados, Ahmed et al. (2017) relataram que o choque térmico durante a MIV está associado à redução dos eventos citoplasmáticos e ao aumento da apoptose em células do *cumulus*, que compromete a capacidade de desenvolvimento do oócito.

Tabela 1: Alterações celulares e moleculares induzidas por elevação da temperatura em oócitos.

Local da célula	Estrutura celular	Alterações		Fonte
		Oócitos em vesícula germinativa (GV)	Oócitos maturados	
Citoplasma	Filamentos de actina	-----	Redução na polimerização de actina	(ROTH; HANSEN, 2005)
	Microtúbulos	-----	Desorganização de microfilamentos e microtúbulos	(ROTH; HANSEN, 2005)
	Grânulos corticais (GC)	Aumento da translocação para o oolema	Redução na migração dos grânulos corticais	(AHMED et al., 2017)
	Mitocôndria	Redução da atividade mitocondrial	Redução da atividade mitocondrial Redução no potencial de membrana mitocondrial	(PAYTON et al., 2018) (ASCARI et al., 2017)
	Proteínas	Redução na síntese total de proteínas	Redução na síntese total de proteínas	(EDWARDS; HANSEN, 1996)
		Atividade de caspases do grupo II não foi afetada	Aumento da atividade de caspases	(EDWARDS et al., 2005)
Núcleo	Fuso meiótico	Redução da maturação meiótica (estágio MII)	Redução da maturação meiótica (estágio MII)	(ROTH; HANSEN, 2005)
	DNA	Aumento da fragmentação de DNA (TUNEL positivo)	Aumento da fragmentação de DNA (TUNEL positivo)	(ROTH; HANSEN, 2004)
	RNA	-----	Alteração nas quantidades de transcritos	(GENDELMAN; ROTH, 2012) (TICIANELLI et al., 2017)
Membrana	Lipídeos	Aumento de ácidos graxos saturados	-----	(ZERON et al., 2001)
		-----	Translocação de fosfatidilserina para porção exterior da membrana plasmática (anexina-V)	(KALO; ROTH, 2011)

Fonte: PAULA-LOPES et al., 2012 p.398 (atualizado)

Outra importante consequência do choque térmico durante a maturação do oócito é o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e aumento nos níveis apoptóticos (PAES et al., 2016; ASCARI et al., 2017). O desequilíbrio redox e aumento da produção de ERO levam a diminuição nos níveis de glutatona peroxidase intraoocitário, um antioxidante responsável por

proteger os lipídios da membrana celular da peroxidação (MORAES et al., 2012; NABENISHI et al., 2012). O aumento na produção de ERO está intimamente associado à produção de energia oxidativa ou sobrecarga de cálcio, o que pode desencadear a abertura dos poros da membrana mitocondrial, liberação do citocromo c e ativação de caspases, com subsequente apoptose (WANG et al., 2009).

Além do estresse oxidativo, alterações à nível transcricional e traducional são observadas, em particular de genes relacionados à função mitocondrial, maturação oocitária, desenvolvimento embrionário, apoptose e estresse oxidativo (FERREIRA et al., 2016; TICIANELLI et al., 2017; PAYTON et al., 2018).

Em conjunto, esses achados indicam que o mecanismo pelo qual o estresse térmico prejudica o desenvolvimento do oócito é de natureza multifatorial e que alterações em estágios iniciais do desenvolvimento podem ser expressas mais tarde como comprometimento da competência no desenvolvimento do embrião. Reconhecer os mecanismos celulares e moleculares envolvidos nesses processos podem permitir o desenvolvimento de novas estratégias para mitigar os efeitos do estresse térmico na fertilidade.

1.3 Implicações do estresse térmico no desenvolvimento do embrião

O estresse térmico é uma das principais causas do baixo desenvolvimento e das baixas de sobrevivência em embriões bovinos. Em embriões submetidos ao choque térmico durante o cultivo *in vitro*, tem-se redução na porcentagem de zigotos presuntivos que se tornam blastocistos, redução da expressão de genes essenciais para o sucesso no desenvolvimento (CDX2, PLAC8, COX2 e HSF1) e aumento da porcentagem de blastômeros apoptóticos (túnel positivo) (SILVA et al., 2013). Similar a esses resultados, Camargo et al. (2016) relataram que em embriões submetidos a choque térmico após a inseminação, houve comprometimento do desenvolvimento embrionário, aumento nos índices apoptóticos e alteração na expressão relativa de alguns genes

envolvidos na resposta ao estresse oxidativo, metabolismo e termoproteção (CAMARGO et al., 2016).

Estudos *in vitro* mostraram que a sensibilidade de embriões bovinos às alterações induzidas por choque térmico é dependente do estágio de desenvolvimento (SAKATANI; KOBAYASHI; TAKAHASHI, 2004). Embriões em estágio inicial são mais suscetíveis a temperatura elevada, sendo os efeitos deletérios do choque térmico reduzidos a partir dos estágios de 4 a 8 células (SAKATANI et al., 2012; GRAF et al., 2014; SAKATANI, 2017). Quando nos estágios de mórula e blastocisto, são adquiridas competências termotolerantes que neutralizam os efeitos prejudiciais do estresse térmico (revisado por HANSEN, 2007).

A exposição ao calor dos embriões em estágio inicial (2 células) levou à diminuição da competência de desenvolvimento através da reorganização de microfilamentos e microtúbulos, inchaço mitocondrial e alteração na disposição espacial das organelas (RIVERA et al., 2004). Paula-Lopes; Hansen (2002); Lonergan et al. (2003) e Khatun et al. (2018) relataram que embriões bovinos expostos ao choque térmico apresentaram redução significativa nas taxas de desenvolvimento e atividade mitocondrial, aumentaram a quantidade de ERO intracelular e incidência de apoptose.

O comprometimento do desenvolvimento embrionário após a elevação da temperatura, principalmente nos estágios iniciais de desenvolvimento está intimamente associado a produção de ERO, afetando negativamente a qualidade e desenvolvimento de embriões. A produção excessiva de ERO causa diferentes tipos de lesões celulares, incluindo metabolismo alterado, oxidação de aminoácidos e ácidos nucleicos, disfunção mitocondrial e do retículo endoplasmático, depleção de adenosina trifosfato (ATP), apoptose e inibição do desenvolvimento meiótico (ALI et al., 2017). Khatun et al. (2018) definiriam o desequilíbrio oxidativo em embriões submetidos ao choque térmico como o fator responsável pelo aumento da permeabilidade mitocondrial e subsequente apoptose. Sakatani et al. (2008) associaram a produção excessiva de ERO como a principal causa de aumento da mortalidade embrionária em embriões em estágio inicial submetidos ao choque térmico.

Em embriões cultivados na presença de antioxidantes após a exposição ao choque térmico, houve aumento na competência de desenvolvimento, e similaridade na produção de ERO e nos índices apoptóticos entre embriões estressados e controle (KHATUN et al., 2018). Esses dados em conjunto indicam que o mecanismo para a termo tolerância depende do estágio de desenvolvimento e está relacionada com o acúmulo de antioxidantes em embriões em estágios posteriores de desenvolvimento.

Diversos estudos foram realizados com o objetivo de elucidar a nível molecular, o conjunto de elementos envolvidos na resistência ao choque térmico nos estágios de mórula e blastocisto. A análise transcriptômica de embriões bovinos no estágio de mórula, revelou que o choque térmico aumentou a expressão de genes envolvidos na termoproteção celular (HSPA1A e HSPB1) e no sistema ubiquitina. No entanto, a análise de genes relacionados à remoção de radicais livres indicou que nenhum deles foi significativamente afetado pelo choque térmico (SAKATANI et al., 2013). O sistema ubiquitina está envolvido na degradação de proteínas danificadas e na ativação de respostas de apoptose (YANG; YU, 2003). Portanto, tem sido sugerido que o aumento da resistência em estágios posteriores está relacionado ao desenvolvimento de mecanismos responsáveis por evitar o acúmulo de proteínas desnaturadas e dano causado por estresse oxidativo (SAKATANI et al., 2013; 2017). Outros fatores relacionados a termotolerância em estágios de 8 a 16 células são: a disponibilidade de transcritos aumentada pela ativação do genoma embrionário (revisado por SAKATANI, 2017) e a resistência a sinais pró-apoptóticos (HANSEN; FEAR, 2011).

Em conclusão, os efeitos prejudiciais do choque térmico tanto para oócitos como para embriões em estágio pré-implantação pode ser devido ao estresse oxidativo (principalmente pela produção de ERO), danos organelares, comprometimento do citoesqueleto e alterações na expressão gênica. Embora esses achados demonstrem alguns mecanismos pelos quais elevadas temperaturas comprometem o desenvolvimento oocitário e embrionário, maiores estudos são necessários.

1.4 Fatores epigenéticos

Estudos recentes têm sugerido que fatores ambientais podem ter influências no epigenoma, o que pode, por sua vez, comprometer o metabolismo e a competência do desenvolvimento embrionário (SIRARD, 2017; TREMBLAY et al., 2017; DE BARROS; PAULA-LOPES, 2018).

Por meio da fertilização *in vitro* tem-se compreendido os processos metabólicos que impulsionam o crescimento embrionário. O desenvolvimento pós-fecundação é dependente de sucessivos eventos moleculares altamente organizados, que incluem: ativação do genoma embrionário, compactação, clivagens celulares, diferenciação de linhagens e formação de blastocelo (ZERNICKA-GOETZ; MORRIS; BRUCE, 2009). Todas essas atividades dependem da remodelação dos genomas parentais durante a meiose, bem como de mudanças epigenéticas que fornecem um novo e autônomo conjunto de instruções para guiar a diferenciação celular do embrião (CHASON et al., 2011).

Atualmente não há uma definição universal para o termo “epigenética”, no entanto em termos gerais pode-se dizer que epigenética refere-se ao estudo de mudanças funcionais do gene que são mitoticamente e/ou meioticamente herdáveis e que não implicam em mudanças na sequência do DNA (DEANS; MAGGERT, 2015). As modificações epigenéticas podem ser classificadas por três mecanismos principais: metilação do DNA, modificações pós-traducionais das histonas e controle da expressão gênica por RNAs não-codificantes (BERNSTEIN; MEISSNER; LANDER, 2007; PESCHANSKY; WAHLESTEDT, 2014).

O epigenoma é responsável por estabelecer perfis de expressão gênica e compreende dois componentes diferentes: a estrutura da cromatina, que está associada ao DNA e um padrão de metilação do DNA (D’ALESSIO; SZYF, 2006). A cromatina é formada por unidades fundamentais, denominadas nucleossomo, que se repetem a cada 160 a 240 pb através do genoma. Cada nucleossomo contém um núcleo composto de um complexo octâmero de proteínas histonas que estão fortemente associadas ao DNA através da cauda

N-terminal (MCGINTY; TAN, 2015). Embora a cromatina tenha sido vista por muito tempo como uma unidade estática, hoje a literatura reconhece que cromatina não é uma estrutura inerte, e sim um arcabouço de DNA instrutivo que pode responder a estímulos externos, reprimindo ou facilitando a transcrição gênica (LI; CAREY; WORKMAN, 2007; BANNISTER; KOUZARIDES, 2011).

A cromatina é organizada em domínios distintos, a eucromatina e heterocromatina, que são definidos pelo grau de compactação e funções genômicas associadas. Por exemplo, a eucromatina tem compactação relativamente solta e é geralmente transcricionalmente permissiva, enquanto a heterocromatina é mais condensada e, geralmente, transcricionalmente repressiva (LI; REINBERG, 2011).

A organização da cromatina é altamente influenciada por numerosos fatores, entre eles, modificações químicas nas histonas e no DNA. As modificações nas histonas são modificações pós-traducionais reversíveis em suas cauda N-terminais e C-terminais, que afetam a dinâmica estrutural do nucleossomo e regulam a organização da cromatina assim como sua função, ditando padrões de expressão gênica, definindo a acessibilidade do mecanismo de transcrição aos genes, bem como controlando a acessibilidade do genoma à outros mecanismos, tais como reparo, replicação de DNA e segregação cromossômica (BOWMAN; POIRIER, 2015).

São muitas as modificações pós-traducionais das histonas, que incluem crotonilação, succinilação, acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitilação, ADP-ribosilação e malonilação (ROTHBART; STRAHL, 2014), algumas serão melhor descritas a seguir.

1.4.1 Metilação de histonas

A metilação das histonas é uma das modificações epigenéticas mais conhecidas e estudadas, e envolve a transferência de um grupo metila para os grupos ϵ -amino dos resíduos de lisina (K) e arginina (R), principalmente nas

caudas N-terminal H3 e H4. Ao contrário de outras modificações pós-traducionais como a acetilação e fosforilação, a metilação das histonas não altera a carga do resíduo e, portanto, modula a estrutura da cromatina principalmente através do recrutamento de proteínas de leitura distintas que possuem a capacidade de facilitar ou reprimir a transcrição (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011).

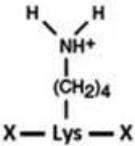
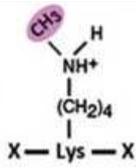
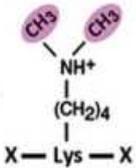
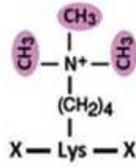
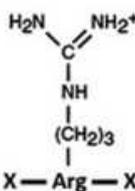
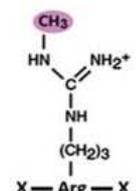
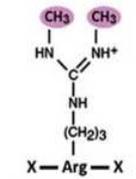
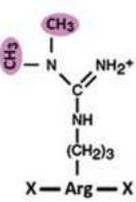
A metilação pode resultar na ativação ou inibição da expressão gênica, de acordo com o local na cauda das histonas e do grau de metilação do resíduo de aminoácido. As lisinas por exemplo podem ser mono-, di- ou tri-metiladas, enquanto as argininas podem ser mono-, simetricamente ou assimetricamente di-metiladas (Tabela 2) (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011; SADAKIERSKA-CHUDY; FILIP, 2014). Tem sido sugerido que essa modificação pós-traducional está envolvida na memória epigenética do estado transcricional, alterando a organização da cromatina de maneira hereditária, podendo afetar a capacidade de resposta de um organismo a um estímulo através de gerações seguidas (revisado por D'URSO; BRICKNER, 2014).

A metilação de lisinas e argininas é realizada por enzimas denominadas histonas metiltransferases (HMTs) (RICE; ALLIS, 2001). Estas enzimas são denominadas arginina metiltransferases (PRMTs) quando catalisam as reações bioquímicas de metilação da arginina e proteínas lisina metiltransferases (PKMTs) quando catalisam as reações bioquímicas de metilação da lisina. Em geral, a eucromatina está relacionada à metilação da H3 lisina 4, 36 e 79 enquanto a metilação da H3 lisina 9 e 27 bem como da H4K20, está ligada a regiões silenciadas ou heterocromáticas (WOZNIAK; STRAHL, 2014). Em relação a metilação dos resíduos de arginina, foi estabelecido que modificações como H4R3me2a, H3R2me2s, H3R17me2a, H3R26me2a, estão associadas à cromatina ativa; enquanto as modificações H3R2me2a, H3R8me2a, H3R8me2s, H4R3me2s estão associadas à marcas repressivas da cromatina (BLANC; RICHARD, 2017).

Modificações pós-traducionais das histonas são extremamente importantes para ditar a regulação espacial e temporal da transcrição. Desta forma, o adequado processo de metilação torna-se crítico em momentos em que a regulação específica da expressão gênica é necessária (por

exemplo, durante o desenvolvimento inicial). Em estudos que investigam o papel das HMTs durante o desenvolvimento inicial, tem sido relatado que a perda de PRMTs e PKMTs pode levar falhas no desenvolvimento e à letalidade precoce (BRECKENRIDGE et al., 2010; DAMBACHER; HAHN; SCHOTTA, 2010).

Tabela 2: Leitura e interpretação de modificações pós-traducionais de histonas

Resíduo de aminoácido [código]	Funções associadas	Modificação	Estrutura química	Exemplos de Nomeclatura das modificações
Lisina [K] 	regulação gênica, reparo do DNA, replicação do DNA, heterocromatina	Monometilação		H3K9me1
		dimetilação		H3K9me2
		trimetilação		H3K9me3
Arginina [R] 	regulação gênica	monometilação		H3R2me1
		Dimetilação simétrica		H3R2me2s
		Dimetilação assimétrica		H4R3me2a

Fonte: ROTHBART; STRAHL, 2014 p.39; WANG; PETERSON; LORING, 2014 p.151 (adaptado)

1.4.2 Acetilação de histonas

A acetilação de histonas é caracterizada pela N-acetilação de resíduos de lisina nas histonas. Esse processo é altamente dinâmico e regulado pela ação de dois grupos de enzimas principais, histonas acetiltransferases (HATs) e histonas desacetilases (HDACs) (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011). A acetilação propicia a transcrição gênica, neutralizando a carga positiva da lisina e enfraquecendo as interações entre histonas e DNA, causando a descondensação da cromatina e, finalmente, facilitando o acesso dos fatores de transcrição aos promotores do gene (revisado por VERDIN; OTT, 2015). Em contraste, as HDACs removem os grupos acetila levando à hipoacetilação, compactação da cromatina e inibição da transcrição (Figura 1) (SADAKIERSKA-CHUDY; FILIP, 2014).

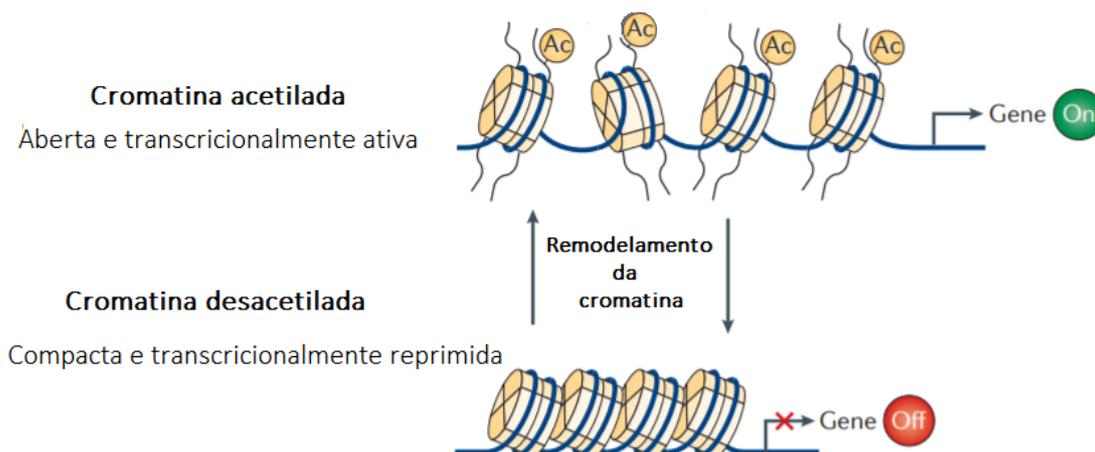


Figura 1: Organização estrutural da cromatina. A organização da cromatina é definida por padrões de acetilação ou desacetilação das histonas e expressão gênica. A acetilação alveja os resíduos lisina nas caudas amino-terminais das proteínas histonas. Fonte: VERDIN; OTT, 2015, p. 261.

Embora predominantemente aceito, o mecanismo de regulação da transcrição gênica por acetilação das histonas não está restrito ao fortalecimento e enfraquecimento das interações entre histonas e DNA. A descoberta de que os resíduos de acetil-lisina nas caudas de histona formam sítios de ligação para bromodomínios, sugere que a acetilação, semelhante a

fosforilação de proteínas, cria uma nova superfície de ligação para recrutar outras proteínas para o nucleossomo (CLAYTON; HAZZALIN; MAHADEVAN, 2006). Os bromodomínios podem atuar como scaffolds, facilitando a montagem de complexos proteicos, como fatores de transcrição e co-reguladores transcricionais e podem desempenhar várias funções catalíticas, as quais incluem atuar como metiltransferases e complexos de remodelação de cromatina (FUJISAWA; FILIPPAKOPOULOS, 2017). É possível que, para um resíduo específico de lisina, ambas as modalidades funcionais de acetilação possam ser fisiologicamente relevantes e aplicadas em diferentes circunstâncias (SHOGREN-KNAAK et al., 2006).

Durante a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário, a acetilação e desacetilação de histonas mostraram-se fundamentais. Um estudo anterior mostrou que os níveis de histona desacetilases e acetiltransferases são variáveis quando oócitos bovinos se desenvolvem no estágio de blastocisto (SHOGREN-KNAAK et al., 2006). Alterações nos padrões de desacetilação durante a meiose do oócito resulta em aneuploidia e morte embrionária em camundongos (AKIYAMA; NAGATA; AOKI, 2006). Franciosi et al. relataram que a MIV, pode afetar adversamente a qualidade do oócito via regulação da acetilação e desacetilação de histonas, perturbando a estabilidade genética do oócito e do embrião (FRANCIOSI et al., 2012, 2015).

As HDAC1 e HDAC2, mostraram desempenhar papéis fundamentais durante o desenvolvimento do oócito e embrião murino. Foi observado que a redução de HDAC1 mediada por RNAi resulta em mudanças no estado de acetilação da histona H4K5 e atraso desenvolvimento embrionário (MA; SCHULTZ, 2008; OLSON et al., 2012). Já a deleção global dessas enzimas resulta em morte precoce e malformações cardíacas graves (MONTGOMERY et al., 2007). Em contrapartida, o uso de inibidores de HDAC durante o desenvolvimento embrionário bovino resulta no aumento da taxa de clivagem, taxa de formação de blastocistos e taxa de eclosão de embriões (HUA et al., 2011), dados semelhantes foram relatados para ovinos (WEN et al., 2014).

A acetilação e desacetilação da lisina é uma modificação epigenética reversível e pode ser influenciada por outros tipos de modificações pós-traducionais das histonas, por exemplo, a fosforilação da serina 10 ou 28 na

histona H3 (H3S10 e H3S28) estão associadas à acetilação de histonas e ativação transcricional de genes específicos (DELCUVE; KHAN; DAVIE, 2012; SADAKIERSKA-CHUDY; FILIP, 2014). Todos esses processos, ocorrem de forma inter-relacionada e altamente orquestrada. Esses fatores tornam o estudo das modificações epigenéticas um processo complexo. Atualmente, tecnologias avançadas de alto rendimento permitem a maior exploração de dados, melhorando a compreensão sobre os processos iniciais de desenvolvimento e as modificações epigenéticas relacionadas. Descobrir as bases desses mecanismos é uma estratégia promissora para melhorar a fertilidade, saúde e produtividade animal.

1.4.3 Metilação de DNA

A metilação do DNA é uma marca epigenética hereditária envolvendo a transferência covalente de um grupo metila para a posição C-5 do anel de citosina do DNA. Esse processo é catalisado por enzimas específicas denominadas DNA metiltransferases (DNMTs) (Figura 2). Essa é uma das modificações epigenéticas mais bem estudadas e mecanicamente compreendidas, além de ser altamente conservada na maioria dos modelos de plantas, animais e fungos (SCHULTZ et al., 2015). Geralmente, a metilação do DNA está associada à repressão da transcrição gênica (SCHULTZ et al., 2015); no entanto, essa modificação epigenética pode estar associada a diferentes estados de expressão dependendo do contexto genômico (SCHULTZ et al., 2015). Em oócitos bovinos, por exemplo, genes com alta metilação do corpo gênico são mais expressos quando comparados àqueles com pouca ou nenhuma metilação (SCHROEDER et al., 2015).

Em mamíferos, a metilação do DNA ocorre principalmente em dinucleotídeos CG, em regiões denominadas “Ilhas CpG” que normalmente contêm cerca de 5 a 10 CpGs por 100 pares de base e muitas vezes são co-localizados com promotores de genes e regiões reguladoras (AUCLAIR; WEBER, 2012). As ilhas CpG geralmente não são metiladas e quando elas se tornam metiladas, a transcrição gênica é bloqueada (LI; ZHANG, 2014).

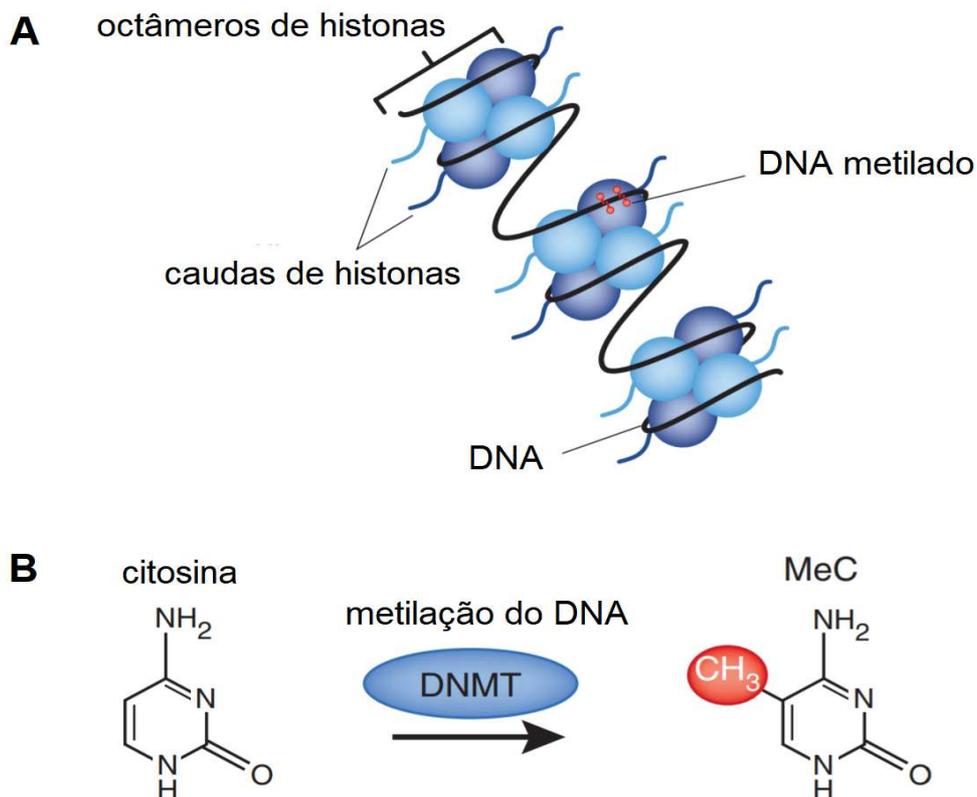


Figura 2: Metilação do DNA. (A) Dentro do núcleo da célula, o DNA é envolvido firmemente em torno de um octâmero de proteínas histonas para formar a cromatina. Modificações epigenéticas podem ocorrer nas caudas das histonas ou diretamente no DNA via metilação do DNA. (B) A metilação do DNA ocorre nas bases da citosina quando é adicionado um grupo metila, CH₃ (vermelho), na posição 5' do anel citosina pirimidina, processo catalisado por metiltransferases (DNMT). Fonte: DAY; SWEATT, 2010, p. 1320 (adaptado).

