

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**DETERMINAÇÃO DO TAMANHO E QUANTIFICAÇÃO DOS EXOSSOMOS
UTERINOS EM GESTAÇÕES BOVINAS PRODUZIDAS POR INSEMINAÇÃO
ARTIFICIAL E POR FERTILIZAÇÃO *IN VITRO***

Maria da Conceição Gonçalves Macêdo

Areia - PB
Março de 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**DETERMINAÇÃO DO TAMANHO E QUANTIFICAÇÃO DOS EXOSSOMOS
UTERINOS EM GESTAÇÕES BOVINAS PRODUZIDAS POR INSEMINAÇÃO
ARTIFICIAL E POR FERTILIZAÇÃO *IN VITRO***

Maria da Conceição Gonçalves Macêdo
Orientadora: Prof. Dra. Danila Barreiro Campos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestra em Ciência Animal.

2018

**Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação**

M141d Macêdo, Maria da Conceição Gonçalves.

Determinação do tamanho e quantificação dos exossomos uterinos em gestações bovinas produzidas por inseminação artificial e por fertilização in vitro / Maria da Conceição Gonçalves Macêdo. - Areia, 2018.

36 f. : il.

Orientação: Danila Barreiro Campos.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCA.

1. Ciência Animal. 2. Vesículas extracelulares. 3. Comunicação materno-fetal. 4. Bovinos - gestação. 5. Exossomos uterinos. I. Campos, Danila Barreiro. II. Título.

UFPB/BC

MARIA DA CONCEIÇÃO GONÇALVES MACÊDO

**DETERMINAÇÃO DO TAMANHO E QUANTIFICAÇÃO DOS EXOSSOMOS
UTERINOS EM GESTAÇÕES BOVINAS PRODUZIDAS POR INSEMINAÇÃO
ARTIFICIAL E POR FERTILIZAÇÃO *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestra em Ciência Animal.

APROVADA EM 26 / 03/ 2018.

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Danila Barreiro Campos

DCV/CCA/UFPB

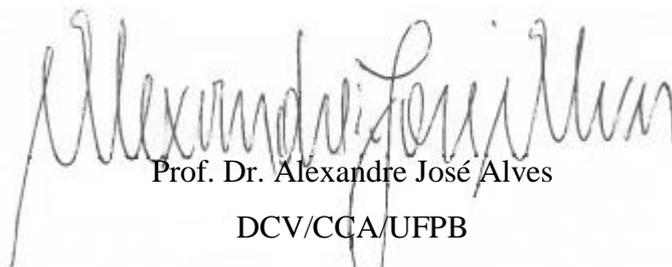
Orientadora



Prof. Dra. Norma Lúcia de Souza Araújo

DCV/CCA/UFPB

Examinadora



Prof. Dr. Alexandre José Alves

DCV/CCA/UFPB

Examinador

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Maria da Conceição Gonçalves Macêdo – Nascida em Alagoa Grande, Paraíba, no dia 22 de novembro de 1993. Possui graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal da Paraíba, Campus II, Areia – PB.

Ao meu bom Deus pelo dom da vida, que sem seu consentimento não seria capaz de nada. Aos meus queridos pais João Faustino e Joselene Gonçalves. Meu tio Antônio Gonçalves, quem me passou todo seu amor para com os animais. Aos meus avós Maria do Carmo e Antônio Gonçalves e a Natan Guerra, que sempre esteve ao meu lado me apoiando em todas as dificuldades que encontrei.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus por essa oportunidade e pelos amigos e professores que colocou em meu caminho que cuja sabedoria nos leva a discernir o caminho certo do errado, do bem e do mal.

Aos meus pais João e Joselene, que me deram a vida e ensinaram a vivê-la com dignidade, iluminando os caminhos obscuros com afeto e dedicação para que eu trilhasse sem medo e cheia de esperança. Pela constante dedicação durante toda minha vida acadêmica, agradeço a vocês, pai e mãe, por toda confiança e afeto que puseram em mim.

De forma especial ao meu noivo Natan Guerra pelo apoio incansável em todos os momentos sempre acreditando em mim, me incentivando, apoiando minhas escolhas, me ajudando, pessoa que com muito amor, carinho e paciência, aguentou todos os meus estresses e abusos. Obrigada meu amor!

A todos meus familiares: avós, tios, tias, primos e primas que se fizeram presente me apoiando e incentivando no decorrer desses longos anos da minha caminhada acadêmica, compreendendo minha ausência em cada data comemorativa, apoiando minhas viagens inesperadas, me abrigando em cada experimento, sempre com uma palavra de carinho e um amor inexplicável, amo muito vocês, meu muito obrigada!