O estabelecimento e manutenção de padrões de metilação é um dos principais passos na regulação epigenética durante o desenvolvimento embrionário e é mediado por três DNMTs: DNMT1, DNMT3A e DNMT3B. DNMT1 é caracterizada como uma metiltransferase de manutenção, está localizada em focos de replicação durante a fase S e é responsável por copiar os padrões de metilação do DNA nas cadeias-filhas durante a replicação do DNA. DNMT3A e o DNMT3B, em contraste com o DNMT1, têm preferência por dinucleótidos CpG não metilados e realizam a metilação *de novo* durante o desenvolvimento (JIN; LI; ROBERTSON, 2011; DU et al., 2015).

Diferentes estudos mostraram que todas as três enzimas são essenciais para o desenvolvimento de gametas e embriões. Machos *knockout* condicionais de DNMT3a mostram-se estéreis devido à azoospermia e

careciam de metilação em dois dos três *locus* impressos paternalmente, indicando que a deficiência de DNMT3a leva à espermatogênese prejudicada. Já as fêmeas *knockout* condicionais de DNMT3a, embora produzissem oócitos maduros, seus descendentes morreram no útero (KANEDA et al., 2004).

No desenvolvimento embrionário, camundongos portadores de uma mutação pontual no gene DNMT1 apresentaram parada de desenvolvimento, acompanhados por múltiplos defeitos, tais como: perda quase completa da metilação do DNA e distribuição alterada de marcadores repressivos de cromatina nos núcleos (TAKEBAYASHI et al., 2007); já a interrupção da expressão de DNMT1 em células tronco embrionárias humanas causou morte celular imediata (LIAO et al., 2015). DNMT3B mostrou estabelecer marcas secundárias de metilação em locais específicos durante o desenvolvimento embrionário no camundongo (AUCLAIR et al., 2014).

A metilação do DNA e as modificações de histonas estão envolvidas no estabelecimento de padrões de repressão genética durante o desenvolvimento através de cointeração (CEDAR; BERGMAN, 2009). A trimetilação da histona H3 lisina 9 (H3K9), histona H3 lisina 27 (H3K27) e histona H4 lisina 20 (H4K20) tem sido sugerida como pré-requisito para metilação posterior do DNA, o que está relacionado a capacidade de associações físicas entre os componentes destes sistemas de metilação de histona e DNMTs (JIN; LI; ROBERTSON, 2011).

1.4.4 RNAs não codificantes

RNAs não-codificantes ou ncRNAs (do inglês non-coding RNAs) são produtos de genes que são transcritos e não são traduzidos em proteínas e atualmente representam um importante grupo de moléculas que regulam a deposição das marcas epigenômicas (MATTICK et al., 2009). Grande parte do genoma eucarioto é composta por ncRNAs e estes têm papel de destaque na regulação da expressão gênica (PALAZZO; LEE, 2015).

De acordo com as funções desempenhadas os ncRNAs podem ser divididos em duas principais classes, ncRNAs estruturais e reguladores. Os

ncRNAs estruturais, são expressos constitutivamente em todos os tipos celulares, ao contrário, os ncRNAs reguladores têm um bem definido padrão de expressão que depende do estágio de desenvolvimento e do tipo de célula. Os ncRNAs reguladores com menos de 200 nucleotídeos geralmente são denominados curtos RNAs ou pequenos RNAs e incluem os microRNAs (miRNAs), pequenos RNAs de interferência (siRNAs), RNAs que interagem com Piwi (piRNAs) (SADAKIERSKA-CHUDY; FILIP, 2014) entre outros. Já os ncRNAs com mais de 200 nucleotídeos são chamados RNAs longos não codificantes (lncRNAs) (ZHENG; LIU; SHUKLA, 2017).

Diversas evidências sugerem que ncRNAs podem afetar a expressão gênica à nível de transcrição ou tradução e desempenham papéis significativos na modificação epigenética, recrutando complexos modificadores de histona para adicionar ou remover grupos metil e acetil, facilitando ou suprimindo a metilação do DNA ou ainda promovendo modificações estruturais da cromatina (HOLOCH; MOAZED, 2015; WEI et al., 2017).

LncRNAs por exemplo, podem regular os programas de transcrição influenciando o estado epigenético por meio de interações diretas com as proteínas modificadoras da cromatina (revisado por VAN KRUIJSBERGEN; HONTELEZ; VEENSTRA, 2015), promovendo o silenciamento de genes através do recrutamento Polycomb (proteínas que promovem a repressão do gene através de modificações e compactação específicas da cromatina) (DA ROCHA et al., 2014), e também modulando a metilação do DNA por meio da interação direta ou indireta com diversos membros DNMT (revisado por ZHAO; SUN; WANG, 2016). De forma semelhante, pequenos ncRNAs estão implicados na regulação epigenética. RNAs curtos foram identificados interagindo com a PRC2 através de estruturas *stem-loop*, estabilizando sua interação com a cromatina, permitindo a repressão da transcrição do mRNA (KANHERE et al., 2010).

Pequenos RNAs interferentes (RNAi) foram relatados como reguladores da formação de heterocromatina (MARTIENSSEN; MOAZED, 2015; JAIN; IGLESIAS; MOAZED, 2016). Similarmente, miRNA e piRNAs foram implicados na organização estrutural da cromatina através de modificações histônicas

(metilação, acetilação, ubiquinação, sumoilação e fosforilação) (HOLOCH; MOAZED, 2015; FRÍAS-LASSERRE; VILLAGRA, 2017).

Entre os ncRNAs envolvidos em mecanismos epigenéticos, os microRNAs (miRNAs) estão entre os ncRNAs mais bem estudados e a regulação envolvendo miRNAs é a mais conhecida e interessante devido a sua participação na hereditariedade epigenética (GRANDJEAN et al., 2009; YUAN et al., 2015). Além disso, miRNAs estão envolvidos direta e indiretamente na resposta ao estresse térmico (FUKUOKA et al., 2014; NEHAMMER et al., 2015; SENGAR et al., 2018); bem como na maturação oocitária e desenvolvimento embrionário inicial (XIAO et al., 2014; GILCHRIST et al., 2016; HARFE, 2005; LIU et al., 2016); portanto, na próxima sessão serão descritas detalhadamente suas características e funções.

1.5 microRNAS

MicroRNAs (miRNAs) são moléculas de RNA curtas com aproximadamente 21 a 24 nucleotídeos e estão envolvidas centralmente no controle pós-transcricional da expressão gênica, através da inibição da tradução do mRNA (HA; KIM, 2014). Eles são codificados dentro dos genomas de plantas e animais, e estão localizados em diferentes regiões genômicas (MORAN et al., 2017). Estima-se que os miRNAs controlem ~50% de todos os genes codificadores de proteínas em mamíferos (KROL; LOEDIGE; FILIPOWICZ, 2010).

Os miRNAs efetuam o controle pós-transcricional da expressão gênica prejudicando a eficiência da tradução, através da interação com a região 3' não traduzida (3'UTR) das moléculas de mRNA alvo e comprometimento da sua estabilidade (BARTEL, 2004; BAGGA et al., 2005). Estima-se que eles são capazes de modular até 60% dos genes codificadores de proteínas no genoma humano no nível transcricional (FRIEDMAN et al., 2009). Atualmente, dados publicados no repositório miRCarta (<https://mircarta.cs.uni-saarland.de/>)- um banco de dados com miRNA e precursores - hospedam informações sobre

43.699 miRNAs e candidatos a miRNA, 364.647 genes-alvo com evidências experimentais e 11 milhões de genes-alvo previstos (KEHL et al., 2017).

miRNAs atuam como reguladores-chave de variados processos nos organismos eucariontes, tais como: proliferação celular, diferenciação, desenvolvimento embrionário, apoptose ou morte celular programada, comunicação celular, metabolismo, alinhamento cromossômica, oncogênese entre outros (SCHWARZ et al., 2003; O'DONNELL et al., 2005; CAI; CULLEN, 2006).

1.5.1 microRNAs como moduladores epigenéticos

miRNAs tem sido classificados como moduladores epigenéticos essenciais, uma vez que afetam os níveis de proteína dos mRNAs alvo sem modificar a sua sequência de DNA, reprimem enzimas chave envolvidas no processos epigenéticos, ligam-se a promotores de genes e recrutam complexos específicos de proteínas que modulam a conformação estrutural da cromatina e expressão gênica (WANG et al., 2017; MOUTINHO; ESTELLER, 2017) (Tabela 3). Devido à complexidade e importância das modificações epigenéticas inter-relacionadas com miRNAs, foi desenvolvido um repositório abrangente que armazena as regulações mútuas experimentalmente validadas entre modificações epigenéticas e miRNAs (DAI et al., 2014).

Tabela 3: Modulação epigenética mediada por miRNAs.

miRNA	Alvo	Papel do gene alvo	Fonte
Enzimas modificadoras de DNA			
miR - 148	DNMT1	Metilação do DNA	(DUURSMA et al., 2008)
miR - 152	DNMT1	Metilação do DNA	(DENIS; NDLOVU; FUKS, 2011)
miR- 301	DNMT1	Metilação do DNA	(IORIO; PIOVAN; CROCE, 2010)
miR- 126	DNMT1	Metilação do DNA	(DENIS; NDLOVU; FUKS, 2011)
miR-148	DNMT3B	Metilação do DNA	(DENIS; NDLOVU; FUKS, 2011)
mi- 29 (família)	DNMT3A / 3B	Metilação do DNA	(ZHU et al., 2017)
miR- 132, miR-638,	MeCP2	Liga-se ao DNA metilado e regula a expressão gênica	(ZHAO et al., 2017)
miR-93	Msk2	fosforilação da histona H3 Ser10 (H3S10P)	(BADAL et al., 2016)
miR-21 miR-148a	DNMT1	Metilação do DNA	(PAN et al., 2010)
miR-377	DNMT1	Metilação do DNA	(XIE et al., 2017)
Fatores de transcrição			
miR- 29b	Sp1	Regula a transcrição de DNMT1	(GARZON et al., 2009)
miR- 290 cluster	Rbl2	Repressor da transcrição de DNMTs	(BENETTI et al., 2008)
miR- K12- 4- 5p	Rbl2	Repressor da transcrição de DNMTs	(IORIO; PIOVAN; CROCE, 2010)
Remodeladores de Cromatina			
miR- 29b / c	YY1	Recruta PCR2 e HDAC para o locus específico do genoma	(OKAZAKI et al., 2002) (SATO et al., 2011)
miR-26a, miR-101, miR- 205, miR- 214	EZH2 (pertence ao complexo PRC1)	PCR1 catalisa a ubiquitinação da histona H2A, coopera com o PRC2	(SATO et al., 2011)
miR-128, miR-203	Bim1 (pertence ao complexo PRC2)	PCR2 facilita a metilação de histonas	(SATO et al., 2011)
Enzimas modificadoras de histonas			
miR-449a	HDAC1	Desacetilação da histona	(LIU et al., 2015)
miR-1, miR-140	HDAC4	Desacetilação da histona	(KREUZ; FISCHLE, 2016)
miR-675	HDACs 4, 5, 6	Desacetilação da histona	(HUANG et al., 2016)
miR-145-3p	HDAC4	Desacetilação da histona	(WU et al., 2018a)

Fonte: SADAKIERSKA-CHUDY;FILIP, 2014 p.190 (adaptado)

Em mamíferos foi relatado que miRNAs podem dirigir a associação da proteína de interferência de RNA (RNAi) Argonaute-1 (AGO1), componente Polycomb (PcG) EZH2 e tri-metil histona H3 lisina 27 (H3K27me3) com o promotor POLR3D, levando à heterocromatinização e ao silenciamento gênico transcricional (KIM et al., 2008). O miR-93 também foi relatado como tendo um papel central na reorganização da cromatina pela modulação de seu alvo MSK2 (uma histona quinase responsável pela fosforilação da histona H3 Ser10 (H3S10P) (BADAL et al., 2016). Outros trabalhos sugerem a regulação epigenética de miRNAs visando 3'UTR de metiltransferases (DNMT1, DNMT3a e DNMT3b) (PAN et al., 2010; XIE et al., 2017; ZHU et al., 2017) e histonas desacetilasse (HDACs) (LIU et al., 2015; HUANG et al., 2016; WU et al., 2018a).

Demais estudos, atribuem a regulação epigenética mediada por miRNAs à sua capacidade de induzir ou reprimir a expressão de genes específicos, reconhecendo locais-alvo nas regiões promotoras. O promotor da ciclina B1 (CCNB1) por exemplo, contém locais altamente complementares à sequencias de miRNAs, estes podem induzir a expressão de CCNB1 através do recrutamento maior de RNA Polimerase II e maior trimetilação da histona H3 lisina 4 (H3K4me3) (HUANG et al., 2012). Recentemente, Xiao et al. (2017), mostraram que miRNAs funcionam como intensificadores da expressão gênica, através da ativação da expressão de RNA potencializador, por modificação nos padrões de metilação e acetilação das histonas. Outros trabalhos sugerem que miRNAs podem participar da regulação epigenética através do controle pós-transcricional da expressão gênica, reprimindo a expressão de proteínas importantes na via de regulação epigenética (ZHANG et al., 2016).

Paradoxalmente, miRNAs podem ser alvo de modificações epigenéticas que modulam seus níveis de transcrição. Tem sido relatado que modificações nas histonas e metilação do DNA desempenham papéis significativos no controle da expressão de miRNAs. Morales, Monzo e Navarro (2017), listaram todos os miRNAs cuja expressão é regulada por acetilação ou metilação da lisina, com base nas informações do EpimiR.

MiRNAs também podem ser regulados por níveis alterados de modificações epigenéticas dos genes relacionados à biogênese de miRNA.

Kitagawa et al. (2013) detectaram que a trimetilação da histona H3 lisina 27 nos promotores de DGCR8, Piwil4, P68, P72, Dicer, Ago3 e Ago4 poderia inibir a expressão desses genes e comprometer a biogênese de miRNAs.

Curiosamente, existe uma complicada rede de interconexões recíprocas entre miRNAs e outras maquinarias epigenéticas. Por um lado, a expressão do miRNA pode ser regulada por mecanismos epigenéticos, incluindo metilação do DNA e modificações das histonas, por outro lado os miRNAs podem afetar o mecanismo epigenético direcionando seus componentes enzimáticos estabelecendo regulamentos de *feedback* (WANG et al., 2017). Adicionalmente, uma grande proporção de genes de miRNA está localizada em ilhas CpG, portanto genes de miRNA podem ser silenciados seguindo diferentes padrões de metilação do DNA que, na maioria dos casos, envolvem ilhas CpG localizadas nas regiões promotoras (MORALES; MONZO; NAVARRO, 2017).

1.5.2 Biogênese de microRNAs

A biogênese dos miRNAs ocorre por meio de um processo de várias etapas que requer uma fase nuclear e uma fase citoplasmática. Inicialmente os miRNAs são transcritos em sequências denominadas transcritos primários (pri-miRNA). Os pri-miRNAs contêm uma haste de cadeia dupla com cerca de 30 pares de bases, um laço terminal e duas caudas flanqueadoras de cadeia simples não estruturadas. Essa etapa inicial de transcrição é realizada pela RNA polimerase II (LEE; AMBROS, 2001). Algumas evidências sugerem que miRNAs possam ser transcritos por uma RNA polimerase III (BORCHERT; LANIER; DAVIDSON, 2006).

Após serem transcritos, os pri-miRNAs são processados pela RNase III, chamada Drosha e uma proteína denominada DGCR8/Pasha (ZENG; CULLEN, 2004; GREGORY; SHIEKHATTAR, 2005). Como resultado desse processamento, obtém-se precursores dupla fita de aproximadamente 70 nucleotídeos, com forma de grampo, chamados pré-microRNAs. Estes, são

exportados para o citoplasma através da proteína Exportina 5-Ran-GTP (LEE; AMBROS, 2001).

No citoplasma, a proteína Dicer1 cliva o pré-miRNA em uma molécula dupla-fita com aproximadamente 20 pares de base (ZENG; YI; CULLEN, 2005; CHABLE-BESSIA et al., 2009). O miRNA maduro é incorporado ao RISC (do inglês – *RNA Induced Silencing Complex*) (LEE; AMBROS, 2001).

O RISC é um complexo citoplasmático constituído por miRNA e algumas proteínas como Dicer, TRBP, PACT e Argonata (Ago) (SHUKLA; SINGH; BARIK, 2011). Essas proteínas são responsáveis por promoverem o desenovelamento do miRNA dúplice e romper as pontes de hidrogênio que mantêm as duas fitas do duplex unidas. Assim, somente uma das fitas do é incorporada ao RISC, enquanto a outra fita é degradada (GREGORY; SHIEKHATTAR, 2005). Não está claro como ocorre a seleção de qual fita será incorporada ao complexo RISC e qual será degradada (revisado por CHEKULAEVA; FILIPOWICZ, 2009; FABIAN; SONENBERG; FILIPOWICZ, 2010). No entanto, sugere-se que a fita que servirá como miRNA maduro é aquela cuja extremidade 5' possui menor estabilidade termodinâmica. Dessa forma, o miRNA maduro incorporado ao RISC poderá conduzir o complexo proteico ao mRNA complementar para promover a repressão da expressão gênica (SHUKLA; SINGH; BARIK, 2011) (Figura 3).

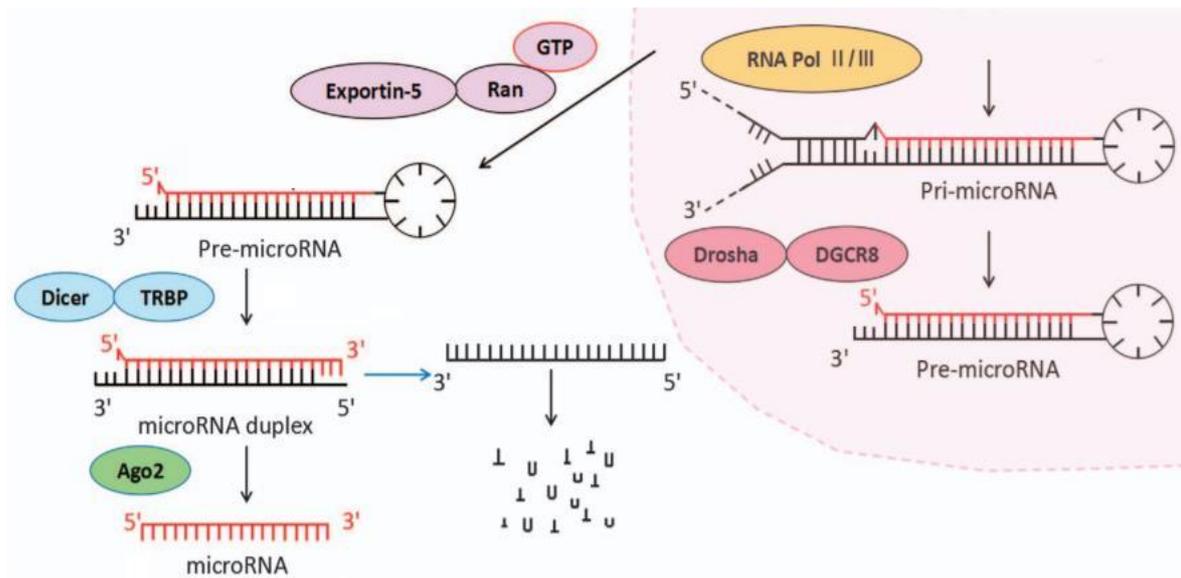


Figura 3: Biogênese miRNAs. A biogênese dos miRNAs inclui a produção do transcrito primário (pri-miRNA) pela RNA polimerase II ou III e a clivagem do pri-miRNA pelo complexo microprocessador Drosha-DGCR8 (Pasha) no núcleo. Em seguida, o precursor do miRNA (pré-miRNA) é exportado do núcleo por Exportin-5-Ran-GTP. No citoplasma, a RNase Dicer em complexo com a proteína de ligação de RNA de cadeia dupla TRBP cliva o hairpin pré-miRNA ao seu comprimento maduro. O filamento funcional do miRNA maduro é carregado junto com proteínas Argonaute (Ago2) no complexo silenciador induzido por RNA (RISC), onde ele guia o RISC para silenciar mRNAs alvo através de clivagem de mRNA, repressão traducional ou deadenilação, enquanto a fita complementar do duplex é degradada. Fonte: WU et al., 2018b p. 3.

1.5.3 Repressão traducional mediada por miRNA

Após sua incorporação no complexo RISC, os miRNAs ligam-se 3' UTR de seus mRNAs alvo através do emparelhamento perfeito ou imperfeito de bases nitrogenadas. Essa região é geralmente denominada Elemento de Reconhecimento de miRNA ou MRE (Figura 4). Como principal requisito de complementariedade é necessário que haja o emparelhamento de aproximadamente 6–8 nucleotídeos da extremidade 5' do miRNA com o mRNA alvo. Essa pequena sequência complementar do miRNA é referida como “semente”, e geralmente considerada necessária e suficiente para a formação funcional de RISC (SHUKLA; SINGH; BARIK, 2011).

Após a formação funcional do complexo miRISC, os mecanismos através dos quais os miRNAs realizam a regulação da expressão do mRNA ainda não são bem compreendidos. Jonas; Izaurralde (2015), revisaram

detalhadamente os principais processos envolvidos no controle pós-transcricional mediado por miRNAs, entre eles destacam-se a repressão traducional e desestabilização de mRNA e a degradação do mRNA alvo iniciada por deadenilação, que é seguida pela remoção do cap 5'.

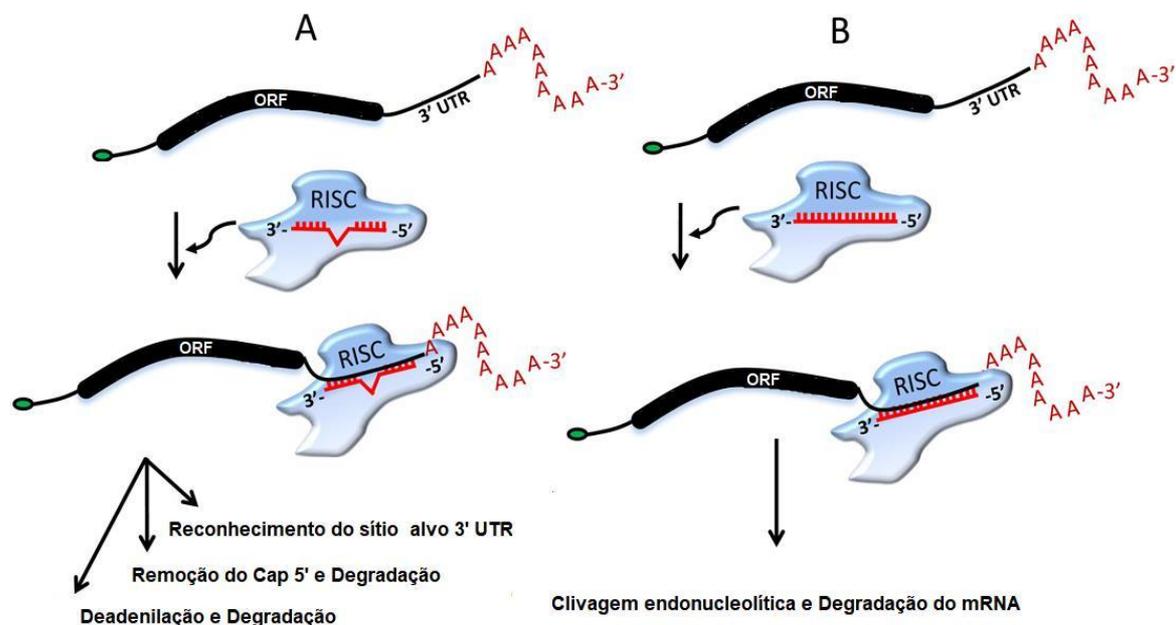


Figura 4: Complementariedade dos miRNAs. Os miRNAs podem emparelhar-se de 2 formas à 3' UTR do mRNA alvo (A) complementariedade imperfeita ou (B) complementariedade perfeita. Fonte: SHUKLA; SINGH; BARIK, 2011 p. 13.

1.5.4 microRNAs e o desenvolvimento de oócitos e embriões

A expressão de miRNA é dinamicamente regulada durante a maturação oocitária e no início do desenvolvimento embrionário. Estudos revelaram a presença de microRNAs em oócitos de mamíferos durante seu crescimento e maturação (TAM et al., 2008; ABD EL NABY et al., 2013). A presença e expressão espaço-temporal de miRNAs e genes de maquinaria de processamento de miRNA em oócitos e embriões pré-implantacionais evidenciaram o envolvimento de miRNAs no crescimento e maturação de oócitos, desenvolvimento embrionário precoce, diferenciação e implantação de linhagem de células-tronco embrionárias (HOSSAIN et al., 2012; ASSOU et al., 2013).

Recentemente, a caracterização de miRNAs identificados em células embrionárias ilustrou o papel crítico de miRNAs no desenvolvimento inicial (GILCHRIST et al., 2016; GROSS; KROPP; KHATIB, 2017; SINHA et al., 2017). Experimentos realizados com a eliminação das enzimas Dicer e DGCR8, as quais são fundamentais na biogênese de miRNA (KROL; LOEDIGE; FILIPOWICZ, 2010), demonstraram os efeitos severos da ausência de miRNAs durante o desenvolvimento de embriões em *Zebrafish*, ratos e camundongos (WIENHOLDS et al., 2003; WANG et al., 2007).

Um estudo de 2014 descreveu o perfil de miRNAs de diferentes populações de folículos em bovinos e encontrou muitos miRNAs que foram diferencialmente expressos entre folículos saudáveis pequenos e grandes, além de muitos miRNAs diferencialmente expressos entre grandes folículos atresícos e grandes folículos saudáveis (SONTAKKE et al., 2014). Em estudos focados em miRNAs específicos no desenvolvimento folicular, foi demonstrado que em camundongos, o miR-376a regula a montagem do folículo primordial e, quando superexpresso, aumenta o número de folículos primordiais e reduz a apoptose oocitária (ZHANG et al., 2014a). Nos oócitos de *Xenopus*, a presença do miR-16 ligado à AGO2 e à FXR1 (proteína 1 relacionada à síndrome de retardo mental do X frágil) aumenta a tradução do MYT1 para manter a parada meiótica quando o oócito está dentro do folículo (TRUESDALL et al., 2012).

Em suínos foi identificado um conjunto de miRNAs diferencialmente expressos em oócitos e embriões precoces. Tanto em células do *cumulus* como nos oócitos, a expressão do miR-574 diminuiu significativamente após a MIV, enquanto a expressão do miR-21 aumentou, sugerindo um importante papel do controle dinâmico da expressão de miRNAs neste período (YANG et al., 2012). Recentemente, foi mostrado que o miR-574 impacta negativamente a qualidade do oócito suíno suprimindo sua maturação (PAN; TOMS; LI, 2017).

Abd El Naby et al. (2013) identificaram diferenças na expressão de miRNA entre oócitos bovinos imaturos e maduros, bem como nas células do *cumulus*. Este estudo identificou a presença de conjuntos distintos de miRNAs em oócitos ou células do *cumulus* e a presença de sua degradação dinâmica durante a maturação do oócito bovino (ABD EL NABY et al., 2013).

Na fertilização, o papel biológico dos miRNA não é bem estabelecido. Estudos de *microarray* identificaram mais de 400 miRNAs em embriões bovinos, e alguns que são pensados para degradar mRNA durante eventos a ativação do genoma embrionário (TESFAYE et al., 2009; TRIPURANI et al., 2010; MONDOU et al., 2012). Esses estudos mostram que o miR-10 e o miR-424 passam por níveis crescentes de expressão desde o estágio da vesícula germinativa até 16 células, quando os níveis diminuem (TRIPURANI et al., 2010). Da mesma forma, miR-21 e miR-130a mostram pico de expressão no estágio de 8 células (MONDOU et al., 2012). Outro estudo comparando perfis de miRNA em embriões de PIV, embriões clonados e células somáticas usados nos procedimentos de clonagem mostrou que, embora houvesse alguns miRNAs comuns entre os três grupos, diferenças nesses perfis sugerem que miRNAs tem diferentes papéis temporais em embriões bovinos (CASTRO et al., 2010).

Em resumo, a maturação do oócito e a embriogênese inicial são estágios importantes de desenvolvimento, com muitos processos complexos ocorrendo que ajudam a garantir o desenvolvimento bem-sucedido. A capacidade de um oócito se submeter a eventos de maturação e desenvolver competência para a fertilização é crucial para os estágios de desenvolvimento subsequentes.

1.5.5 microRNAs e estresse térmico

Foi demonstrado que miRNAs desempenham papéis críticos na regulação de redes de genes em resposta a estresses celulares (revisado por LEUNG; SHARP, 2010). Observou-se que o estresse celular afeta o mecanismo de silenciamento de miRNAs, sugerindo que estes estão envolvidos na mediação das mudanças na expressão gênica que são necessárias para a sobrevivência (BABAR; SLACK; WEIDHAAS, 2008; DETZER et al., 2011).

Além disso, os miRNAs estão envolvidos na resposta ao estresse térmico em diversos organismos, como: *Caenorhabditis elegans* (NEHAMMER

et al., 2015), organismos marinhos (BIZUAYEHU et al., 2015), em mamíferos (ISLAM et al., 2013; PLACE; NOONAN, 2014) e em plantas (ZHAO et al., 2016). Em corais, um miRNA foi identificado como termicamente responsivo regulando, de forma putativa, múltiplas vias da resposta ao estresse, expressão de DNA/RNA, mecanismos de reparo, morfogênese tecidual e sinalização (GAJIGAN; CONACO, 2017).

Em bovinos, a expressão diferencial de miRNAs foi altamente associada ao estresse térmico. A regulação negativa do miR-181a mostrou reduzir o dano causado pelo estresse térmico nas células mononucleares do sangue periférico de vacas holandesas (CHEN et al., 2016). Em glândula mamária bovina foram identificados 27 miRNAs diferencialmente expressos no estresse por calor (LI et al., 2018). A Identificação e análise de bioinformática de microRNAs associados a estresse térmico no soro de vacas Holandesas identificou 52 miRNAs expressos diferencialmente e a análise funcional dos alvos gênicos revelou que vários genes alvo dos miRNAs diferencialmente expressos estão envolvidos na resposta ao estresse e estresse oxidativo, como TP53, PLA2R1, PYCR1, PRKRA, PP1R15A, HSPB8, HPSH1, HSPBAP1 e HSPCB (ZHENG et al., 2014). Dados semelhantes foram encontrados por Sengar et al. (2018) em bovinos leiteiros mestiços. O miR-1246 mostrou desempenhar um importante papel como regulador da apoptose em células pulmonares bovinas durante o estresse térmico (HU et al., 2018).

2 HIPÓTESE

O choque térmico durante a maturação *in vitro* altera a expressão gênica de microRNAs em oócitos bovinos e nos embriões derivados, contribuindo para reduzir a eficiência da maturação oocitária e do desenvolvimento embrionário inicial.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral:

Avaliar o efeito do choque térmico durante a maturação *in vitro* na expressão de microRNAs e genes envolvidos no bioprocessamento de microRNAs em oócitos e embriões, na maturação oocitária e na competência de desenvolvimento embrionário no período pré-implantacional em bovinos.

3.2 Específicos:

- Investigar o efeito do choque térmico durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos, na progressão da meiose, desenvolvimento embrionário e índices apoptóticos;
- Identificar genes de referência para estudo da expressão de microRNAs em oócitos e embriões bovinos em estágio oito células;
- Avaliar a expressão de microRNAs e de genes envolvidos no bioprocessamento de microRNAs (Drosha e Dicer1) em oócitos bovinos submetidos ao choque térmico durante a maturação *in vitro*;
- Avaliar a expressão de microRNAs e de genes envolvidos no bioprocessamento de microRNAs (Drosha e Dicer1) em embriões em estágio oito células, oriundos de oócitos submetidos a choque térmico durante a maturação *in vitro*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal e no Laboratório de Genética Molecular Dr. Mário Luiz Martinez da Embrapa Gado de Leite, localizados em Juiz de Fora, Minas Gerais (MG).

4.1 Delineamento experimental

O presente trabalho foi dividido em duas etapas. Em todos os experimentos os oócitos foram submetidos a choque térmico (41°C) nas primeiras 12 horas de maturação *in vitro* (MIV) seguido de 12 horas a 38,8°C para completar as 24 horas de maturação. Um grupo controle foi maturado por 24 horas a 38,8°C. O delineamento experimental está demonstrado na Figura 5.

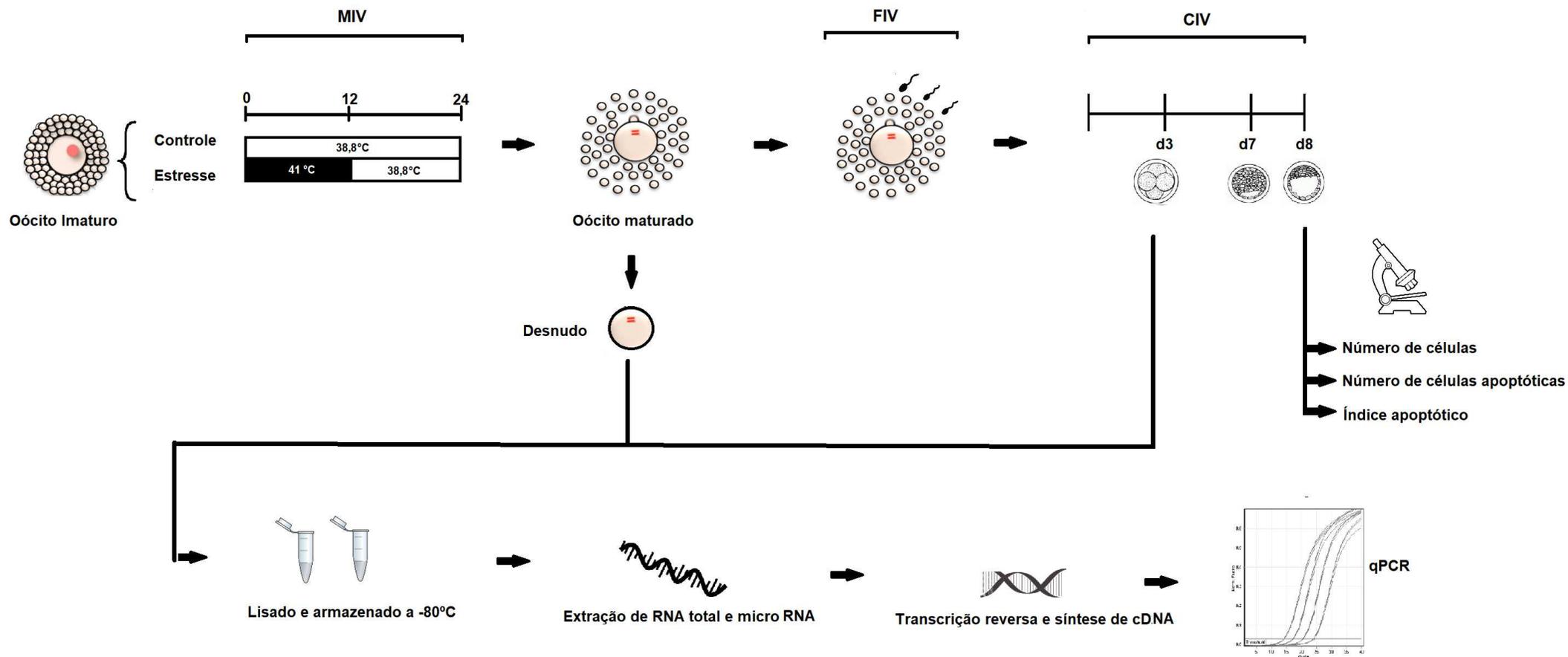


Figura 5: Delineamento experimental. Etapa 1: Complexos *Cumulus* oócitos (CCOs) imaturos foram submetidos ou não ao choque térmico durante a maturação *in vitro* (MIV). Após a maturação foram fertilizados *in vitro* (FIV) e possíveis zigotos cultivados até o D8. Etapa 2: CCOs maturados estressados e não estressados e embriões em D3 - obtidos a partir de oócitos estressados e não estressados – tiveram seu RNA total extraído para quantificação dos transcritos por PCR em tempo real.

4.2 Obtenção e maturação *in vitro* dos oócitos

Ovários provenientes predominantemente de vacas mestiças (Holandês x Gir) foram obtidos em frigorífico local (Fripai Distribuidora de Carnes Ltda, Juiz de Fora, MG, Brasil) logo após o abate e transportados ao laboratório em solução salina (NaCl a 0,9%) acrescida de antibiótico (0,1 gL⁻¹ de estreptomicina) à temperatura de 35° C.

No laboratório os ovários foram lavados e colocados em banho-maria (35°C). Foram aspirados folículos visíveis com diâmetro de 2 a 8 mm com auxílio de seringa descartável de 10 mL e agulha 25x8 mm e o conteúdo aspirado foi depositado em cálice cônico. Após 15 minutos de decantação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado em meio TALP-Hepes e vertido em placa de Petri descartável de 100x20 mm. Foram selecionados os CCOs que apresentaram citoplasma homogêneo com no mínimo três camadas compactas de células. Os CCOs selecionados foram lavados duas vezes em meio TALP-Hepes e uma vez em meio de maturação *in vitro* (TCM199) suplementado com 20 µg/mL de hormônio folículo estimulante (FSH; Pluset, Calier, Barcelona, Spain), 0,36 mM de piruvato, 50 mg/mL de penicilina/estreptomicina e soro fetal bovino.

Grupos de 30-40 CCOs foram distribuídos aleatoriamente em poços de placas de cultivo tipo Nunc contendo 400 µL de meio TCM 199 suplementado com 20 µg/mL de hormônio folículo estimulante (FSH; Pluset, Calier, Barcelona, Spain), 0,36 mM de piruvato, 50 mg/mL de penicilina/estreptomicina e soro fetal bovino, e maturados *in vitro* em incubadora com 5% de CO₂ em atmosfera com umidade saturada à 38,8°C por 24 horas.

4.3 Choque térmico em oócitos

Os CCOs imaturos selecionados foram lavados duas vezes em meio TALP-Hepes e uma vez em meio de MIV (TCM199) suplementado com 20 µg/mL FSH (Pluset, Calier, Barcelona, Spain), 0,36 mM de piruvato, 50 mg/mL de

penicilina/estreptomicina e soro fetal bovino. Em seguida foram transferidos para placa de cultivo do tipo Nunc, em poços contendo 400 μL de meio TCM199 de maturação, contendo 30-40 oócitos por poço e levados para incubadora com umidade saturada e temperatura a 41°C durante as primeiras 12 horas. A porcentagem de CO_2 foi ajustada para 7%, a fim de garantir que a concentração de CO_2 dissolvido e PH do meio fossem semelhantes entre os tratamentos (ROTH; HANSEN, 2005).

O período de 12 horas e a temperatura de 41°C foram escolhidos porque nessas condições, observou-se alterações na competência oocitária para o desenvolvimento embrionário (ROTH; HANSEN, 2005; PAYTON et al., 2011; PAVANI et al., 2016). Além disso, a temperatura de 41°C imita a temperatura retal das vacas durante as estações quentes, que variam de 39,1°C a 42°C (EALY; DROST; HANSEN, 1993).

Em seguida, a placa contendo os CCOs foi transferida para incubadora a 38,8°C, 5% de CO_2 e umidade saturada para cultivo por mais 12 horas, completando as 24 horas de MIV.

4.4 Avaliação da taxa de maturação nuclear

Após a maturação, os CCOs de cada grupo (controle e estressado) tiveram suas células do *cumulus* removidas com 1% de hialuronidase (Sigma), em meio TALP-Hepes, por agitação em vórtex durante 5 minutos. Posteriormente, foram lavados em solução de PBS 0,1% de PVA três vezes e fixados por 30 minutos em paraformaldeído 4%. Após a fixação, os oócitos foram lavados novamente em solução 0,1% de PVA. Os oócitos foram incubados por 10 minutos em solução corante [5 mL de PBS com PVA + 25 μL de Hoechst 33342 estoque (1mg/mL)] à temperatura ambiente no escuro. Após esse procedimento, cada tratamento foi lavado três vezes em solução de PVA e os oócitos transferidos para solução de montagem (6,25 mL PBS com PVA + 6,25 mL de Glicerol + 6,25 μL Hoechst 33342). A partir daí, foram colocados sobre lâmina de vidro cobertos com lamínula. A taxa de maturação foi avaliada

em aumento de 400x em microscopia de fluorescência. No total, três repetições por tratamento foram realizadas.

4.5 Fecundação *in vitro* (FIV)

Após a maturação, os oócitos foram submetidos a fecundação *in vitro* (FIV). Na FIV utilizou-se sêmen de um único touro afim de reduzir o efeito individual de touros sobre a fecundação e clivagem. As doses foram obtidas de centrais comerciais. O sêmen foi previamente avaliado quanto a sua motilidade e vigor antes de ser utilizado para a FIV. Somente doses com motilidade igual ou superior a 50% e vigor 3,0 foram utilizadas. As partidas de sêmen também foram avaliadas previamente quanto ao seu potencial de induzir a clivagem em oócitos. As doses foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos. A lavagem do sêmen e a separação dos espermatozoides de maior motilidade foram realizadas por diferença de gradiente utilizando o método de Mini-Percoll. Os CCOs maturados foram lavados uma vez em meio Fert-Talp e transferidos para gotas de fecundação de 100 µL contendo o sêmen diluído, com concentração ajustada de forma a se obter dose fecundante de 2×10^6 espermatozoides/mL. A FIV foi realizada por 19-20 horas em estufa incubadora com 5% de CO₂.

4.6 Cultivo *in vitro* (CIV)

Após a FIV, os possíveis zigotos foram desnudados em solução de PBS acrescido de hialuronidase a 1%. Os zigotos desnudos obtidos por FIV foram cultivados em poços com 400 µL de meio CR2aa, suplementado com 2,5% de soro fetal bovino (SFB), em incubadora com 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ e umidade saturada por oito dias, em uma concentração de 20-30 estruturas por poço.

4.7 Avaliação da taxa de clivagem e desenvolvimento embrionário

A avaliação da taxa de clivagem foi realizada no terceiro dia (D3) após a fecundação. A taxa de produção de blastocistos foi avaliada no sétimo (D7) e oitavo (D8) dia do cultivo.

4.8 Avaliação do índice apoptótico dos embriões

Os blastocistos expandidos (N=50) no oitavo dia de diferentes repetições foram submetidos a coloração com marcador final de dUTP-digoxigenina mediada por desoxinucleotidil transferase (TUNEL) utilizando um kit comercialmente disponível (Dead End Fluorimetric TUNEL System; Promega, Madison, WI, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

Resumidamente, os embriões foram fixados em 4% de paraformaldeído a 4°C e depois permeabilizados com Triton X-100 a 0,2% (Promega), ambos em PBS. Embriões de controle positivo foram previamente tratados com DNase (Promega). Após a permeabilização, as amostras de controle positivo e alvo foram incubadas em gotas de 100 µl com mistura de reagente contendo a solução enzimática (enzima terminal desoxinucleotídeo transferase) e solução de coloração a 90% (conjugado de fluoresceína dUTP) por 1 hora a 37°C em câmara úmida escura. Os embriões de controle negativo foram incubados apenas na solução de coloração sem solução enzimática. Em seguida, os embriões foram corados com Vectashield (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EUA) e 406-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e montados em lâminas para avaliação por Microscópio Fluorescente. Número total de células e número de células apoptóticas por embrião foram contados, e índice de células apoptóticas foi calculado como a proporção de células apoptóticas/número total de células.

4.9 Extração de RNA total e síntese de DNA complementar (cDNA)

O RNA total de oócitos maturados estressados e não estressados, e embriões no estágio de oito células obtidos a partir da fertilização de oócitos estressados e não estressado, foi extraído utilizando o kit comercial miRNeasy Micro Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. O protocolo utilizado foi o recomendado para a purificação de RNA total, incluindo miRNA, de células de animais, com a etapa adicional de incubação com DNase (Qiagen). O RNA foi eluído em 15 μ L de água livre de RNase.

A quantificação do RNA para cada amostra foi realizada utilizando 1 μ L de amostra em espectrofotômetro nd-100 (Nanodrop, Wilmington, DE, EUA) (Tabela 4).

As amostras de RNA foram transcritas reversamente utilizando o kit comercial miScript II RT (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, uma mistura de reação de 4 μ L de 5X miScript HiFlex Buffer, 2 μ L de miScript Nucleics Mix, e 2 μ L de miScript Transcriptase Reversa Mix foi preparada em tubos 0,2 mL de PCR isentos de RNase em gelo. Foram adicionados 12 μ L de RNA molde para levar o volume final a 20 μ L. Após uma breve centrifugação, os componentes da reação de transcrição reversa foram incubados durante 60 minutos a 37°C e durante 5 minutos a 95°C. A mistura reacional foi armazenada a -20°C até posterior utilização.

Tabela 4: Quantificação de RNA total obtido a partir do pool de 80 oócitos e pool de 15 embriões em cada repetição, por tratamento.

Tratamentos	Quantificação do RNA
Oócitos	
Controle (Repetição 1)	10,52 ng/ μ L
Choque térmico (Repetição 1)	9,84 ng/ μ L
Controle (Repetição 2)	10,58 ng/ μ L
Choque térmico (Repetição 2)	9,98 ng/ μ L
Controle (Repetição 3)	9,6 ng/ μ L
Choque térmico (Repetição 3)	9,4 ng/ μ L
Embriões	
Controle (Repetição 1)	11,73 ng/ μ L
Choque térmico (Repetição 1)	11,60 ng/ μ L
Controle (Repetição 2)	12,77 ng/ μ L
Choque térmico (Repetição 2)	12,84 ng/ μ L
Controle (Repetição 3)	9,95 ng/ μ L
Choque térmico (Repetição 3)	13,70 ng/ μ L

4.10 Seleção de genes e design de primers

Os miRNAs examinados neste estudo foram selecionados por estarem envolvidos na maturação oocitária e desenvolvimento embrionário em bovinos, e na resposta ao estresse em bovinos e outras espécies. Avaliamos também a expressão de relacionados com o bioprocessamento de miRNAs, Drosha e Dicer1 (Tabela 6).

YWHAZ e β -actina foram selecionados como genes para a normalização dos dados de expressão de mRNAs por terem sido previamente descritos como bons normalizadores em oócitos e embriões bovinos (Tabela 5).

Tabela 5: Genes, função e referências bibliográficas.

Gene	Função	Referência bibliográfica
bta-miR-21-5p	Anti-apoptótico; contribui para a hipometilação de DNA direcionando DNMT1; abundantemente expresso em oócitos maturados.	(PAN et al., 2010) (WRIGHT et al., 2016) (GILCHRIST et al., 2016)
bta-miR-148a	Contribui para a hipometilação de DNA direcionando DNMT1; altamente abundante nos oócitos em todos os estágios de maturação.	(PAN et al., 2010) (GILCHRIST et al., 2016)
bta-miR-34c	Expresso de forma estável em oócitos imaturos e maturados; fator pró-apoptótico e anti-proliferativo; regulados epigeneticamente por alterações nos padrões de metilação.	(TESFAYE et al., 2009) (TSCHERNER et al., 2014) (XU et al., 2017) (ZHANG et al., 2014b)
bta-miR-106a	Abundantemente expresso em oócitos e células do <i>cumulus</i> bovinos; envolvido na maturação adequada do oócito controlando a atividade mitótica e a meiótica através da regulação da expressão WEE1A.	(MILES et al., 2012)
bta-miR-103	Envolvido na resposta ao estresse térmico em bovinos leiteiros mestiços.	(SENGAR et al., 2018)
bta-miR-20a	Envolvido na maturação oocitária; regulação da proliferação, diferenciação e síntese de progesterona em oócitos bovinos.	(ANDREAS et al., 2016)
bta-miR-27b	Envolvido na resposta ao estresse térmico no intestino delgado de ratos e no soro de vacas Holandesas	(YU et al., 2011) (ZHENG et al., 2014)
bta-miR- 19b; bta-miR-1246	Associado a resposta ao estresse térmico no soro de vacas Holandesas.	(ZHENG et al., 2014)
bta-miR-let-7a-5p	Envolvido na proliferação celular e apoptose.	(TANG et al., 2016)
Drosha; Dicer1	Biogênese de miRNA.	(HA; KIM, 2014)
YWHAZ; β -actina	Controle endógeno.	(BETTEGOWDA et al., 2006; GENDELMAN; ROTH, 2012)

Os primers para miRNAs foram projetados usando sequências disponíveis no banco de dados miRBase (GRIFFITHS-JONES, 2006; GRIFFITHS-JONES et al., 2008; KOZOMARA; GRIFFITHS-JONES, 2011, 2014), versão 22 (<http://www.mirbase.org/>). As sequências dos primers Drosha e Dicer foram obtidas a partir da referência de Mondou et al. (2012), Miles et al. (2012) respectivamente. Os primers utilizados para avaliar a expressão dos genes de controle endógeno YWHAZ e β -actina, foram desenhados utilizando o software Primer3 a partir de sequências obtidas do banco de dados do GeneBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Os miRNAs maduros, genes alvo,

sequências e números de acessos estudados neste experimento estão listados na Tabela 6.

A eficiência dos primers para cada reação foi determinada pelo software LinRegPCR® (RAMAKERS et al., 2003) e considerada no cálculo da quantificação relativa. A análise dos resultados do PCR quantitativo foi realizada utilizando o software REST® (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002) utilizando-se o método do CT comparativo, com os resultados expressos em relação a genes de referência endógena e um grupo calibrador (grupo controle). Como grupo calibrador foi utilizado o sistema de maturação controle (maturação dos CCOs por 24 horas em temperatura de 38,8°C). Os produtos amplificados foram analisados também em gel de agarose à 3%, para a verificação dos tamanhos dos fragmentos e validação dos resultados obtidos pela PCR em tempo real.

Tabela 6: Sequências de primers usadas para análise de expressão gênica relativa por reação em cadeia da polimerase em tempo real de oócitos expostos ou não a choque térmico.

Gene	Sequência (5' - 3')	Tamanho do microRNA/ tamanho do fragmento (pb)	Número de Acesso / Referência
bta-let-7a-5p	TGAGGTAGTAGGTTGTATAG	20	MIMAT0003844
bta-miR-20a	TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG	23	MIMAT0003527
bta-miR-19b	TGTGCAAATCCATGCAAACTG	22	MIMAT0004337
bta-miR-1246	GGAATGGATTTTTGGAGCAGG	21	MIMAT0024567
bta-miR-27b	CGGCTTCACAGTGGCTAAGTTCT	23	MIMAT0003546
bta-miR-21-5p	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGACU	24	MIMAT0003528
bta-miR-148a	UCAGUGCACUACAGAACUUUGU	22	MIMAT0003522
bta-miR-34c	AGGCAGUGUAGUUAGCUGAUUG	22	MIMAT0003854
bta-miR-106a	AAAAGUGCUUACAGUGCAGGUA	22	MIMAT0003784
bta-miR-103	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA	23	MIMAT0003521
Drosha	F- AACTGTGACTGCTGCCATTGA R- GGGAATAGACACATTTATCCAAGTGA	201	(MONDOU et al., 2012)
Dicer1	F- GTGGCTCTCATTTGCTGTGA R- CGTTTTGTGGAACCTGGTCT	155	(MILES et al., 2012)
β -actina	F- AAGGCCAACCGTGAGAAGAT R- CCAGAGGCATACAGGGACAG	101	NM_173979.3
YWHAZ	F- GCAAAAGACGGAAGGTGCTG R- CCTCAGCCAAGTAGCGGTAG	197	NM_174814.2

4.11 Análise quantitativa da expressão gênica por PCR em tempo real

A amplificação para quantificação relativa foi feita utilizando-se a metodologia de PCR em tempo real. As reações foram feitas utilizando-se kit comercial miScript SYBR Green (Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante (Tabela 7) em um volume final de 25 μ L. As reações foram incubadas a 95°C por 15 minutos, seguido de 40 ciclos de 94°C por 15 segundos, 55°C por 30 segundos em oócitos e 57°C por 30 segundos em embriões, e extensão a 70°C por 30 segundos. Após o término dos ciclos de reações, foram determinadas as curvas de dissociação de cada produto amplificado. Controles negativos foram preparados, em que o cDNA foi omitido durante a reação. Foram feitas reações em triplicata para cada amostra (de todos os grupos) das respectivas repetições em placas ópticas de reação de 96 poços (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), seladas com filme adesivo óptico e amplificadas no aparelho de PCR em tempo real (ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems, Applied Biosystems).

Tabela 7: Componentes da reação de PCR em tempo real.

Componentes	Volume (25 μ L)
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	12,5 μ L
10x miScript Universal Primer Primer Forward	2,5 μ L
Água livre de RNase	6,5 μ L
cDNA	1 μ L

4.11.1 Padronização da PCR em tempo real

A concentração final de RNA convertido em cDNA foi de 0,12 ng/ μ L para quantificação de miRNAs e de 0,08 ng/ μ L para quantificação de mRNAs, tanto para amostras de oócitos como para embriões. A concentração de primer foi de 0,5 μ M em todas as reações, exceto para o miRNA-27b em embriões, onde a

melhor concentração de primer foi 0,3 μ M. Os valores de eficiência para oócitos e embriões estão descritas na Tabela 8.

Tabela 8: Eficiência média da reação para cada gene utilizado para o estudo de expressão gênica em oócitos e embriões bovinos nas condições padronizadas da PCR em Tempo Real.

Gene	Eficiência da reação	
	Oócitos	Embriões
bta-let-7a-5p	1,89	1,91
bta-miR-20a	2,0	1,90
bta-miR-19b	1,88	1,85
bta-miR-1246	2,0	1,95
bta-miR-27b	2,0	1,85
bta-miR-21-5p	1,92	1,89
bta-miR-148a	1,91	1,91
bta-miR-34c	1,91	1,88
bta-miR-106a	1,93	1,88
bta-miR-103	1,89	1,83
Drosha	1,95	1,83
Dicer1	1,93	1,87
β -actina	1,97	1,87
YWHAZ	1,97	1,97

As análises das curvas de dissociação dos genes testados mostraram não haver picos referentes a dímeros de primers ou produtos inespecíficos. A ausência destes picos é uma das condições para os estudos de expressão quando se utiliza o corante SYBER® Green, já que este se liga a qualquer dupla fita de DNA podendo levar a uma alteração nos valores de expressão, e com isso, a um erro de interpretação. As curvas de dissociação dos genes utilizados podem ser observadas nas Figuras 6 a 10.

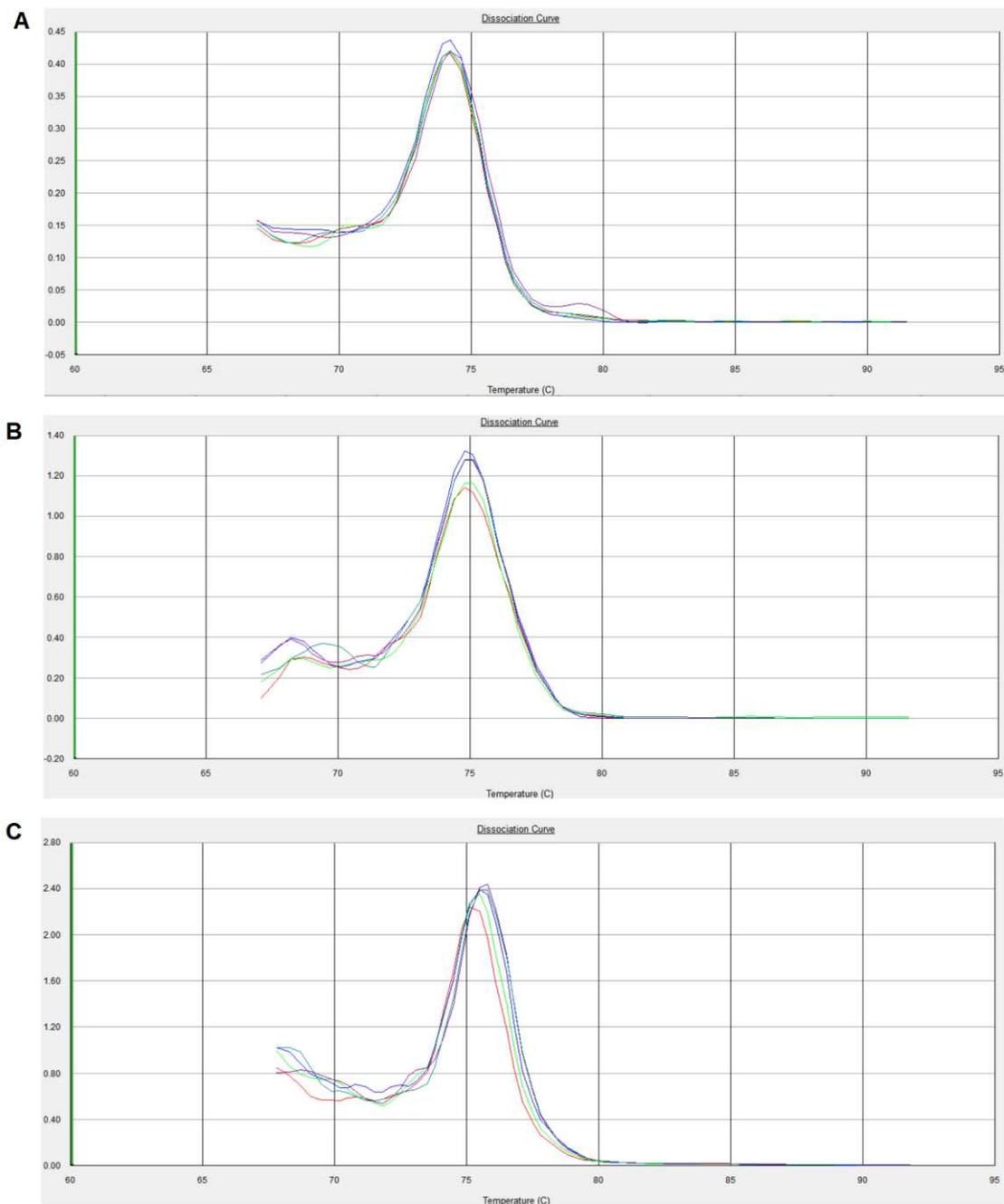


Figura 6: Curvas de dissociação dos microRNAs (A):bta-miR-let-7a-5p, (B) bta-miR-20a e (C) bta-miR-19b resultantes da PCR em Tempo Real, mostrando um único pico nas temperaturas de dissociação de 74,4°C, 75,1°C e 75,5°C respectivamente.

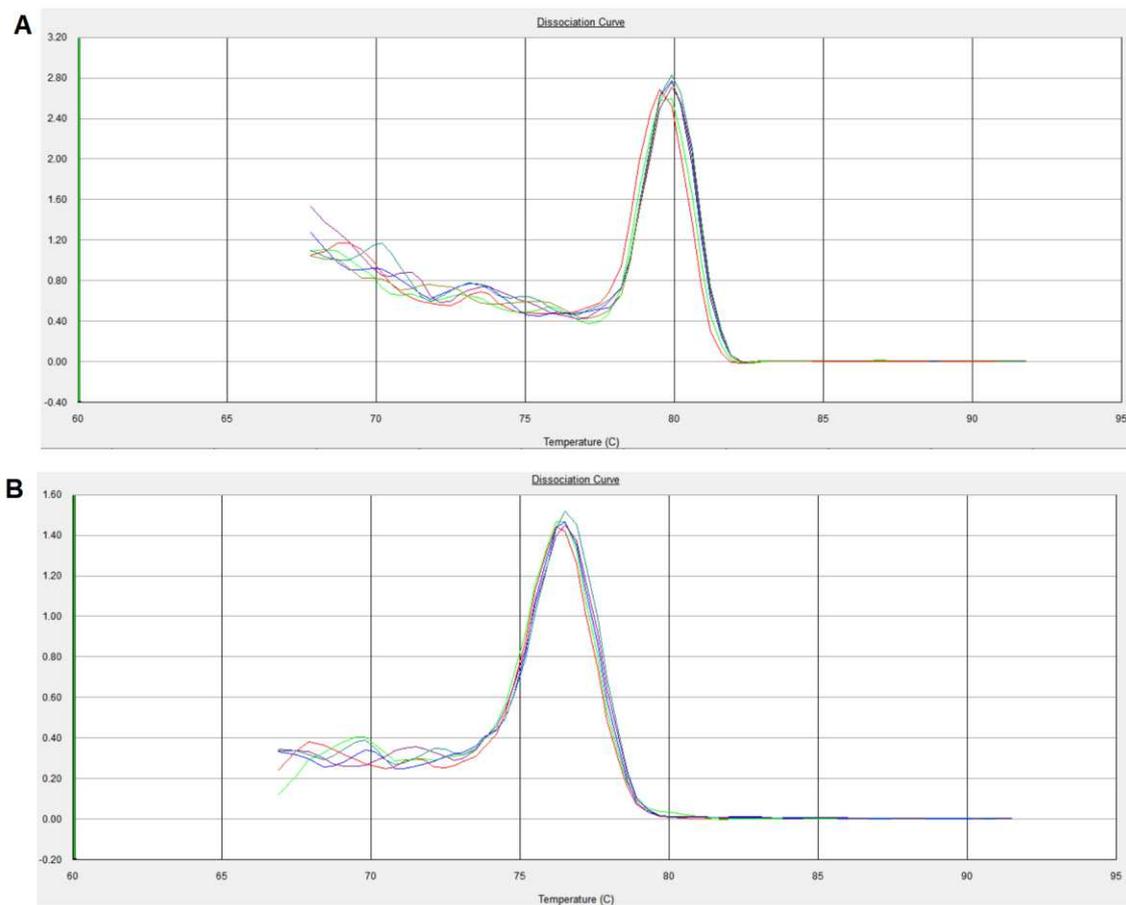


Figura 7: Curvas de dissociação dos microRNAs (A): bta-miR-1246 e (B) bta-miR-27b resultantes da PCR em Tempo Real, mostrando um único pico nas temperaturas de dissociação de 79,9°C e 76,5°C respectivamente.

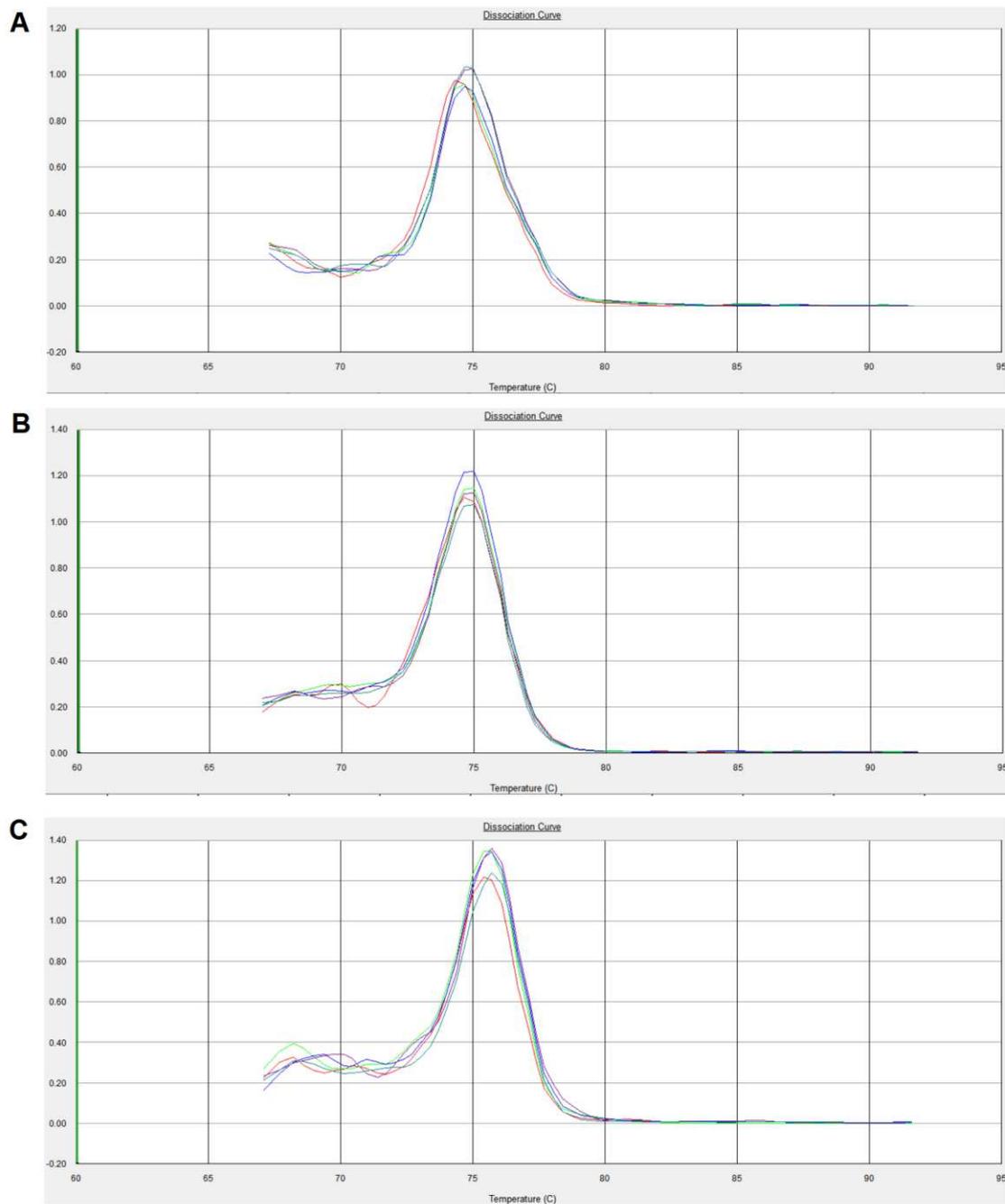


Figura 8: Curvas de dissociação dos microRNAs (A): bta-miR-21-5p, (B) bta-miR-148a e (C) bta-miR-34c resultantes da PCR em Tempo Real, mostrando um único pico nas temperaturas de dissociação de 74,7°C, 75,0°C e 75,7°C respectivamente.

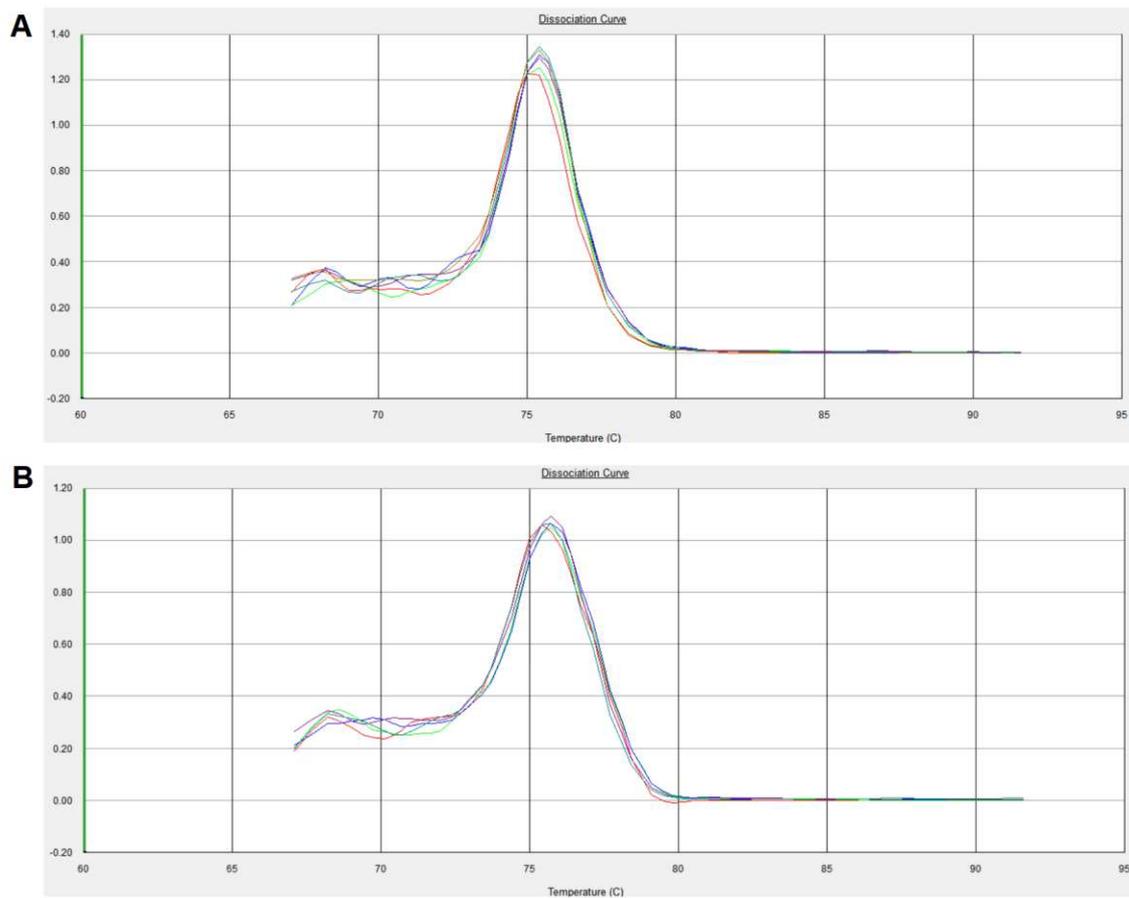


Figura 9: Curvas de dissociação dos microRNAs (A): bta-miR-106a e (B) bta-miR-103 resultantes da PCR em Tempo Real, mostrando um único pico nas temperaturas de dissociação de 75,4°C e 75,0°C e 75,7°C respectivamente.

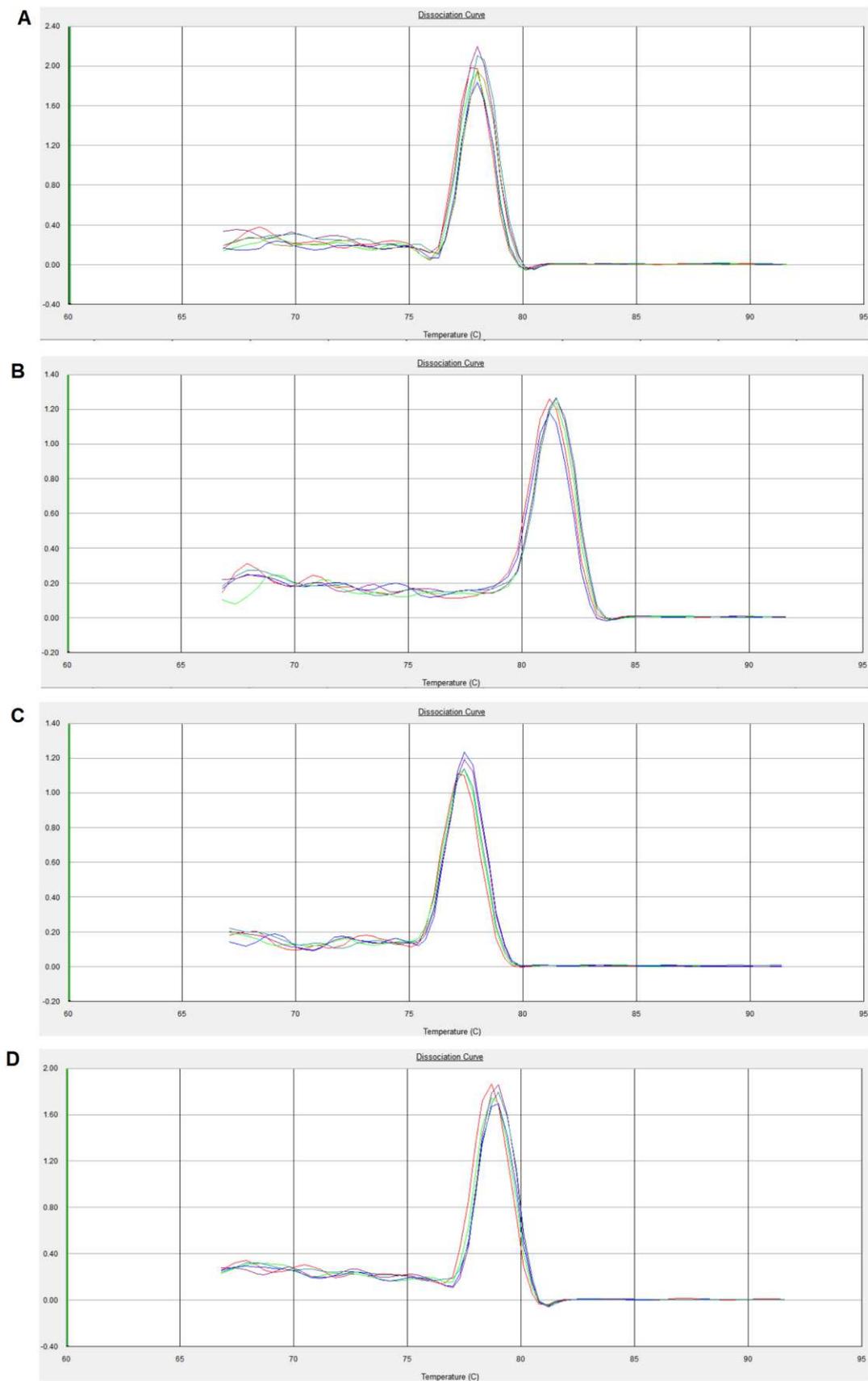


Figura 10: Curvas de dissociação dos genes (A): YWHAZ, (B) β -actina, (C) Drosha e (D) Dicer1 resultantes da PCR em Tempo Real, mostrando um único pico nas temperaturas de dissociação de 78°C, 81,5°C, 77,4°C e 79°C respectivamente.

Além da análise das curvas de dissociação, os produtos da reação de PCR em tempo real também foram submetidos à técnica de eletroforese em gel de agarose à 3% para confirmação da presença e tamanho dos produtos e validação dos resultados. Todos os transcritos de miRNAs foram identificados e apresentaram uma única banda no tamanho esperado entre 75 e 100pb, conforme especificado pelo kit de transcrição reversa miScript II RT (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha) (Figura 11). Os transcritos dos mRNA Dicer1, Drosha, YWHAZ e β -actina também apresentaram uma única banda nos tamanhos esperados conforme mostrado na Figura 12.

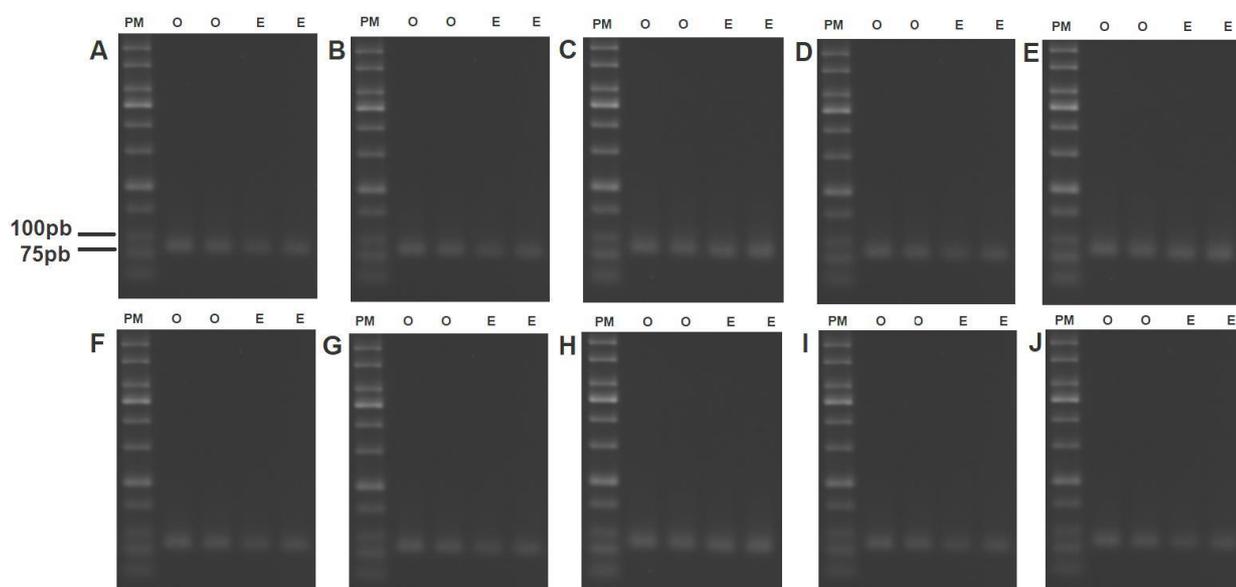


Figura 11: Gel de agarose mostrando a presença dos transcritos dos microRNAs entre 75 e 100pb. A) bta-miR-let-7a-5p; B) bta-miR-20a; C) bta-miR-19b; D) bta-miR-1246; E) bta-miR-27b; F) bta-miR-21-5p; G) bta-miR-148a; H) bta-miR-34c; I) bta-miR-106a e J) bta-miR-103. PM: Peso molecular; O: oócitos; E: Embriões.

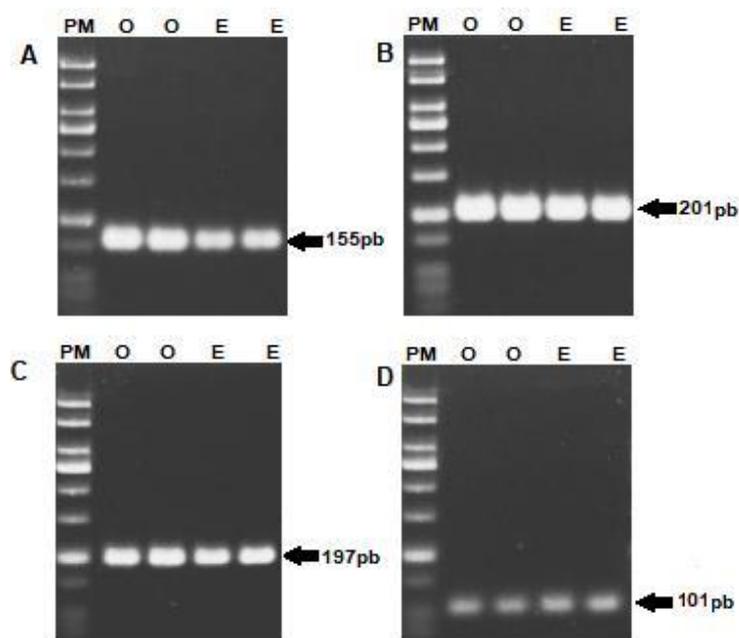


Figura 12: Gel de agarose mostrando a presença dos transcritos dos genes: A) Dicer1; B) Drosha; C) YWHAZ; D) β -actina. PM: Peso molecular; O: oócitos; E: Embriões.

4.12 Identificação dos microRNAs de referência para normalização de dados

Uma vez que nenhum padrão de normalização tem se mostrado ideal para o estudo de miRNAs, recomenda-se verificar a estabilidade da expressão de normalizadores putativos em cada arranjo experimental (MASÉ et al., 2017).

A estratégia deste trabalho foi utilizar a expressão global dos miRNAs para a normalização da expressão dos miRNAs alvo. Para isto, utilizou-se o valor médio de expressão de miRNA como um método de normalização de dados de RT-qPCR (MESTDAGH et al., 2009). Em resumo, para cada miRNA calculamos a diferença entre seu valor de Ct e o valor médio de Ct de todos os genes expressos, por amostra. Em seguida, o desvio padrão dessas diferenças foi determinado para cada miRNA. Os quatro miRNAs com o menor desvio padrão foram classificados com base na análise do geNorm (VANDESOMPELE et al., 2002) e selecionados os dois miRNAs com maior estabilidade de expressão.

Antes da entrada dos valores de Ct da PCR quantitativa em tempo real no geNorm, todos os valores de Ct foram transformados em dados de quantificação relativa, por subtração do maior valor de Ct de todos os outros valores de Ct para cada gene avaliado.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As taxas de clivagem e de blastocistos foram analisadas por Qui-Quadrado. As taxas de maturação nuclear foram analisadas por Teste exato de Fisher pelo Prisma GraphPad. O número total de células embrionárias, número de células apoptóticas e índice apoptótico foram analisadas por Teste T de Student. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

As eficiências dos primers foram calculadas utilizando o programa LinRegPCR (RAMAKERS et al., 2003). Os resultados do grupo endógeno de referência e controle foram analisados pelo software REST® (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002), considerando $p < 0,05$ valores significativos. Os valores foram apresentados como médias \pm erro padrão (EP) da média.

6 RESULTADOS

6.1 Choque térmico durante a maturação *in vitro* compromete a maturação nuclear.

Este experimento avaliou o efeito do choque térmico (41°C por 12 horas) durante a MIV na maturação nuclear dos oócitos. Os oócitos expostos ou não ao choque térmico foram classificados em maturados (presença de placa metafásica II e primeiro corpúsculo polar) e não maturados (ausência de placa metafásica II e primeiro corpúsculo polar) através microscopia de fluorescência (Figura 13).

A exposição dos oócitos à temperatura de 41°C por 12 horas durante a MIV reduziu a taxa de maturação nuclear ($p < 0,05$) de $69,8 \pm 2,33$ para $52,94 \pm 2,64$ (controle e choque térmico, respectivamente) (Figura 14).

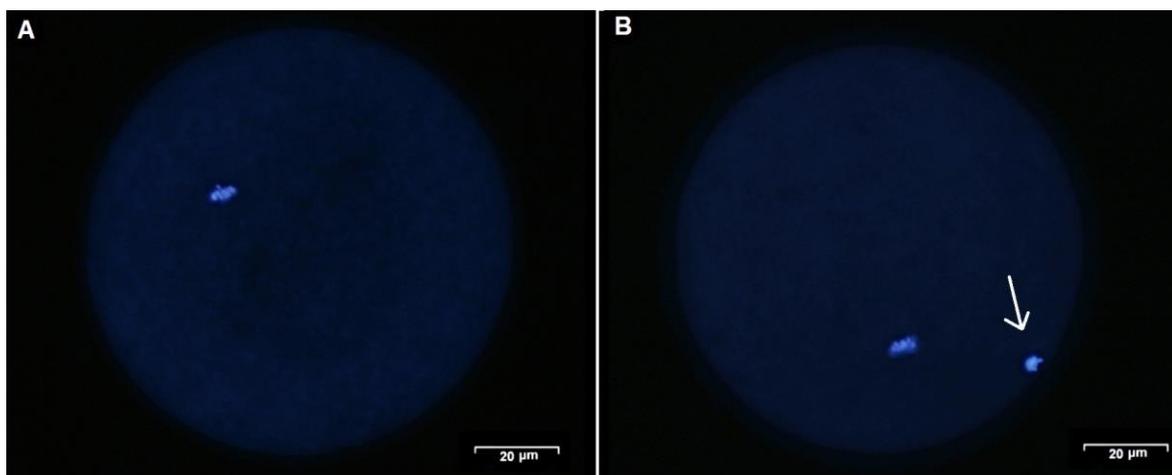


Figura 13: Imagem representativa dos oócitos bovinos corados com Hoechst 33342 e avaliados sob microscopia de fluorescência por DAPI e visualizados sob aumento de 400x no filtro de 460nm em azul. A) oócitos imaturos. B) oócitos maduros. A seta indica o primeiro corpúsculo polar.

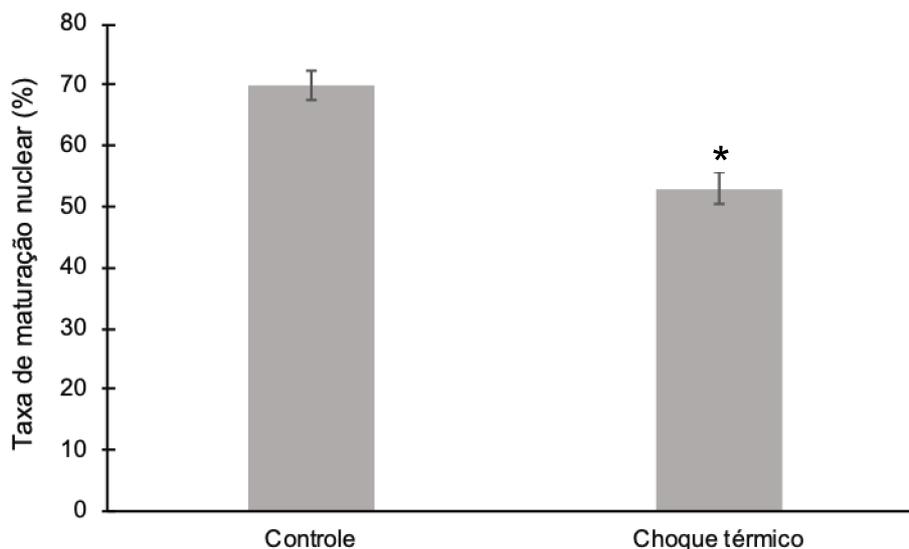


Figura 14: Avaliação da taxa de maturação nuclear em oócitos bovinos expostos a diferentes temperaturas durante a MIV. Os valores são representados em (%). A presença de (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$).

6.2 As taxas de clivagem e de desenvolvimento embrionário são reduzidas pela exposição de oócitos ao choque térmico durante a maturação *in vitro*.

Na Tabela 9 estão demonstradas as taxas de clivagem e de desenvolvimento inicial em embriões derivados de oócitos maturados *in vitro* em condições de choque térmico (41°C) por 12 horas. Houve diferença na taxa de clivagem, e na produção de blastocistos D7 e D8 quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$).

Tabela 9: Taxas de clivagem e de produção de embriões bovinos nos dias 7 (D7%) e 8 (D8%) para os tratamentos controle e choque térmico durante a maturação *in vitro*.

Grupo	N	Clivagem	Clivagem (%)	D7	D7 (%)	D8	D8 (%)
Controle	302	172	56.9 ^a	67	22.19 ^a	69	22.85 ^a
Choque térmico	296	125	42.2 ^b	34	11.49 ^b	40	13.51 ^b

Valores com diferentes letras na mesma coluna diferem ($p < 0,05$). Valores são mostrados como média de 3 repetições.

6.3 O índice apoptótico no D8 é maior em oócitos submetidos ao choque térmico durante a maturação *in vitro*.

O índice apoptótico foi avaliado em embriões no estágio de blastocisto D8. A avaliação de células apoptóticas pela técnica de TUNEL é representada na Figura 15.

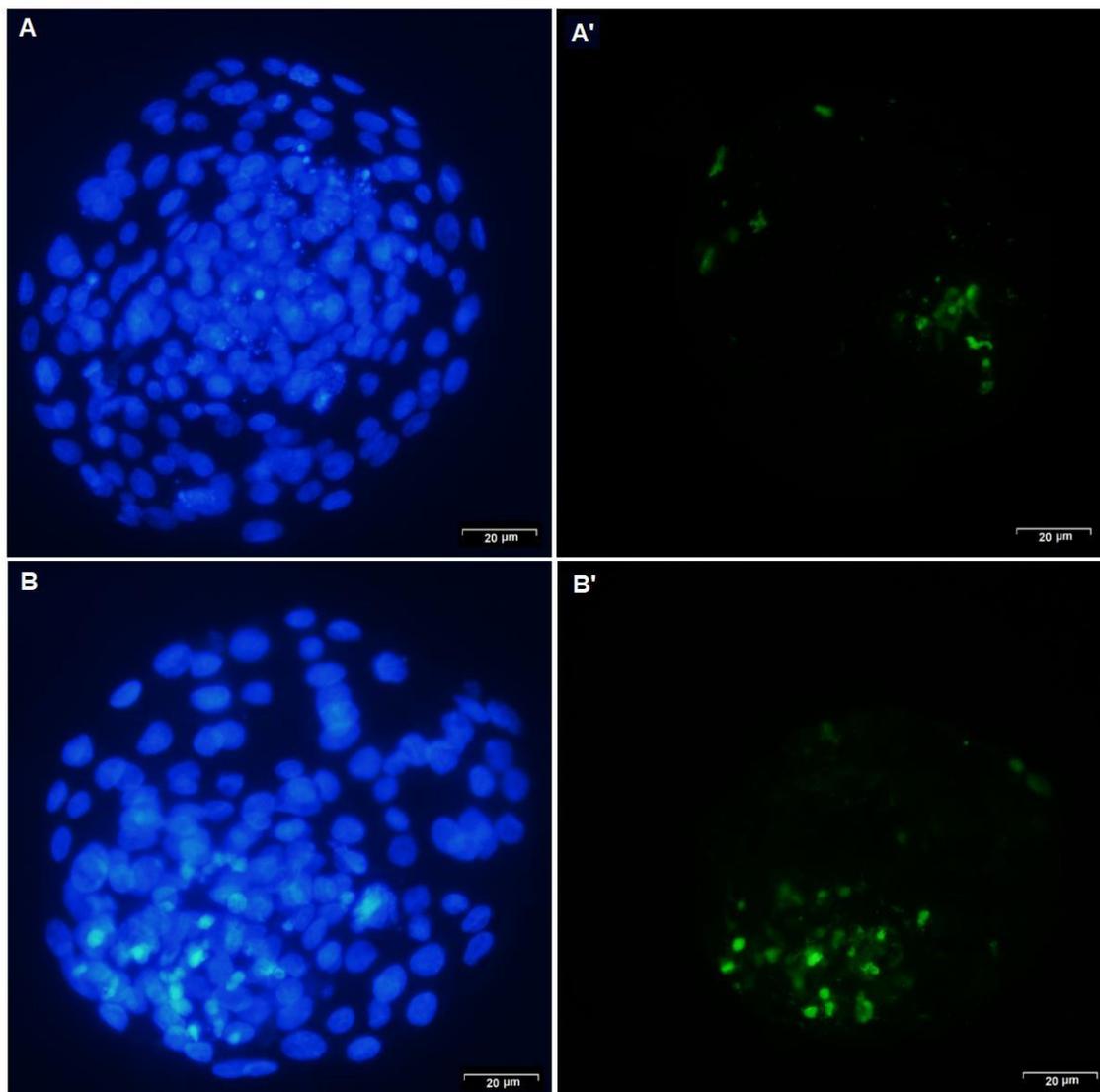


Figura 15: Imagens representativas dos embriões no estágio de blastocisto obtidos a partir da fertilização de oócitos submetidos ou não ao choque térmico durante a maturação *in vitro*, mostrando a detecção da fragmentação de DNA pela técnica de TUNEL sob visualização em microscópio de fluorescência no aumento de 400x. Letras A e B mostram os blastômeros de blastocistos marcados pelo DAPI e visualizados em azul no filtro de 460nm. A' e B' mostram blastômeros de blastocistos visualizados em verde corados pela fluoresceína no filtro de 520nm, indicando apoptose. A/A' – Controle (obtido a partir de oócitos maturados *in vitro* a 38,8°C); B/B' – Choque térmico (obtido a partir de oócitos maturados *in vitro* a 41°C).

O índice apoptótico foi maior ($p < 0,05$) em embriões obtidos a partir de oócitos submetidos ao choque térmico durante a MIV, quando comparados ao grupo controle. No entanto, não houve diferença ($p > 0,05$) no número de células totais e número de células apoptóticas nos diferentes tratamentos (Tabela 10).

Tabela 10: Número de células totais, número de células apoptóticas e índice apoptótico em embriões submetidos a diferentes temperaturas durante a MIV.

Grupo	Nº de células totais	Nº de células apoptóticas	Índice apoptótico (%)
Controle	96,92±1,89	7,74±0,34	7,93±0,28 ^a
Choque térmico	95,78±2,13	8,60±0,33	9,01±0,33 ^b

Valores com diferentes letras na mesma coluna diferem ($p < 0,05$). Controle: n=27; Choque térmico: n=23. Valores são mostrados como média ± erro padrão da média.

6.4 Seleção dos microRNAs de referência para normalização de dados

Em oócitos bovinos os quatro miRNAs que apresentaram menor desvio padrão em relação a média global de expressão foram: miR-21-5p, -20a, -1246 e -27b; em embriões miR-148a, -1246, -20a e -106a.

A estabilidade média da expressão gênica (valor M) e variação em pares (valor V) foi calculada utilizando a abordagem do algoritmo geNorm para oócitos e embriões individualmente. Os genes *housekeeping* melhor avaliados apresentaram um valor de M abaixo de 1,5, que é o valor de corte geNorm recomendado para a seleção de genes estáveis através da análise RT-qPCR (VANDESOMPELE et al., 2002). Um valor M absoluto mais alto indica menor estabilidade de expressão (Tabela 11). Entre os miRNAs testados para oócitos, o miR-20a foi o gene mais estável com um valor M de 0,77, enquanto miR-1246 pareceu ser o gene menos estável com um valor M de 1,25, embora todos os miRNAs avaliados tenham valores M aceitáveis.

Para embriões, os valores absolutos de M variaram de 1,16 para miR-106a e miR-148a (mais estáveis) a 1,51 para miR-20a (menos estável). A estabilidade média de expressão dos genes testados em oócitos e embriões estão representadas na Figura 16.

Tabela 11: Estabilidade média de expressão dos microRNAs. Os miRNAs com menor desvio padrão foram classificados com base em sua estabilidade de expressão, M, em oócitos e embriões bovinos.

Oócitos		Embriões	
microRNA	Valor M	microRNA	Valor M
miR-20a	0,77	miR-106a	1,16
miR-27b	0,78	miR-148a	1,16
miR-21-5p	1,0	miR-1246	1,25
miR-1246	1,25	miR-20a	1,51

Quanto menor o valor M para um gene, mais estável é a expressão entre as amostras

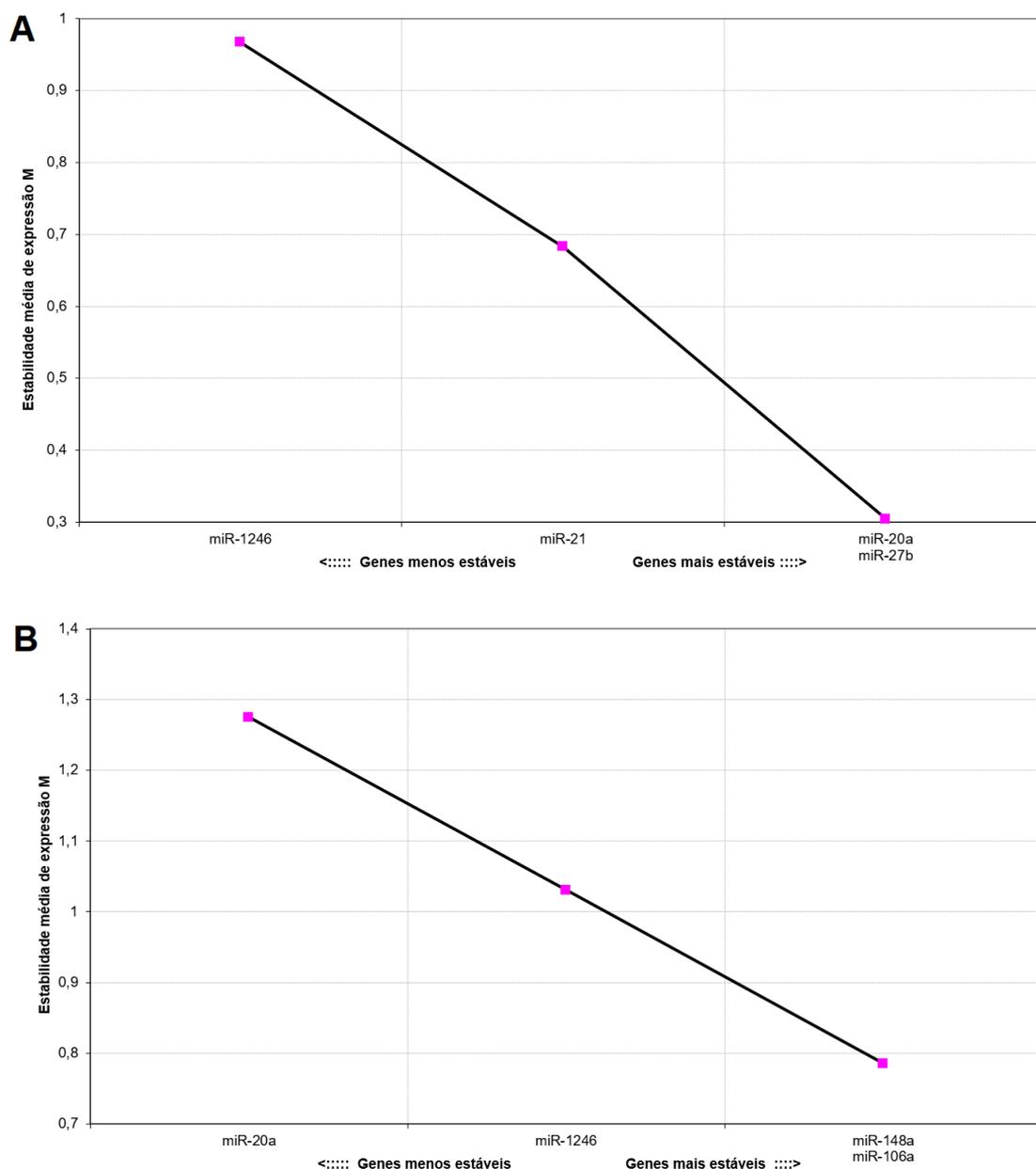


Figura 16: Gráficos de expressão gerados por geNorm para A) oócitos e B) Embriões para a estabilidade de expressão média (valores M) para os 4 miRNAs testados. Os 2 genes mais estáveis para oócitos foram miR-20a e 27b, enquanto miR-148a e 106a foi a combinação mais estável em embriões.

A fim de determinar o número ótimo de gene de referência utilizados para normalização precisa, o geNorm realiza um cálculo gradual da variação de pares (V_n/V_{n+1}) entre dois fatores de normalização sequenciais (NF n e NF n + 1). Como mostrado na Figura 17, em oócitos e embriões bovinos, os valores

de $V_{2/3}$ e $V_{3/4}$ foram 0,000, inferiores ao valor de corte de 0,15, indicando que dois genes seriam suficientes para a normalização sob estas condições.

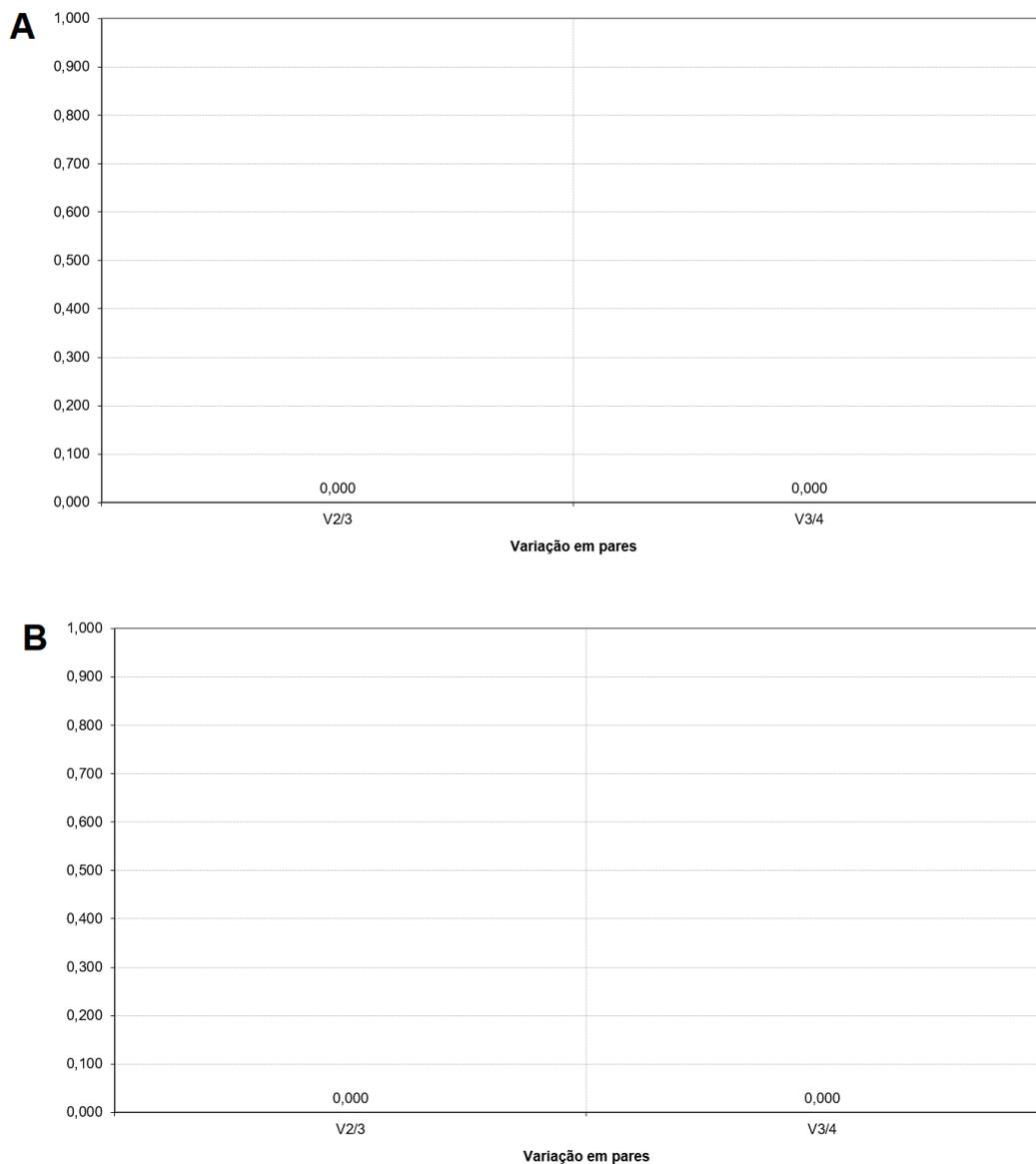


Figura 17: Os gráficos de variação pareada para os 4 microRNAs testados revelaram o número mínimo de genes de referência necessários para a normalização em: A) oócitos e B) Embriões bovinos. Em ambas as amostras 2 microRNAs foram suficientes $<0,15$.

6.5 Análise quantitativa da expressão gênica por PCR em tempo real

Em oócitos bovinos expostos ao choque térmico (41°C por 12 horas) durante a MIV, não houve diferença ($p > 0,05$) na abundância de transcritos dos miR-let-7a-

5p ($0,37 \pm 0,17$); miR-103 ($0,51 \pm 0,24$); miR-34c ($0,50 \pm 0,37$); miR-1246 ($0,52 \pm 0,23$); miR-19b ($1,17 \pm 0,64$) e Dicer1 ($0,70 \pm 0,25$) quando comparados ao grupo controle. No entanto, o gene Drosha ($1,43 \pm 0,35$) foi mais expresso ($p < 0,05$) e o miRNA-21-5p ($0,51 \pm 0,34$) foi menos expresso em oócitos submetidos ao choque térmico, comparados ao grupo controle (Figura 18).

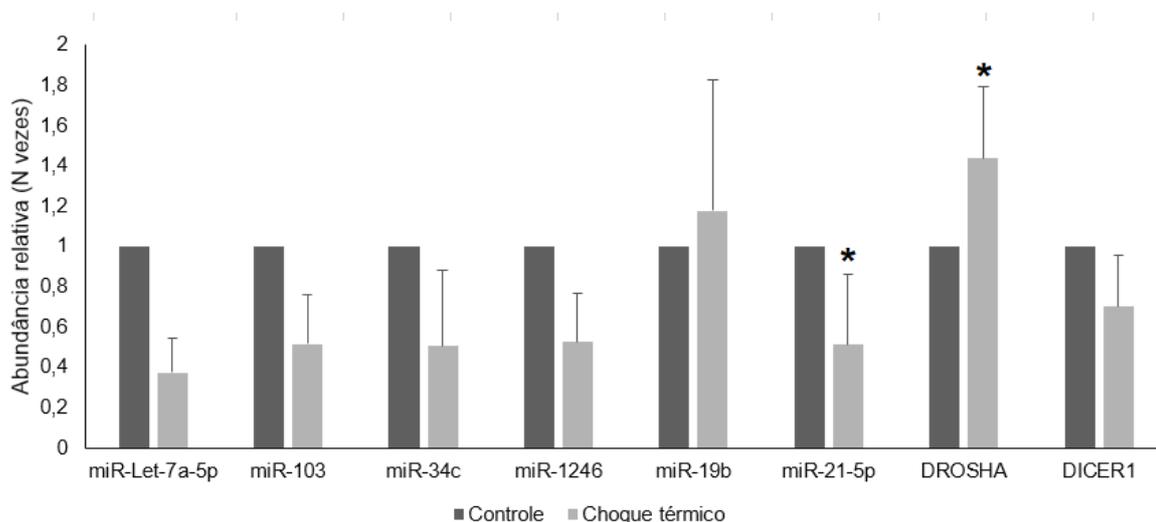


Figura 18: Abundância relativa dos transcritos dos miR-let-7a-5p, -103, -34c, -1246, -19b, -21-5p, Drosha e Dicer1 em oócitos bovinos submetidos ao choque térmico durante a MIV (41 ° C por 12 horas). Os resultados são mostrados em média \pm erro padrão da média, utilizando-se como calibrador oócitos não submetidos ao choque térmico durante a MIV (valor igual a 1). Diferenças significativas são indicadas por (*) $p < 0,05$.

Em embriões no estágio de 8 células, obtidos a partir da fertilização de oócitos submetidos ao choque térmico (41°C por 12 horas) durante a MIV, houve diferença ($p < 0,05$) na abundância de transcritos dos miR-let-7a-5p ($3,0 \pm 2,0$); miR-1246 ($2,29 \pm 1,21$) e miR-19b ($3,96 \pm 2,29$), sendo que todos foram mais expressos em comparação ao grupo controle. Entretanto, a abundância de transcritos dos miRNAs miR-103 ($1,41 \pm 1,0$); -34c ($1,0 \pm 0,7$); -21-5p ($0,91 \pm 0,45$); Drosha ($0,48 \pm 0,23$) e Dicer1 ($0,80 \pm 0,60$) não diferiu entre os grupos ($p > 0,05$) (Figura 19).

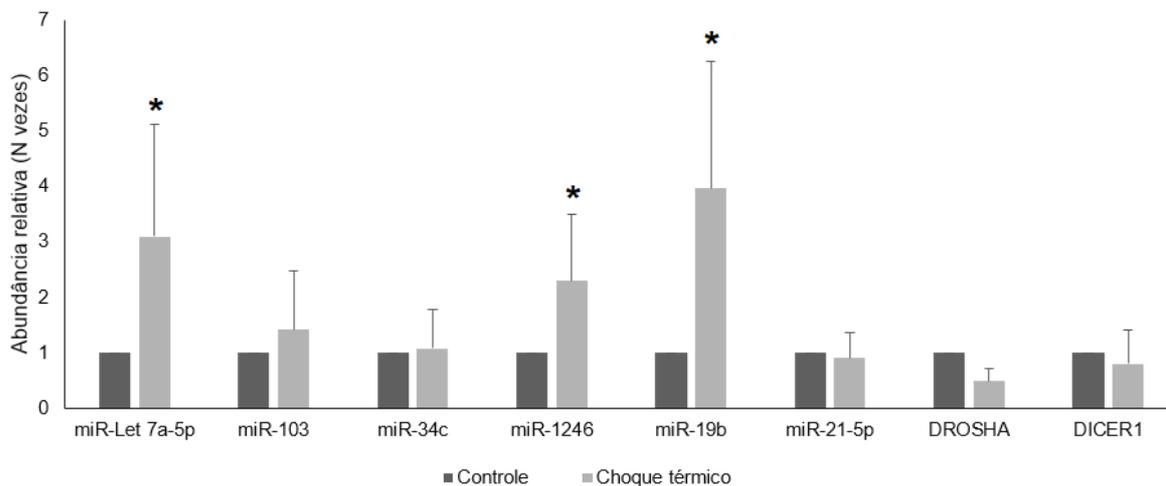


Figura 19: Abundância relativa dos transcritos dos miR-let-7a-5p, -103, -34c, -1246, -19b, -21-5p, Drosha e Dicer1 em embriões bovinos no estágio de 8 células, obtidos a partir da fertilização de oócitos bovinos submetidos ao choque térmico durante a MIV (41°C por 12 horas). Os resultados são mostrados em média \pm erro padrão da média, utilizando-se como calibrador oócitos não submetidos ao choque térmico durante a MIV (valor igual a 1). Diferenças significativas são indicadas por (*) $p < 0,05$.

7 DISCUSSÃO

O estresse é amplamente definido como o estado em que as células se desviam da homeostase devido a mudanças súbitas ou a flutuações frequentes nos fatores ambientais (LEUNG; SHARP, 2010). O estresse térmico é um dos principais fatores contribuintes para o baixo desempenho reprodutivo e eficiência produtiva bovina (DASH et al., 2016), e o aumento da temperatura global previsto para as próximas décadas pelo IPCC (IPCC, 2018) pode aumentar a ocorrência de estresse por calor e comprometer de forma acentuada os sistemas de produção pecuária bovina.

A fertilidade é uma característica multifatorial e sua deterioração tem se mostrado relacionada a uma rede de fatores genéticos e ambientais. No presente estudo, o choque térmico durante a maturação *in vitro* foi realizado para compreender os impactos das alterações na temperatura sobre a fertilidade bovina. Os resultados mostraram que o choque térmico durante as primeiras 12 horas de maturação compromete a taxa de oócitos que atingem a maturação nuclear, as taxas de clivagem e a porcentagem de zigotos que se tornam blastocistos, além do aumento dos índices apoptóticos. Efeitos deletérios similares do choque térmico durante a MIV foram relatados anteriormente (ROTH; HANSEN, 2005; PAYTON et al., 2011; PAVANI et al., 2016; PAYTON et al., 2018).

Como embriões em estágio inicial do desenvolvimento dependem dos transcritos e das proteínas armazenados no citoplasma do oócito, compreende-se que o conteúdo presente no citoplasma desempenha um papel essencial na resposta ao estresse térmico em embriões antes da Ativação do Genoma Embrionário (AGE). Assim, qualquer perturbação durante o armazenamento dos oócitos, em particular dos transcritos maternos, poderia levar a alterações genéticas e/ou epigenéticas inadequadas que comprometessem o sucesso do desenvolvimento.

Roth (2018) relatou que oócitos bovinos submetidos a choque térmico possuem uma quantidade reduzida de transcritos associados com competências oocitárias armazenados no citoplasma. Além disso, uma das

consequências do choque térmico no oócito é o aumento da produção de ERO levando a um estresse oxidativo (ASCARI et al., 2017). Evidências crescentes sugerem que o estresse oxidativo influencia globalmente a estrutura da cromatina, metilação do DNA, modificações pós-traducionais enzimáticas e não-enzimáticas das histonas e das proteínas de ligação ao DNA (KREUZ; FISCHLE, 2016). Portanto, prováveis implicações do choque térmico durante a maturação do oócito são modificações epigenéticas inadequadas, causando alterada expressão gênica e, conseqüentemente, em diferentes perfis proteicos, comprometendo o desenvolvimento embrionário.

Os mecanismos reguladores por trás desses processos complexos ainda são pouco caracterizados. Pequenas vias envolvendo microRNAs e moléculas relacionadas surgiram recentemente como processos reguladores chave na maturação oocitária, desenvolvimento embrionário e na resposta ao estresse térmico (XIAO et al., 2014; NEHAMMER et al., 2015; GROSS; KROPP; KHATIB, 2017; LI et al., 2017; PAN; TOMS; LI, 2017). Portanto, eles podem representar uma importante ferramenta para fornecer novos conhecimentos sobre como o estresse térmico afeta o desempenho reprodutivo bovino. Aqui, hipotetizou-se que alterações na expressão de microRNAs decorrentes da resposta ao choque térmico poderia comprometer o sucesso da maturação oocitária e desenvolvimento embrionário subsequente.

Para testar essa hipótese, utilizou-se a RT-qPCR para análise da expressão gênica (GIBSON; HEID; WILLIAMS, 1996). Embora diferentes metodologias possam ser aplicadas para avaliar a expressão de miRNA, a RT-qPCR continua sendo o padrão-ouro para uma detecção específica de conjuntos selecionados de miRNAs (YAN et al., 2013; MESTDAGH et al., 2014). No entanto, a normalização dos níveis de expressão é um passo crucial para garantir a quantificação precisa e adequada dos dados (GUÉNIN et al., 2009; SCHWARZENBACH et al., 2015).

Apesar do crescente número de estudos investigando a expressão de miRNAs em oócitos e embriões bovinos, atualmente não existe consenso sobre os genes de referência para essas amostras. É amplamente aceito que um único gene de referência universal não existe e recomenda-se procurar genes expressos de forma estável em cada sistema experimental (VANDESOMPELE

et al., 2002; MEYER; PFAFFL; ULBRICH, 2010). Neste sentido, diferentes estratégias têm sido adotadas para normalização dos níveis de expressão de miRNAs em oócitos e embriões bovinos, como o uso de mRNAs (MONDOU et al., 2012; GILCHRIST et al., 2016) e snRNA u6 (LI et al., 2009; ABD EL NABY et al., 2013; TSCHERNER et al., 2014; SINHA et al., 2017).

No entanto, tem sido argumentado, que a normalização mais precisa é obtida pela seleção de genes de referência pertencentes à mesma classe de RNA que os genes investigados, isso porque existem várias desvantagens potenciais no uso de mRNA ou outros RNAs nucleares para a normalização dos dados de miRNA. Em primeiro lugar, esses dois grupos (miRNAs vs mRNA /RNAs nucleares) têm diferentes vias de biogênese e são, por definição, diferentes na natureza (KIM; HAN; SIOMI, 2009; MROCZEK; DZIEMBOWSKI, 2013). Em segundo lugar, há diferenças significativas de tamanho entre as moléculas de miRNA e mRNA que afetam os métodos e a eficiência do isolamento de RNA e da síntese de cDNA (SCHAEFER et al., 2010).

Assim, no presente estudo selecionou-se miRNAs como normalizadores utilizando método de normalização proposto por Mestdagh et al. (2009). Os resultados identificaram os miR-20a e -27b em oócitos bovinos e 148a e 106a em embriões no estágio de 8 células com os miRNAs mais estáveis. Esses dados estão de acordo com outros autores, que identificaram miRNAs como normalizadores adequados em bovinos (LI et al., 2014; BAE et al., 2015). Além disso, de acordo com o miRBase, os miR-20a e -27b não pertencem às mesmas famílias miRNA, assim como miR-148a e -106a, o que reduz a chance de que eles possam ser corregulados. Por fim, a seleção de dois genes de referência atende à recomendação para obter-se dados confiáveis em RT-qPCR (HELLEMANS et al., 2007).

Após a identificação de normalizadores ideais, os resultados do RT-qPCR mostraram alterações na expressão de miRNAs em oócitos submetidos ao choque térmico durante a MIV e embriões obtidos a partir desses oócitos quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$). Esses achados são consistentes com outros trabalhos, em que alterações na abundância de transcritos foram observadas em decorrência do aumento da temperatura (PAYTON et al., 2011; FERREIRA et al., 2016; LI et al., 2016). Adicionalmente,

alteração nos transcritos maternos foi associada com alteração na clivagem e diminuição do desenvolvimento embrionário (GENDELMAN et al., 2010), conforme os dados do presente estudo.

Em oócitos, o miR-21-5p teve a abundância de transcritos reduzida em resposta ao choque térmico, enquanto o gene Droscha teve sua expressão aumentada. Esse resultado é particularmente interessante uma vez que, o miR-21-5p é abundantemente expresso durante a maturação oocitária tanto em bovinos quanto em suínos, sugerindo ter uma importância central nesse processo (MONDOU et al., 2012; SONG et al., 2016; WRIGHT et al., 2016). Em suínos, a inibição do miR-21 resultou em uma menor proporção de oócitos atingindo o estágio MII e desenvolvimento embrionário subsequente (WRIGHT et al., 2016). O miR-21 também tem sido amplamente implicado na apoptose e proliferação celular através da modulação de fatores celulares, como morte celular programada 4 (PDCD4) (FRANKEL et al., 2008) e homólogo de fosfatase e tensina (PTEN) (MENG et al., 2007), ambos importantes na biologia dos oócitos (REDDY et al., 2008; WRIGHT et al., 2016).

Recentemente Tscherner et al., (2018), relataram que a sinalização de STAT3, uma molécula de sinalização crítica e ativadora da transcrição no ovário, particularmente no período periovulatório e durante a MIV, estimulou a expressão de miR-21 em células do *cumulus* bovina durante a maturação oocitária. Em *Cavia aperea*, um mamífero selvagem, a exposição ao calor levou a alteração na metilação do DNA e redução na expressão de STAT3 (WEYRICH et al., 2016). Embora o efeito direto do choque térmico na metilação de oócitos bovinos não esteja bem estabelecido, alterações na expressão de genes envolvidos na metilação do DNA são observadas (PAVANI et al., 2017). O estresse oxidativo, condição fisiológica comum na resposta ao estresse térmico, tem sido relacionado com alterações na metilação do DNA no processo reprodutivo (MENEZO et al., 2016). Estudos prévios relataram que a ativação de STAT3 é prejudicada pela depleção de glutathione, um antioxidante responsável por proteger os lipídios da membrana celular da peroxidação (KURDI et al., 2012). Em condições de choque térmico, o desequilíbrio redox e aumento da produção de ERO levam a diminuição nos níveis de glutathione peroxidase intraoocitário (NABENISHI et al., 2012). Esses achados em

conjunto podem sugerir que redução na expressão de STAT3, resultante de alterações nos padrões de metilação do DNA ou sua ativação prejudicada pela depleção da glutatona, impliquem na redução da expressão de miR-21.

De fato, STAT3 é capaz de suprimir a expressão do miR-21 e inibir seletivamente a expressão do mRNA do DNMT1 (ZHANG et al., 2011). Alterações na regulação da DNMT pode ser um dos principais eventos moleculares que levam à metilação anormal de DNA em oócitos e pode estar associada à diminuição do potencial reprodutivo (YUE et al., 2012). Assim, pode existir uma relação de *feedback* positivo entre alterações na metilação, expressão de STAT3 e alterações na regulação de DNMT mediada por miR-21 que afetem o potencial reprodutivo. No entanto, outros estudos são necessários para testar essa hipótese.

É importante ressaltar, que a diminuição da expressão do miRNA-21 em resposta ao choque térmico em oócitos bovinos, contradiz os achados de Sengar et al., (2018), onde o aumento da expressão de miR-21 foi observado em resposta ao estresse térmico em células mononucleares de sangue periférico bovino. Essas diferenças podem ser atribuídas a dois principais fatores, primeiro: aqui optou-se pela técnica de RT-qPCR que é atualmente o padrão-ouro para identificar alterações de expressão gênica. Além disso, quantificou-se somente a expressão de miRNA-21-5p. De acordo com o miRBase, o miR-21 apresenta duas isoformas maduras miRNA-21-5p e miRNA-21-3p. Segundo: miRNAs são tecido-específicos e a função do miRNA é determinada pelo contexto celular específico (ROMAO et al., 2012).

A diminuição do nível de miR-21-5p em oócitos submetidos ao choque térmico e as menores taxas de oócitos que atingiram a MII observados neste trabalho, e o envolvimento desse miRNA no sucesso da maturação oocitária podem indicar uma importante via de como o choque térmico impacta o sucesso reprodutivo bovino.

Este trabalho identificou a superexpressão de Drosha em resposta ao choque térmico em oócitos bovinos. Essa enzima é essencial no processamento de pri-miRNAs na via canônica e algumas vias não-canônicas (O'BRIEN et al., 2018). A maior expressão de Drosha também foi observada e

diferentes tipos de câncer (DÍAZ-GARCÍA et al., 2013; AVERY-KIEJDA et al., 2014; KIM et al., 2017). Em condições de estresse prolongado por calor, o aumento inicial de Drosha citoplasmática foi relatado, com posterior diminuição dependente do tempo nos níveis de Drosha nuclear, que sensibilizou as células ao estresse e aumentou a morte (YANG et al., 2015).

Uma limitação deste estudo é que ele foi realizado em oócitos e embriões 8 células, não sendo considerado os estágios intermediários de desenvolvimento, no entanto, é possível que o choque térmico em oócitos bovinos tenha consequências semelhantes. Em adição, uma vez que Drosha sinaliza o processamento do pri-miRNA, alterações nos seus níveis podem levar a uma dis-homeostase do ambiente de miRNA global, levando à desregulação de vias e redes complexas de expressão gênica controladas por miRNAs.

Drosha é capaz de regular as atividades celulares através de um mecanismo independente de miRNA. Por exemplo, Drosha pode regular a progressão do ciclo celular das células-tronco mesenquimais humanas (hMSCs), potencialmente por afetar o processamento do RNA ribossômico (rRNA) (OSKOWITZ et al., 2011). As funções não-canônicas de Drosha foram relatadas para incluir a regulação direta da iniciação e terminação da transcrição, bem como o processamento de vários tipos de espécies de RNA (BURGER; GULLEROVA, 2015). Portanto, é possível que Drosha influencie na maturação oocitária através da sua função não canônica. No entanto, mais estudos são necessários para esclarecer esta questão.

Deve-se levar em conta ainda, a possível relação entre a superexpressão de Drosha em oócitos e os níveis aumento na abundância de transcritos de bta-let-7a, bta-1246 e bta-19b em embriões no estágio de 8 células obtidos a partir de oócitos estressados. O maior processamento de pri-microRNAs no oócito em maturação e acúmulo dos mesmos citoplasma, poderia justificar a superexpressão desses miRNAs no embrião em desenvolvimento. Curiosamente, foi relatado que em células-tronco embrionárias, o processamento da família miRNA-let-7 por Drosha é regulado, pela interação de LIN-28 com Let-7, que inibe o processamento de transcritos primários de let-7 por Drosha (NEWMAN; THOMSON; HAMMOND, 2008).

Esta proteína é altamente expressa no desenvolvimento inicial (YANG; MOSS, 2003). Em condições de choque térmico a expressão da proteína LIN-28 reduz significativamente (PALANGI et al., 2017). Neste caso, a menor expressão de LIN-28 decorrente do choque térmico poderia justificar a abundância de processamento do miR-let-7a por Drosha.

A maturação molecular representa a associação mais próxima com a capacidade intrínseca de um oócito atingir o estágio de blastocisto (SIRARD et al., 2006). A incompetência do maquinário celular do oócito, frequentemente causa falhas no desenvolvimento embrionário após a fertilização, menores taxas de implantação e embriões incompetentes na clivagem (MAHDY et al., 2017). Portanto, as alterações observadas na expressão gênica em oócitos podem justificar a diminuição ($p < 0,05$) na taxa clivagem e desenvolvimento embrionário subsequente observados neste trabalho.

Posteriormente, para saber se o estresse térmico durante a MIV tem efeitos a longo prazo, avaliou-se a expressão dos miRNAs em embriões no estágio de 8 células obtidos a partir de oócitos estressados durante a MIV. Do zigoto ao embrião em estágio de 8 células, a expressão gênica ainda é de origem materna, portanto, os possíveis impactos na expressão gênica durante a maturação do oócitos poderiam permanecer até antes da ativação do genoma embrionário.

Os resultados demonstraram que miRNAs que não apresentaram alterações na abundância de transcritos em oócitos submetidos ao choque térmico durante a MIV, são diferencialmente expressos mais tarde, em embriões no estágio de 8 células obtidos a partir da fertilização desses oócitos. Curiosamente, foi relatado que o estresse térmico durante a maturação do oócito tem efeito crônico, sendo seus efeitos deletérios observados até 60 dias após a condição de estresse (FIALHO et al., 2018). Além disso, Gendelman; Roth (2012) relataram que a exposição de oócitos ao estresse térmico, foi expressa por alterações na transcrição de mRNA materna antes e depois da ativação do genoma embrionário.

Em embriões 8 células os miRNAs Let-7a, 1246 e 19b tiveram aumento na abundância de transcritos, no grupo estressado em comparação com o

grupo controle. Em consonância com estes dados, outros autores observaram a maior expressão de Let-7a, -1246 e -19b em condições de estresse térmico em bovinos (ZHENG et al., 2014; SENGAR et al., 2018).

Let-7a desempenha importantes papéis durante o desenvolvimento embrionário (REINHART et al., 2000). Foi confirmada a repressão de genes importantes para o desenvolvimento embrionário e o progresso do ciclo celular pela família let-7 em bovinos (SCHEEL et al., 2017). Ensaios *in vitro* revelaram que a expressão de miR-let-7a é capaz de regular a proliferação celular e a apoptose, além disso, a expressão de miR-let-7a foi inversamente relacionada os níveis de PKM2, uma enzima responsável por catalisar a etapa final da glicólise (TANG et al., 2016).

PKM2 é abundantemente expressa em embriões, e é capaz de estabilizar Bcl2 impedindo sua degradação, conferindo a inibição da apoptose e contribuindo na adaptação ao estresse oxidativo (LIANG et al., 2017). Curiosamente, em bovinos, embora a expressão de Bcl2 seja maior em condições de choque térmico, o que poderia sugerir o aumento da sobrevivência celular, o oposto é observado, com o aumento dos índices apoptóticos (PAULA-LOPES; HANSEN, 2002; SOMAL; AGGARWAL; UPADHYAY, 2015; HU et al., 2016; LI et al., 2016). É possível que a regulação negativa de PKM2 mediada pela superexpressão de Let-7a, comprometa a estabilização de Bcl2 e tolerância a apoptose e justifiquem o aumento dos índices apoptóticos em blastocisto observados neste trabalho.

O MiR-1246 mostrou ser regulado positivamente e regular a apoptose de células pulmonares durante o estresse térmico em bovinos confinados através da regulação de PCBP2 (HU et al., 2018). A PCBP2 e outras proteínas de ligação ao RNA, se adequadamente direcionadas, têm o potencial de exercer uma variedade de meios para silenciar ou melhorar a tradução de transcritos selecionados após as células confrontarem mudanças em seu ambiente extracelular (MAKEYEV; LIEBHABER, 2002). Em vacas leiteiras e bubalinos, o miR-1246 também mostrou-se abundantemente expresso em resposta ao estresse térmico (ZHENG et al., 2014; LIU et al., 2019). Nesses últimos, o gene ABCC4 foi identificado como alvo do miR-1246, curiosamente,

ABCC4 foi relatado como envolvido na defesa celular contra o estresse oxidativo (RONALDSON; BENDAYAN, 2008).

O miRNA-19b, foi relatado por ter como alvos previstos os genes HSPBAP1, DNAJB1, HPX e APOA2, envolvidos na resposta ao estresse térmico e estresse oxidativo (ZHENG et al., 2014). Alterações na produção de ERO e diminuição dos mecanismos de defesa antioxidante foram observados em embriões bovinos estressados termicamente (KHATUN et al., 2018). A ativação transcricional e o acúmulo de um conjunto de “proteínas de choque térmico” (HSPs) são uma das respostas celulares proeminentes durante o aumento das temperaturas ambientais (BELHADJ SLIMEN et al., 2016). Além disso, a expressão de genes envolvidos nas vias da ubiquitina, que são críticos para a remoção de proteínas danificadas pelo estresse externo, foi induzida por estresse térmico (SAKATANI et al., 2013). Assim, a termotolerância é devida em parte a mecanismos de desenvolvimento que impedem o acúmulo de proteínas desnaturadas e danos por estresse oxidativo. Neste sentido, alterações na síntese dessas proteínas poderiam representar impactos significativos na viabilidade do embrião.

De fato, foi relatado que a inibição da HSP90 prejudica a produção a viabilidade de oócitos e o desenvolvimento de embriões (SON et al., 2010). Essas alterações que resultam na redução das taxas de embriões, pode ser devido a alterações na quantidade de proteínas e de transcritos armazenados (ROTH; HANSEN, 2004). Pelo exposto, a maior expressão de miRNAs pode representar a inibição da tradução de proteínas necessárias para atenuar os efeitos choque térmico. No entanto, maiores estudos são necessários para compreender esses processos.

À luz desses achados, sugere-se que os efeitos deletérios do choque térmico induzidos durante a MIV, comprometam a competência oocitária, e sejam transferidos para os estágios embrionários subsequentes comprometendo o sucesso do desenvolvimento.

É importante ressaltar que um exame de qualquer série individual ou pequena de miRNAs pode não refletir a complexidade das mudanças na expressão de miRNAs que participam da resposta ao choque térmico. Sabe-se

que existe uma complexa rede de associação entre expressão de miRNAs e resposta ao estresse térmico, envolvendo diferentes vias de sinalização, mecanismos biológicos de regulação e expressão de miRNAs específicos (LIU et al., 2017). Adicionalmente, dependendo da gravidade e duração do estresse, a resposta pode ser mediada por múltiplos mecanismos diferentes (KÜLTZ, 2005), como a indução de chaperonas moleculares (BUCHBERGER; BUKAU; SOMMER, 2010), rápida depuração de macromoléculas danificadas (KROEMER; MARIÑO; LEVINE, 2010), parada do crescimento (LEUNG; SHARP, 2010), e ativação de certos programas de expressão gênica (SPRIGGS; BUSHELL; WILLIS, 2010). Portanto, considerando a complexidade de miRNAs e seu envolvimento em múltiplas vias, mesmo mudanças relativamente pequenas na expressão de miRNA podem ser biologicamente significativas.

8 CONCLUSÃO

Em conclusão, este estudo suporta a hipótese de alterações na expressão de microRNAs e dos componentes de maquinaria de processamento de miRNA em resposta ao choque térmico durante a MIV. Assim, este trabalho fornece uma camada adicional de regulação genética que controla as respostas do estresse térmico e pode estar relacionada aos impactos do aumento da temperatura na maturação de oócitos e desenvolvimento embrionário subsequente em bovinos.

Se alterações na expressão de microRNAs e na maquinaria de miRNA estão diretamente associadas com menores índices de maturação oocitária, clivagem, competência de desenvolvimento embrionário e aumento dos índices apoptóticos ainda não está claro, e precisa ser melhor compreendido em estudos futuros. No entanto, existem possíveis vias envolvendo miRNAs em condições de choque térmico a serem exploradas.

Nos últimos anos, nenhum biomarcador gerou tanto interesse quanto os miRNAs, que foram considerados para uma variedade de propósitos. A expressão diferencial de alguns miRNAs, como miR-21-5p, -Let-7a, -1246 e -19b demonstradas neste trabalho, podem sugerir importantes ferramentas na resposta ao choque térmico em oócitos e embriões bovinos.

Os resultados aqui apresentados fornecem uma importante base teórica para melhor compreender o mecanismo biológico que interfere no sucesso reprodutivo sob condições de estresse térmico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL NABY, W. S. et al. Expression analysis of regulatory microRNAs in bovine cumulus oocyte complex and preimplantation embryos. **Zygote**, 2013.

AHMED, J. A. et al. Cumulus cell expansion and ultrastructural changes *in vitro* matured bovine oocytes under heat stress. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 18, n. 3, p. 203–207, 2017.

AKIYAMA, T.; NAGATA, M.; AOKI, F. Inadequate histone deacetylation during oocyte meiosis causes aneuploidy and embryo death in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 19, p. 7339–7344, 2006.

ALI, I. et al. Reactive oxygen species-mediated unfolded protein response pathways in preimplantation embryos. **Journal of Veterinary Science**, v. 18, n. 1, p. 1–9, 2017.

ANDREAS E., SALILEW-WONDIM D., RINGS F., HELD E., HOELKER M., NEUHOFF C., THOLEN E., SCHELLANDER K., TESFAYE D. (2016) 176 REGULATORY ROLE OF miR-20a DURING BOVINE OOCYTE MATURATION. **Reproduction, Fertility and Development** 29, 196-196.

ASCARI, I. J. et al. Addition of insulin-like growth factor I to the maturation medium of bovine oocytes subjected to heat shock: Effects on the production of reactive oxygen species, mitochondrial activity and oocyte competence. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 60, p. 50–60, 2017.

ASSOU, S. et al. MicroRNAs: New candidates for the regulation of the human cumulus-oocyte complex. **Human Reproduction**, v. 28, n. 11, p. 3038–3049, 2013.

AUCLAIR, G.; WEBER, M. Mechanisms of DNA methylation and demethylation in mammals. **Biochimie**, v. 94, n. 11, p. 2202–2211, 2012.

AUCLAIR, G. et al. Ontogeny of CpG island methylation and specificity of DNMT3 methyltransferases during embryonic development in the mouse. **Genome biology**, v. 15, n. 12, p. 545, 2014.

EVERY-KIEJDA, K. A. et al. The expression of Dicer and Drosha in matched

normal tissues, tumours and lymph node metastases in triple negative breast cancer. **BMC Cancer**, v. 14, n. 1, 2014.

AYRES, G. F. et al. Effect of season on conception rate and pregnancy loss in crossbred dairy cows. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 5, p. 866–872, 2014.

BABAR, I. A.; SLACK, F. J.; WEIDHAAS, J. B. miRNA modulation of the cellular stress response. **Future Oncology**, v. 4, n. 2, p. 289–298, abr. 2008.

BADAL, S. S. et al. miR-93 regulates Msk2-mediated chromatin remodelling in diabetic nephropathy. **Nature Communications**, v. 7, p. 12076, 2016.

BAE, I. S. et al. Identification of reference genes for relative quantification of circulating microRNAs in bovine serum. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–12, 2015.

BAGGA, S. et al. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. **Cell**, v. 122, n. 4, p. 553–563, 2005.

BANNISTER, A. J.; KOUZARIDES, T. Regulation of chromatin by histone modifications. **Nature Publishing Group**, v. 21, n. 3, p. 381–395, 2011.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 281–297, 2004.

BAUMGARD, L. H.; RHOADS, R. P. Effects of Heat Stress on Postabsorptive Metabolism and Energetics. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 1, n. 1, p. 311–337, jan. 2013.

BELHADJ SLIMEN, I. et al. Heat stress effects on livestock: molecular, cellular and metabolic aspects, a review. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 100, n. 3, p. 401–412, jun. 2016.

BENETTI, R. et al. A mammalian microRNA cluster controls DNA methylation and telomere recombination via Rbl2-dependent regulation of DNA methyltransferases. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 15, n. 3, p. 268–279, 2008.

BERNSTEIN, B. E.; MEISSNER, A.; LANDER, E. S. The mammalian epigenome. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 669–681, 2007.

BETTEGOWDA, A. et al. Quantitative analysis of messenger RNA abundance

for ribosomal protein L-15, cyclophilin-A, phosphoglycerokinase, β -glucuronidase, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, β -actin, and histone H2A during bovine oocyte maturation and early embryogenesis i. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, n. 3, p. 267–278, 2006.

BIZUAYEHU, T. T. et al. Temperature during early development has long-term effects on microRNA expression in Atlantic cod. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 1–12, 2015.

BLANC, R. S.; RICHARD S. Arginine Methylation: The Coming of Age. **Molecular Cell**, v. 65, n. 1, p. 8–24, 2017.

BORCHERT, G. M.; LANIER, W.; DAVIDSON, B. L. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 13, n. 12, p. 1097–1101, 2006.

BOWMAN, GREGORY D.; POIRIER, MICHAEL G. Post-Translational Modifications of Histones That Influence Nucleosome Dynamics. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 6, p. 2274–2295, 2015.

BRECKENRIDGE, R. A. et al. A role for Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase 1 (DDAH1) in mammalian development. **International Journal of Developmental Biology**, v. 54, n. 1, p. 215–220, 2010.

BUCHBERGER, A.; BUKAU, B.; SOMMER, T. Protein quality control in the cytosol and the endoplasmic reticulum: brothers in arms. **Molecular Cell**, v. 40, n. 2, p. 238–252, 2010.

BURGER, K.; GULLEROVA, M. Swiss army knives: Non-canonical functions of nuclear Drosha and Dicer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 16, n. 7, p. 417–430, 2015.

CAI, X.; CULLEN, B. R. Transcriptional origin of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus micro-RNAs. **Journal of Virology**, v. 80, n. 5, p. 2234–2242, 2006

CAMARGO, L. S. A. et al. Absence of Sperm Factors as in the Parthenogenesis Does Not Interfere on Bovine Embryo Sensitiveness to Heat Shock at Pre-Implantation Stage. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51, n. 1, p. 3–9, 2016.

CASTRO, F. O. et al. MicroRNA expression profiling of elongated cloned and in vitro–fertilized bovine embryos. **Theriogenology**, v. 73, n. 1, p. 71–85, 2010.

CEDAR, H.; BERGMAN Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 5, p. 295–304, 2009.

CHABLE-BESSIA, C. et al. Suppression of HIV-1 replication by microRNA effectors. **Retrovirology**, v. 6, n. 26, p. 1–11, 2009.

CHASON, R. J. et al. Environmental and epigenetic effects upon preimplantation embryo metabolism and development. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 22, n. 10, p. 412–420, 2011.

CHEN, K. L. et al. Down-regulation of miR-181a can reduce heat stress damage in PBMCs of Holstein cows. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal**, v. 52, n. 8, p. 864–871, 2016.

CLAYTON, A. L.; HAZZALIN, C. A.; MAHADEVAN, L. C. Enhanced Histone Acetylation and Transcription: A Dynamic Perspective. **Molecular Cell**, v. 23, n. 3, p. 289–296, 2006.

D'ALESSIO, A. C.; SZYF, M. Epigenetic tête-à-tête: the bilateral relationship between chromatin modifications and DNA methylation This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled 27th International West Coast Chromatin and Chromosome Conference, a. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 84, n. 4, p. 463–466, 2006.

D'URSO, A.; BRICKNER, J. H. Mechanisms of epigenetic memory. **Trends in genetics**, v. 30, n. 6, p. 230–236, 2014.

DAI, E. et al. “EpimiR: a database of curated mutual regulation between miRNAs and epigenetic modifications.” **Database : the journal of biological databases and curation**, v. 2014 bau023, 2014.

DALCIN, V. C. et al. Physiological parameters for thermal stress in dairy cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 45, n. 8, p. 458–465, 2016.

DAMBACHER, S.; HAHN, M.; SCHOTTA, G. Epigenetic regulation of development by histone lysine methylation. **Heredity**, v. 105, n. 1, p. 24–37,

2010.

DA ROCHA, S. T. et al. Jarid2 Is Implicated in the Initial Xist-Induced Targeting of PRC2 to the Inactive X Chromosome. **Molecular Cell**, v. 53, n. 2, p. 301–316, 2014.

DAS, R.; et al. Impact of heat stress on health and performance of dairy animals: A review. **Veterinary world**, v. 9, n. 3, p. 260–268, 2016.

DASH, S. et al. Effect of heat stress on reproductive performances of dairy cattle and buffaloes: A review. **Veterinary World**, v. 9, n. 3, p. 235–244, 2016.

DAY, J. J.; SWEATT, J. D. DNA methylation and memory formation. **Nature Neuroscience**, v. 13, n. 11, p. 1319–1323, 2010.

DEANS, C.; MAGGERT, K. A. What Do You Mean, “Epigenetic”? **Genetics**, v. 199, n. 4, p. 887–896, 2015.

DE BARROS, F. R. O.; PAULA-LOPES, F. F. Cellular and epigenetic changes induced by heat stress in bovine preimplantation embryos. **Molecular Reproduction and Development**, p. 0–3, 2018.

DE RENSIS, F.; GARCIA-ISPIERTO, I.; LÓPEZ-GATIUS, F. Seasonal heat stress: Clinical implications and hormone treatments for the fertility of dairy cows. **Theriogenology**, v. 84, n. 5, p. 659–666, 2015.

DELCUVE, G. P.; KHAN, D. H.; DAVIE, J. R. Roles of histone deacetylases in epigenetic regulation: emerging paradigms from studies with inhibitors. **Clinical Epigenetics**. v. 4, n. 1, p. 5, 2012.

DENIS, H.; NDLOVU, M. N.; FUKS, F. Regulation of mammalian DNA methyltransferases: A route to new mechanisms. **EMBO Reports**, v. 12, n. 7, p. 647–656, 2011.

DETZER, A. et al. Cell stress is related to re-localization of Argonaute 2 and to decreased RNA interference in human cells. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 7, p. 2727–2741, 2011.

DÍAZ-GARCÍA, C. V. et al. Dicer1, Drosha and miRNAs in patients with non-small cell lung cancer: Implications for outcomes and histologic classification.

Carcinogenesis, v. 34, n. 5, p. 1031–1038, 2013.

DIKMEN, S.; HANSEN, P. J. Is the temperature-humidity index the best indicator of heat stress in lactating dairy cows in a subtropical environment? **Journal of dairy science**, v. 92, n. 1, p. 109–116, 2009.

DU, J. et al. DNA methylation pathways and their crosstalk with histone methylation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 16, n. 9, p. 519–532, 2015.

DUURSMA, A. M. et al. “miR-148 targets human DNMT3b protein coding region.” **RNA**, v. 14, n. 5, p. 872–877, 2008.

EALY, A. D.; DROST, M.; HANSEN, P. J.; Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. **Journal Dairy Science**, v. 76, n. 10, p. 2899–2905, 1993.

EDWARDS, J. L.; HANSEN, P. J. Elevated temperature increases heat shock protein 70 synthesis in bovine two-cell embryos and compromises function of maturing oocytes. **Biology of reproduction**, v. 55, n. 2, p. 341–346, 1996.

EDWARDS, J. L. et al. Exposure to a physiologically relevant elevated temperature hastens in vitro maturation in bovine oocytes. **Biology of dairy science**, v. 88, n. 12, p. 4326–4333, 2005.

ERICKSON, B. H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. **Journal of animal science**, v. 25, n. 3, p. 800–805, 1966.

FERREIRA, E. M. et al. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71, n. 5, p. 836–848, 2009.

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.

FIALHO, A. L. L. et al. Efeito do estresse térmico calórico agudo e crônico sobre a qualidade oocitária de bovinos de raças adaptadas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 1, p. 64–72, 2018.

FRANCIOSI, F. et al. Changes in histone H4 acetylation during in vivo versus in vitro maturation of equine oocytes. **Molecular Human Reproduction**, v. 18, n. 5, p. 243–252, 2012.

FRANCIOSI, F. et al. In vitro maturation affects chromosome segregation, spindle morphology and acetylation of lysine 16 on histone H4 in horse oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, n. 4, p. 721, 2015.

FRANKEL, L. B. et al. Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 2, p. 1026–1033, 2008.

FRÍAS-LASSERRE, D.; VILLAGRA, C. A. The Importance of ncRNAs as Epigenetic Mechanisms in Phenotypic Variation and Organic Evolution. **Frontiers in Microbiology**, v.8, p. 2483, 2017.

FRIEDMAN, R. C. et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. **Genome research**, v. 19, n. 1, p. 92–105, 2009.

FRIEDMAN, E. et al. Hormonal treatment before and after artificial insemination differentially improves fertility in subpopulations of dairy cows during the summer and autumn. **Journal of dairy science**, v. 97, n. 12, p. 7465–7475, 2014.

FUJISAWA, T.; FILIPPAKOPOULOS, P. Functions of bromodomain-containing proteins and their roles in homeostasis and cancer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 18, n. 4, p. 246–262, 2017.

FUKUOKA, M. et al. Gene silencing mediated by endogenous microRNAs under heat stress conditions in mammalian cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, 2014.

FUQUAY, J. W. Heat Stress as it Affects Animal Production. **Journal of Animal Science**, v. 52, n. 1, p. 164–174, 1 jan. 1981.

GAJIGAN, A. P.; CONACO, C. A microRNA regulates the response of corals to thermal stress. **Molecular Ecology**, v. 26, n. 13, p. 3472–3483, 2017.

GARZON, R. et al. MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene reexpression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1. **Blood**, v. 113, n. 25, p. 6411–

6418, 2009.

GENDELMAN, M. et al. 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. Seasonal Effect on Germinal Vesicle-Stage Bovine Oocytes Is Further Expressed by Alterations in Transcript Levels in the Developing Embryos Associated with Reduced Developmental Competence¹. **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 1, p. 1–9, 2012.

GIBSON, U. E.; HEID, C. A.; WILLIAMS, P. M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. **Genome research**, v. 6, n. 10, p. 995–1001, 1996.

GILCHRIST, G. C. et al. MicroRNA expression during bovine oocyte maturation and fertilization. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 3, 2016.

GRAF, A. et al. Genome activation in bovine embryos: Review of the literature and new insights from RNA sequencing experiments. **Animal Reproduction Science**, v. 149, n. 1–2, p. 46–58, 2014.

GRANDJEAN, V. et al. The miR-124-Sox9 paramutation: RNA-mediated epigenetic control of embryonic and adult growth. **Development**, v. 136, n. 21, p. 3647–3655, 2009.

GREGORY, R. I.; SHIEKHATTAR, R. **MicroRNA biogenesis and cancer** *Cancer Research*, 2005.

GRIFFITHS-JONES, S. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 90001, p. D140–D144, 2006.

GRIFFITHS-JONES, S. et al. miRBase: Tools for microRNA genomics. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. SUPPL. 1, p. 154–158, 2008.

GROSS, N.; KROPP, J.; KHATIB, H. MicroRNA Signaling in Embryo Development. **Biology**, v. 6, n. 3, p. 34, 2017.

GUÉNIN, S. et al. Normalization of qRT-PCR data: The necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. **Journal**

of **Experimental Botany**, v. 60, n. 2, p. 487–493, 2009.

HA, M.; KIM, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 8, p. 509–524, 16 ago. 2014.

HANSEN, P. J. To be or not to be-Determinants of embryonic survival following heat shock. **Theriogenology**, v. 68, n. SUPPL. 1, p. 40–48, 2007.

HANSEN, P. J.; FEAR, J. M. **Cheating death at the dawn of life: Developmental control of apoptotic repression in the preimplantation embryo****Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2011.

HARFE, B. D. MicroRNAs in vertebrate development. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 15, n. 4, p. 410–415, 2005.

HELLEMANS, J. et al. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. **Genome Biology**, v. 8, n. 2:R19, 2007.

HOFFMANN, I. Climate change and the characterization, breeding and conservation of animal genetic resources. **Animal Genetics**, v. 41, n. SUPPL. 1, p. 32–46, 2010.

HOLOCH, D.; MOAZED, D. RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression. **Nature Reviews Genetics**, v. 16, n. 2, p. 71–84, 2015.

HOSSAIN, M. M. et al. The role of microRNAs in mammalian oocytes and embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 134, n. 1–2, p. 36–44, 2012.

HU, H. et al. Heat-induced apoptosis and gene expression in bovine mammary epithelial cells. **Animal Production Science**, v. 56, n. 5, p. 918–926, 2016.

HU, Y. et al. MiR-1246 is upregulated and regulates lung cell apoptosis during heat stress in feedlot cattle. **Cell Stress and Chaperones**, v. 23, n. 6, p. 1219–1228, 2018.

HUA, S. et al. Scriptaid Improves In Vitro Development and Nuclear Reprogramming of Somatic Cell Nuclear Transfer Bovine Embryos . **Cellular Reprogramming**, v. 13, n. 5, p. 431–439, 2011.

HUANG, V. et al. Upregulation of Cyclin B1 by miRNA and its implications in

cancer. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 4, p. 1695–1707, fev. 2012.

HUANG, Y. et al. Long Non-coding RNA H19 Inhibits Adipocyte Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells through Epigenetic Modulation of Histone Deacetylases. **Scientific Reports**, v. 6, n. March, p. 1–13, 2016.

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.

IORIO, M. V.; PIOVAN, C.; CROCE, C. M. Interplay between microRNAs and the epigenetic machinery: An intricate network. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1799, n. 10–12, p. 694–701, 2010.

IPCC, 2014: Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, 151 pp.

IPCC, 2018: Summary for Policymakers. In: Global Warming of 1.5°C. An IPCC Special Report on the impacts of global warming of 1.5°C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change, sustainable development, and efforts to eradicate poverty [Masson-Delmotte, V., P. Zhai, H.-O. Pörtner, D. Roberts, J. Skea, P.R. Shukla, A. Pirani, W. Moufouma-Okia, C. Péan, R. Pidcock, S. Connors, J.B.R. Matthews, Y. Chen, X. Zhou, M.I. Gomis, E. Lonnoy, T. Maycock, M. Tignor, and T. Waterfield (eds.)]. World Meteorological Organization, Geneva, Switzerland, 32 pp

ISLAM, A. et al. An Exploration of Heat Tolerance in Mice Utilizing mRNA and microRNA Expression Analysis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, 2013.

ISPADA, J. et al. 193 INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-1 EXERTS A THERMOPROTECTIVE ROLE ON MITOCHONDRIAL FUNCTION OF BOVINE OOCYTES EXPOSED TO HEAT SHOCK. **Reproduction, Fertility & Development**, 2012.

JAIN, R.; IGLESIAS, N.; MOAZED, D. Distinct Functions of Argonaute Slicer in siRNA Maturation and Heterochromatin Formation. **Molecular Cell**, v. 63, n. 2,

p. 191–205, jul. 2016.

JIN, B.; LI, Y.; ROBERTSON, K. D. DNA methylation: Superior or subordinate in the epigenetic hierarchy? **Genes and Cancer**, v. 2, n. 6, p. 607–617, 2011.

JONAS, S.; IZAURRALDE, E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. **Nature Reviews Genetics**, v. 16, n. 7, p. 421–433, 2015.

JONES, P. A. Functions of DNA methylation: Islands, start sites, gene bodies and beyond. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 7, p. 484–492, 2012.

KAGEYAMA, S. et al. Alterations in epigenetic modifications during oocyte growth in mice. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 133, n. 1, p. 85–94, 2007.

KALO, D.; ROTH, Z. Involvement of the sphingolipid ceramide in heat-shock-induced apoptosis of bovine oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, 2011.

KANEDA, M. et al. Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. **Nature**, v. 429, n. 6994, p. 900–903, 2004.

KANHERE, A. et al. Short RNAs Are Transcribed from Repressed Polycomb Target Genes and Interact with Polycomb Repressive Complex-2. **Molecular Cell**, v. 38, n. 5, p. 675–688, jun. 2010.

KEHL, T. et al. About miRNAs, miRNA seeds, target genes and target pathways. **Oncotarget**, v. 8, n. 63, p. 107167–107175, 2017.

KHATUN, H. et al. Sericin enhances the developmental competence of heat-stressed bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 85, n. 8–9, p. 696–708, 2018.

KIM, D. H. et al. MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 42, p. 16230–5, 2008.

KIM, S. et al. MiRNA biogenesis-associated RNase III nucleases drosha and dicer are upregulated in colorectal adenocarcinoma. **Oncology Letters**, v. 14,

n. 4, p. 4379–4383, 2017.

KIM, V. N.; HAN, J.; SIOMI, M. C. Biogenesis of small RNAs in animals. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 2, p. 126–139, 2009.

KITAGAWA, N. et al. Downregulation of the microRNA biogenesis components and its association with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. **Cancer Science**, 2013.

KOZOMARA, A.; GRIFFITHS-JONES, S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. Database, p. D152–D157, 1 jan. 2011.

KOZOMARA, A.; GRIFFITHS-JONES, S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D68–D73, jan. 2014.

KREUZ, S.; FISCHLE, W. Oxidative stress signaling to chromatin in health and disease. **Epigenomics**, v. 8, n. 6, p. 843–862, jun. 2016.

KROEMER, G.; MARIÑO, G.; LEVINE, B. **Autophagy and the Integrated Stress Response** *Molecular Cell*, 2010.

KROL, J.; LOEDIGE, I.; FILIPOWICZ, W. **The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay** *Nature Reviews Genetics*, 2010.

KÜLTZ, D. MOLECULAR AND EVOLUTIONARY BASIS OF THE CELLULAR STRESS RESPONSE. **Annual Review of Physiology**, 2005.

KUMAR, S.; AJEET, K.; MEENA, K. Effect of Heat Stress in Tropical Livestock and Different Strategies for Its Amelioration. **Journal of Stress Physiology & Biochemistry**, v. 7, n. 1, p. 45–54, 2011.

KURDI, M. et al. Depletion of cellular glutathione modulates LIF-induced JAK1-STAT3 signaling in cardiac myocytes. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 44, n. 12, p. 2106–2115, 2012.

LEE, R. C.; AMBROS, V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. **Science**, 2001.

LEUNG, A. K. L.; SHARP, P. A. **MicroRNA Functions in Stress**

Responses *Molecular Cell*, 2010.

LEUTENEGGER, C. M. et al. Quantitation of bovine cytokine mRNA in milk cells of healthy cattle by real-time TaqMan® polymerase chain reaction. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 77, n. 3–4, p. 275–287, 2000.

LI, B.; CAREY, M.; WORKMAN, J. L. The Role of Chromatin during Transcription. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 707–719, 2007.

LI, D. et al. Identification of suitable endogenous control genes for quantitative RT-PCR analysis of miRNA in bovine solid tissues. **Molecular Biology Reports**, v. 41, n. 10, p. 6475–6480, 2014.

LI, E.; ZHANG, Y. DNA methylation in mammals. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 6, n. 5, p. 1–21, 2014.

LI, G.; REINBERG, D. Chromatin higher-order structures and gene regulation. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 21, n. 2, p. 175–186, 2011.

LI, L. et al. The effect of heat stress on gene expression, synthesis of steroids, and apoptosis in bovine granulosa cells. **Cell Stress and Chaperones**, v. 21, n. 3, p. 467–475, 2016.

LI, Q. et al. Characterization of miRNA profiles in the mammary tissue of dairy cattle in response to heat stress. **BMC Genomics**, v. 19, n. 1, p. 1–11, 2018.

LI, X. et al. A MicroRNA Imparts Robustness against Environmental Fluctuation during Development. **Cell**, 2009.

LI, X. et al. MicroRNA-224 delays oocyte maturation through targeting Ptx3 in cumulus cells. **Mechanisms of Development**, v. 143, p. 20–25, 2017.

LIANG, J. et al. Mitochondrial PKM2 regulates oxidative stress-induced apoptosis by stabilizing Bcl2. **Cell Research**, v. 27, n. 3, p. 329–351, 2017.

LIAO, J. et al. Targeted disruption of DNMT1, DNMT3A and DNMT3B in human embryonic stem cells. **Nature Genetics**, v. 47, n. 5, p. 469–478, 2015.

LIU, J. et al. Analysis of miRNA expression profiling in human umbilical vein

endothelial cells affected by heat stress. **International Journal of Molecular Medicine**, 2017.

LIU, S. et al. Identifying Hub Genes for Heat Tolerance in Water Buffalo (*Bubalus bubalis*) Using Transcriptome Data. **Frontiers in Genetics**, v. 10, n. March, p. 1–13, 2019.

LIU, T. et al. Epigenetic silencing of HDAC1 by miR-449a upregulates Runx2 and promotes osteoblast differentiation. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 35, n. 1, p. 238–246, 2015.

LIU, W. et al. MicroRNA and Embryo Implantation. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 75, n. 3, p. 263–271, 2016.

LIU, W.-M. et al. Sperm-borne microRNA-34c is required for the first cleavage division in mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2012.

LODDE, V. et al. 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, jun. 2007.

LODDE, V. et al. Oocyte morphology and transcriptional silencing in relation to chromatin remodeling during the final phases of bovine oocyte growth. **Molecular Reproduction and Development**, 2008.

LONERGAN, P. et al. Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality. **Reproduction**, v. 126, n. 3, p. 337–346, 2003.

MA, P.; SCHULTZ, R. M. Histone deacetylase 1 (HDAC1) regulates histone acetylation, development, and gene expression in preimplantation mouse embryos. **Developmental Biology**, v. 319, n. 1, p. 110–120, jul. 2008.

MAHDIPOUR, M. et al. Validating reference microRNAs for normalizing qRT-PCR data in bovine oocytes and preimplantation embryos. **BMC Developmental Biology**, v. 15, n. 1, p. 1–10, 2015.

MAHDY, A. K. H. et al. Studies on Gene Expression and Developmental Competence of Bovine Embryos Produced Under Different Conditions of Heat

Stress. In: **Trends and Advances in Veterinary Genetics**. [s.l.] InTech, 2017.

MAKEYEV, A. V.; LIEBHABER, S. A. The poly(C)-binding proteins: A multiplicity of functions and a search for mechanisms. **RNA**, v. 8, n. 3, p. S1355838202024627, mar. 2002.

MARTIENSSEN, R.; MOAZED, D. RNAi and Heterochromatin Assembly. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 8, p. a019323, 3 ago. 2015.

MARTÍNEZ-FRÍAS, M. L. Can our understanding of epigenetics assist with primary prevention of congenital defects? **Journal of Medical Genetics**, v. 47, n. 2, p. 73–80, 2010.

MASÉ, M. et al. Selection of reference genes is critical for miRNA expression analysis in human cardiac tissue. A focus on atrial fibrillation. **Scientific Reports**, v. 7, n. 41127, p. 1–10, 2017.

MATTERN, F. et al. Gene-specific profiling of DNA methylation and mRNA expression in bovine oocytes derived from follicles of different size categories. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, n. 10, p. 2040–2051, 2017.

MATTICK, J. S. et al. RNA regulation of epigenetic processes. **BioEssays**, v. 31, n. 1, p. 51–59, 2009.

MCGINTY, R. K.; TAN, S. Nucleosome structure and function. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 6, p. 2255–2273, 2015.

MENEZO, Y. J. R. et al. Oxidative stress and alterations in DNA methylation: two sides of the same coin in reproduction. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 33, n. 6, p. 668–683, 2016.

MENG, F. et al. MicroRNA-21 Regulates Expression of the PTEN Tumor Suppressor Gene in Human Hepatocellular Cancer. **Gastroenterology**, v. 133, n. 2, p. 647–658, ago. 2007.

MESTDAGH, P. et al. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. **Genome Biology**, v. 10, n. 6, 2009.

MESTDAGH, P. et al. Evaluation of quantitative mirnA expression platforms in the micrornA quality control (mirQC) study. **Nature Methods**, v. 11, n. 8, p.

809–815, 2014.

MEYER, S. U.; PFAFFL, M. W.; ULBRICH, S. E. Normalization strategies for microRNA profiling experiments: A “normal” way to a hidden layer of complexity? **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 12, p. 1777–1788, 2010.

MILES, J. R. et al. MicroRNA expression profile in bovine cumulus-oocyte complexes: Possible role of let-7 and miR-106a in the development of bovine oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 130, n. 1–2, p. 16–26, 2012.

MONDOU, E. et al. Analysis of micrnas and their precursors in bovine early embryonic development. **Molecular Human Reproduction**, v. 18, n. 9, p. 425–434, 2012.

MONTGOMERY, R. L. et al. Histone deacetylases 1 and 2 redundantly regulate cardiac morphogenesis, growth, and contractility. **Genes and Development**, v. 21, n. 14, p. 1790–1802, 2007.

MORAES, G. V. et al. Oocyte aspiration and *in vitro* embryo production in Jersey cows with selenium-supplemented diet. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 64, n. 4, p. 787–795, 2012.

MORALES, S.; MONZO, M.; NAVARRO, A. Epigenetic regulation mechanisms of microRNA expression. **BioMol. Concepts**, v. 8, n. 56, p. 203–212, 2017.

MORAN, Y. et al. The evolutionary origin of plant and animal microRNAs. **Nature Ecology and Evolution**, v. 1, n. 3, p. 1–8, 2017.

MOUSSA, M. et al. Maternal control of oocyte quality in cattle “a review”. **Animal Reproduction Science**, v. 155, p. 11–27, 2015.

MOUTINHO, C.; ESTELLER, M. **MicroRNAs and Epigenetics**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. v. 135.

MROCZEK, S.; DZIEMBOWSKI, A. U6 RNA biogenesis and disease association. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 4, n. 5, p. 581–592, 2013.

MÜLLER, P.B. *Bioclimatologia aplicada aos animais domésticos*. 3. Ed. Porto Alegre: Sulina, 1989. 262p.

NABENISHI, H. et al. The role of mitochondrial transition pores on bovine oocyte competence after heat stress, as determined by effects of cyclosporin A. **Molecular Reproduction and Development**, v. 79, n. 1, p. 31–40, 2012.

NABENISHI, H. et al. Conception rate of Holstein and Japanese Black cattle following embryo transfer in southwestern Japan. **Animal Science Journal**, n. April, 2018.

NARDONE, A. et al. Effects of climate changes on animal production and sustainability of livestock systems. **Livestock Science**, v. 130, n. 1–3, p. 57–69, 2010.

NEHAMMER, C. et al. Specific microRNAs regulate heat stress responses in *Caenorhabditis elegans*. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–8, 2015.

NEWMAN, M. A.; THOMSON, J. M.; HAMMOND, S. M. Lin-28 interaction with the Let-7 precursor loop mediates regulated microRNA processing. **Rna**, v. 14, n. 8, p. 1539–1549, 2008.

O'BRIEN, J. et al. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, n. AUG, p. 1–12, 2018.

O'DONNELL, K. A. et al. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. **Nature**, 2005.

OKAZAKI, Y. et al. Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs. **Nature**, v. 420, n. 6915, p. 563–573, 2002.

OLSON, E. N. et al. Compensatory functions of histone deacetylase 1 (HDAC1) and HDAC2 regulate transcription and apoptosis during mouse oocyte development. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 8, p. E481–E489, 2012.

OSKOWITZ, A. Z. et al. Drosha regulates hMSCs cell cycle progression through a miRNA independent mechanism. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 43, n. 11, p. 1563–1572, 2011.

PAES, V. M. et al. Effect of heat stress on the survival and development of *in vitro* cultured bovine preantral follicles and on *in vitro* maturation of cumulus–

oocyte complex. **Theriogenology**, v. 86, n. 4, p. 994–1003, 2016.

PALANGI, F. et al. Effects of oxidative and thermal stresses on stress granule formation in human induced pluripotent stem cells. **PLoS ONE**, v. 12, n. 7, p. 1–18, 2017.

PALAZZO, A. F.; LEE, E. S. Non-coding RNA: What is functional and what is junk? **Frontiers in Genetics**, v. 5, n. JAN, p. 1–11, 2015.

PAN, B.; TOMS, D.; LI, J. MicroRNA-574 suppresses oocyte maturation via targeting hyaluronan synthase 2 in porcine cumulus cells. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 314, n. 3, p. C268–C277, 2017.

PAN, W. et al. MicroRNA-21 and MicroRNA-148a Contribute to DNA Hypomethylation in Lupus CD4+ T Cells by Directly and Indirectly Targeting DNA Methyltransferase 1. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 12, p. 6773–6781, 2010.

PAULA-LOPES, F. . et al. Heat stress induced alteration in bovine oocytes : functional and cellular aspects. **Anim Reprod**, v. 9, n. 3, p. 395–403, 2012.

PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Heat-shock induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally-regulated phenomenon. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 4, p. 32–40, 2002.

PAVANI, K. et al. Reproductive performance of holstein dairy cows grazing in dry-summer subtropical climatic conditions: Effect of heat stress and heat shock on meiotic competence and in vitro fertilization. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 28, n. 3, p. 334–342, 2015.

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.

PAVANI, K. C. et al. The effect of kinetic heat shock on bovine oocyte maturation and subsequent gene expression of targeted genes. **Zygote**, 2017.

PAYTON, R. R. et al. Impact of Heat Stress Exposure During Meiotic Maturation on Oocyte, Surrounding Cumulus Cell, and Embryo RNA Populations. **Journal of Reproduction and Development**, v. 57, n. 4, p. 481–

491, 2011.

PAYTON, R. R. et al. Mitochondrial-related consequences of heat stress exposure during bovine oocyte maturation persist in early embryo development. **Journal of Reproduction and Development**, v. 64, n. 3, 2018.

PAYTON, R. R. et al. Susceptibility of Bovine Germinal Vesicle-Stage Oocytes from Antral Follicles to Direct Effects of Heat Stress In Vitro¹. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 4, p. 1303–1308, 2004.

PESCHANSKY, V. J.; WAHLESTEDT, C. Non-coding RNAs as direct and indirect modulators of epigenetic regulation. **Epigenetics**, v. 9, n. 1, p. 3–12, 13 jan. 2014.

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST(C)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 9, p. 36e–36, 2002.

PLACE, R. F.; NOONAN, E. J. Non-coding RNAs turn up the heat: An emerging layer of novel regulators in the mammalian heat shock response. **Cell Stress and Chaperones**, v. 19, n. 2, p. 159–172, 2014.

RAMAKERS, C. et al. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, v. 339, n. 1, p. 62–66, 2003.

REDDY, P. et al. Oocyte-Specific Deletion of Pten Causes Premature Activation of the Primordial Follicle Pool. **Science**, v. 319, n. 5863, p. 611–613, 1 fev. 2008.

REINHART, B. J. et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 901–906, 2000.

RENAUDEAU, D. et al. Adaptation to hot climate and strategies to alleviate heat stress in livestock production. **Animal**, v. 6, n. 5, p. 707–728, 2012.

RICE, J. C.; ALLIS, C. D. **Histone methylation versus histone acetylation: New insights into epigenetic regulation** *Current Opinion in Cell Biology*, 2001.

RIVERA, R. M. et al. Reorganization of Microfilaments and Microtubules by Thermal Stress in Two-Cell Bovine Embryos¹. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 6, p. 1852–1862, 2004.

RODRIGUES, T. A. et al. Thermoprotective effect of insulin-like growth factor 1 on *in vitro* matured bovine oocyte exposed to heat shock. **Theriogenology**, v. 86, n. 8, p. 2028–2039, 2016.

ROMAO, J. M. et al. Altered MicroRNA Expression in Bovine Subcutaneous and Visceral Adipose Tissues from Cattle under Different Diet. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. e40605, 10 jul. 2012.

RONALDSON, P. T.; BENDAYAN, R. HIV-1 viral envelope glycoprotein gp120 produces oxidative stress and regulates the functional expression of multidrug resistance protein-1 (Mrp1) in glial cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 106, n. 3, p. 1298–1313, 2008.

ROTH, Z. Effect of Heat Stress on Reproduction in Dairy Cows: Insights into the Cellular and Molecular Responses of the Oocyte. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 5, n. 1, p. 151–170, 2017.

ROTH, Z. Stress-induced alterations in oocyte transcripts are further expressed in the developing blastocyst. **Molecular Reproduction and Development**, n. July, p. 1–15, 25 ago. 2018.

ROTH, Z.; HANSEN, P. J. Involvement of Apoptosis in Disruption of Developmental Competence of Bovine Oocytes by Heat Shock During Maturation¹. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 6, p. 1898–1906, 2004.

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.

ROTHBART, S. B.; STRAHL, B. D. Interpreting the language of histone and DNA modifications. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1839, n. 8, p. 627–643, ago. 2014.

RUST, J. M. The impact of climate change on extensive and intensive livestock production systems. **Animal Frontiers**, v. 9, n. 1, p. 20–25, 2018.

SADAKIERSKA-CHUDY, A.; FILIP, M. A Comprehensive View of the Epigenetic Landscape. Part II: Histone Post-translational Modification, Nucleosome Level, and Chromatin Regulation by ncRNAs. **Neurotoxicity Research**, v. 27, n. 2, p. 172–197, 2014.

SAKATANI, M. et al. Heat shock-derived reactive oxygen species induce embryonic mortality in in vitro early stage bovine embryos. **The Journal of reproduction and development**, v. 54, n. 6, p. 496–501, 2008.

SAKATANI, M. et al. Consequences of physiological heat shock beginning at the zygote stage on embryonic development and expression of stress response genes in cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 6, p. 3080–3091, 2012.

SAKATANI, M. et al. Changes in the transcriptome of morula-stage bovine embryos caused by heat shock: Relationship to developmental acquisition of thermotolerance. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 11, n. 1, p. 1, 2013.

SAKATANI, M. Effects of heat stress on bovine preimplantation embryos produced *in vitro*. **J. Reprod. Dev**, v. 63, n. 4, p. 347–352, 2017.

SAKATANI, M.; KOBAYASHI, S. I.; TAKAHASHI, M. Effects of Heat Shock on in Vitro Development and Intracellular Oxidative State of Bovine Preimplantation Embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 67, n. 1, p. 77–82, 2004.

SATO, F. et al. MicroRNAs and epigenetics. **FEBS Journal**, v. 278, n. 10, p. 1598–1609, maio 2011.

SCHAEFER, A. et al. Suitable reference genes for relative quantification of miRNA expression in prostate cancer. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 42, n. 11, p. 749–758, 2010.

SCHEEL, T. K. H. et al. Global mapping of miRNA-target interactions in cattle (*Bos taurus*). **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.

SCHROEDER, D. I. et al. Early Developmental and Evolutionary Origins of Gene Body DNA Methylation Patterns in Mammalian Placentas. **PLoS Genetics**, v. 11, n. 8, p. 1–20, 2015.

SCHULTZ, M. D. et al. Human body epigenome maps reveal noncanonical DNA methylation variation. **Nature**, v. 523, n. 7559, p. 212–216, 1 jul. 2015.

SCHWARZ, D. S. et al. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. **Cell**, 2003.

SCHWARZENBACH, H. et al. Which is the accurate data normalization strategy for microRNA quantification? **Clinical chemistry**, v. 61, n. 11, p. 1333, 2015.

SENGAR, G. S. et al. Differential expression of microRNAs associated with thermal stress in Frieswal (Bos taurus x Bos indicus) crossbred dairy cattle. **Cell Stress and Chaperones**, v. 23, n. 1, p. 155–170, 2018.

SHOGREN-KNAAK, M. et al. Histone H4–K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. **Science**, v. 311, n. February, p. 844–847, 2006.

SHUKLA, G. C.; SINGH, J.; BARIK, S. MicroRNAs: Processing, Maturation, Target Recognition and Regulatory Functions. **Molecular and Cellular Pharmacology**, v. 3, n. 3, p. 83–92, out. 2011.

SILVA, C. F. et al. Effects of heat stress on development, quality and survival of Bos indicus and Bos taurus embryos produced *in vitro*. **Theriogenology**, v. 79, n. 2, p. 351–357, 2013.

SINHA, P. B. et al. MicroRNA-130b is involved in bovine granulosa and cumulus cells function , oocyte maturation and blastocyst formation. p. 1–18, 2017.

SIRARD, M. A. et al. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 126–136, 2006.

SIRARD, M. A. The influence of in vitro fertilization and embryo culture on the embryo epigenetic constituents and the possible consequences in the bovine model. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 8, n. 4, p. 411–417, 2017.

SOMAL, A.; AGGARWAL, A.; UPADHYAY, R. C. Effect of thermal stress on expression profile of apoptosis related genes in peripheral blood mononuclear cells of transition Sahiwal cow. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 16,

n. 2, p. 137–143, 2015.

SON, M. J. et al. HSP90 Inhibitor, 17-AAG, Affects Meiotic Maturation and Preimplantation Embryos Development in Pigs. **Biology of Reproduction**, v. 83, p. Suppl_1, p. 256, 2010.

SONG, C. et al. PPAR γ is regulated by miR-27b-3p negatively and plays an important role in porcine oocyte maturation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 479, n. 2, p. 224–230, 2016.

SONTAKKE, S. D. et al. Characterization of microRNAs differentially expressed during bovine follicle development. **Reproduction**, 2014.

SPRIGGS, K. A.; BUSHELL, M.; WILLIS, A. E. **Translational Regulation of Gene Expression during Conditions of Cell Stress** *Molecular Cell*, 2010.

TAKEBAYASHI, S. -I. et al. Major and Essential Role for the DNA Methylation Mark in Mouse Embryogenesis and Stable Association of DNMT1 with Newly Replicated Regions. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 23, p. 8243–8258, 1 dez. 2007.

TAM, O. H. et al. Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes. **Nature**, v. 453, n. 7194, p. 534–538, 22 maio 2008.

TANG, R. et al. MiR-let-7a inhibits cell proliferation, migration, and invasion by down-regulating PKM2 in gastric cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 5, p. 28226–28236, 2016.

TESFAYE, D. et al. Identification and expression profiling of microRNAs during bovine oocyte maturation using heterologous approach. **Molecular Reproduction and Development**, 2009.

TICIANELLI, J. S. et al. Gene expression profile in heat-shocked Holstein and Nelore oocytes and cumulus cells. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, n. 9, p. 1787–1802, 2017.

TREMBLAY, R. et al. Metabolic stress induces modifications in the epigenetic program of preimplantation bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 8, n. April, p. 411–417, 2017.

TRIANTAPHYLLOPOULOS, K. A.; IKONOMOPOULOS, I.; BANNISTER, A. J. Epigenetics and inheritance of phenotype variation in livestock. **Epigenetics and Chromatin**, v. 9, n. 1, p. 1–18, 2016.

TRIPURANI, S. K. et al. Cloning and analysis of fetal ovary microRNAs in cattle. **Animal Reproduction Science**, 2010.

TRUEDELLE, S. S. et al. MicroRNA-mediated mRNA translation activation in quiescent cells and oocytes involves recruitment of a nuclear microRNP. **Scientific Reports**, 2012.

TSCHERNER, A. et al. MicroRNA-34 family expression in bovine gametes and preimplantation embryos. **Reproductive Biology and Endocrinology**, 2014.

VAN KRUIJSBERGEN, I.; HONTELEZ, S.; VEENSTRA, G. J. C. Recruiting polycomb to chromatin. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 67, p. 177–187, 2015.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology**, v. 3, 2002.

VERDIN, E.; OTT, M. 50 years of protein acetylation: From gene regulation to epigenetics, metabolism and beyond. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 16, n. 4, p. 258–264, 2015.

WANG, F. et al. Reciprocal regulation between microRNAs and epigenetic machinery in colorectal cancer. **Oncology Letters**, v. 13, n. 3, p. 1048–1057, 2017.

WANG, L. et al. Mitochondrial functions on oocytes and preimplantation embryos. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, v. 10, n. 7, p. 483–492, 2009.

WANG, Y. C.; PETERSON, S. E.; LORING, J. F. Protein post-translational modifications and regulation of pluripotency in human stem cells. **Cell Research**, v. 24, n. 2, p. 143–160, 2014.

WANG, Y. et al. DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. **Nature Genetics**, 2007.

WEI, J. W. et al. Non-coding RNAs as regulators in epigenetics (Review). **Oncology Reports**, v. 37, n. 1, p. 3–9, 2017.

WEN, B. Q. et al. The histone deacetylase inhibitor Scriptaid improves invitro developmental competence of ovine somatic cell nuclear transferred embryos. **Theriogenology**, v. 81, n. 2, p. 332–339, 2014.

WEYRICH, A. et al. Paternal heat exposure causes DNA methylation and gene expression changes of Stat3 in Wild guinea pig sons. **Ecology and Evolution**, v. 6, n. 9, p. 2657–2666, 2016.

WIENHOLDS, E. et al. The microRNA-producing enzyme Dicer1 is essential for zebrafish development. **Nature Genetics**, 2003.

WOZNIAK, G. G.; STRAHL, B. D. Hitting the “mark”: Interpreting lysine methylation in the context of active transcription. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1839, n. 12, p. 1353–1361, 2014.

WRIGHT, E. C. et al. MicroRNA-21 and PDCD4 expression during *in vitro* oocyte maturation in pigs. **Reproductive Biology and Endocrinology**, 2016.

WU, G. et al. MicroRNA-145-3p suppresses proliferation and promotes apoptosis and autophagy of osteosarcoma cell by targeting HDAC4. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 0, n. 0, p. 1–8, 2018a.

WU, H. et al. Epigenetic regulation in B-cell maturation and its dysregulation in autoimmunity. **Cellular and Molecular Immunology**, n. August 2017, p. 1–9, 2018b.

XIAO, G. et al. MiR-133b regulates the expression of the actin protein TAGLN2 during oocyte growth and maturation: A potential target for infertility therapy. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. 1–9, 2014.

XIE, H. et al. miR-377 induces senescence in human skin fibroblasts by targeting DNA methyltransferase 1. **Cell Death and Disease**, v. 8, n. 3, p. e2663, 2017.

XU, Y. et al. MicroRNA-34c regulates porcine granulosa cell function by targeting forkhead box O3a. **Journal of Integrative Agriculture**, 2017.

YAN, J. et al. One-step real time RT-PCR for detection of microRNAs. **Talanta**, v. 110, p. 190–195, jun. 2013.

YANG, C.-X. et al. Small RNA Profile of the Cumulus-Oocyte Complex and Early Embryos in the Pig1. **Biology of Reproduction**, 2012.

YANG, D.-H.; MOSS, E. G. Temporally regulated expression of Lin-28 in diverse tissues of the developing mouse. **Gene Expression Patterns**, v. 3, n. 6, p. 719–726, dez. 2003.

YANG, Q. et al. Stress Induces p38 MAPK-Mediated Phosphorylation and Inhibition of Drosha-Dependent Cell Survival. **Molecular Cell**, v. 57, n. 4, p. 721–734, fev. 2015.

YANG, Y.; YU, X. Regulation of apoptosis: the ubiquitous way. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, 2003.

YOUSEF, M.K., 1985. Thermoneutral zone. In: Stress Physiology in Livestock. CRC Press, Boca Raton, FL, Vol 1; pp. 67-74.

YU, J. et al. Integrating miRNA and mRNA expression profiles in response to heat stress-induced injury in rat small intestine. **Functional and Integrative Genomics**, v. 11, n. 2, p. 203–213, 2011.

YUAN, S. et al. Breeding scheme and maternal small RNAs affect the efficiency of transgenerational inheritance of a paramutation in mice. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–10, 2015.

YUE, M. X. et al. Abnormal DNA methylation in oocytes could be associated with a decrease in reproductive potential in old mice. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 29, n. 7, p. 643–650, 2012.

ZENG, Y.; CULLEN, B. R. Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. **Nucleic Acids Research**, 2004.

ZENG, Y.; YI, R.; CULLEN, B. R. Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. **EMBO Journal**, 2005.

ZERNICKA-GOETZ, M.; MORRIS, S. A.; BRUCE, A. W. **Making a firm decision: Multifaceted regulation of cell fate in the early mouse embryo***Nature Reviews Genetics*, 2009.

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.

ZHANG, H. et al. MicroRNA 376a regulates follicle assembly by targeting PcnA in fetal and neonatal mouse ovaries. **Reproduction**, 2014a.

ZHANG, Y. et al. MiR-130a regulates neurite outgrowth and dendritic spine density by targeting MeCP2. **Protein and Cell**, v. 7, n. 7, p. 489–500, 2016.

ZHANG, Q. et al. IL-2R common γ -chain is epigenetically silenced by nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase (NPM-ALK) and acts as a tumor suppressor by targeting NPM-ALK. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 29, p. 11977–11982, 19 jul. 2011.

ZHANG, W. et al. Global epigenetic regulation of MicroRNAs in multiple myeloma. **PLoS ONE**, 2014b.

ZHAO, J. et al. Regulation of Non-coding RNAs in Heat Stress Responses of Plants. **Frontiers in plant science**, v. 7, n. August, p. 1213, 2016.

ZHAO, L. Y. et al. MeCP2, a target of miR-638, facilitates gastric cancer cell proliferation through activation of the MEK1/2–ERK1/2 signaling pathway by upregulating GIT1. **Oncogenesis**, v. 6, n. 7, p. e368, 2017.

ZHAO, Y.; SUN, H.; WANG, H. Long noncoding RNAs in DNA methylation: New players stepping into the old game. **Cell and Bioscience**, v. 6, n. 1, p. 1–6, 2016.

ZHENG, Y.; LIU, L.; SHUKLA, G. C. A comprehensive review of web-based non-coding RNA resources for cancer research. **Cancer Letters**, v. 407, n. August, p. 1–8, 2017.

ZHENG, Y. et al. Identification and bioinformatics analysis of microRNAs associated with stress and immune response in serum of heat-stressed and normal Holstein cows. **Cell Stress and Chaperones**, v. 19, n. 6, p. 973–981,

2014.

ZHU, Y. et al. Downregulated miR-29a/b/c during contact inhibition stage promote 3T3-L1 adipogenesis by targeting DNMT3A. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. 1–12, 2017.