As minhas irmãs do coração Nágila, Alciely e Anne, com quem compartilho minha vida desde o ensino fundamental, estando sempre me apoiando e me incentivando. Muito obrigada por tudo meninas!

A Naira pela força e apoio no decorrer desses sete anos de irmandade, compartilhando a vida, o mesmo teto e a mesma família, pessoa que sempre vem com uma palavra de Deus confortando nos momentos de turbulências. Obrigada por tudo Lopes, por todos os conselhos e puxões de orelha, obrigada por esta sempre presente na minha vida e ser essa minha irmã do coração.

A Edlania Maria, uma enviada de Deus na minha vida, que aos pouquinhos, além de dividirmos apartamento passamos a compartilhar a vida, se tornando uma grande amiga que levarei sempre comigo. Me acompanhou e me aguentou durante todo esse trabalho, me incentivou, apoiou, chorou comigo e riu também, comemos muitas gordices e também tentamos entrar em uma vida “fit” e que por várias vezes fomos a psicóloga uma da outra... obrigada por tudo!

Agradeço aos meus Vet's Ostentação (Neri, Camila, Ingrid, João, Rodrigo, Thiago e André), pela força, amizade, brincadeiras e momentos de distrações. Obrigada meus Vet's preferidos!

Aos anjos que Deus colocou em minha vida nesse período, em especial, Neto Pipoca (do CCA à ESALQ), Luciane (Lu), Mariana (Mari). Vocês são presentes de Deus na minha vida! E a todos da vila acadêmica da pós-graduação da ESALQ. Sou muito grata a vocês por toda acolhida, carinho e amizade. Levarei vocês sempre comigo, muito obrigada por tudo!

A todos meus amigos verdadeiros do Centro de Ciências Agrárias da UFPB, por todas as conversas de apoio, momentos de descontração, sou muito grata por ter vocês no decorrer desses sete anos de CCA. Muito obrigada!

Agradeço aos alunos das disciplinas de Reprodução dos Animais Domésticos, período de 2016.1 (turma da Zootecnia) e Anatomia dos Animais Domésticos I, período de 2016.2 (turma de Medicina Veterinária), as quais realizei meu estágio docência, por todo aprendizado compartilhado.

À Universidade de São Paulo, Campus da ESALQ na pessoa do professor Roberto Sartori. A todos que fazem a Fazenda Figueira – Londrina – PR. A USP Campus de Pirassununga, professor Juliano Silveira e Alessandra Bridi. A todos os funcionários do Frigorífico 3R – Loanda – PR e Frigorífico Big Boy – Londrina – PR. Ao professor Alexandre da Universidade Estadual de Londrina, Campus Cidade Gaúcha – PR, por todo apoio no desenvolvimento desse trabalho, sou muito grata a todos vocês!

Aos professores e funcionários do Centro de Ciências Agrárias que se fizeram presentes durante minha vida acadêmica na UFPB (graduação e mestrado), instituição que vem contribuindo no meu crescimento e amadurecimento pessoal e profissional. Agradeço em especial ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, aos coordenadores e vice coordenadores que estiveram à frente do programa, por todo empenho, compreensão e conselhos. Aos secretários Jaldir e Jozenio por toda paciência e conversas de incentivo durante esses dois anos de convivência. A todos por todo o carinho e apoio, muito obrigada.

Ao Laboratório de Anatomia dos Animais Domésticos e ao Laboratório de Biologia Molecular, na pessoa da professora Danila Barreiro Campos por ter me guiando pelos caminhos da ciência, empenhando-se para que possa atingir o meu máximo. Muito obrigada professora!

Enfim, a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
Resumo Geral	xii
Overview	xiii
Considerações Gerais	14
Capítulo I - DETERMINAÇÃO DO TAMANHO E QUANTIFICAÇÃO DOS EXOSSOMOS UTERINOS EM GESTAÇÕES BOVINAS PRODUZIDAS POR INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL E POR FERTILIZAÇÃO <i>IN VITRO</i>	20
RESUMO	21
ABSTRACT	21
INTRODUÇÃO	22
MATERIAIS E MÉTODOS	23
Animais e coleta de amostras.....	23
Isolamento das microvesículas extracelulares	24
Análise do tamanho e da concentração dos exossomos	24
Análise estatística.....	24
RESULTADOS	25
DISCUSSÃO	26
CONCLUSÕES	28
REFERENCIAS	28
Considerações Finais	33
Referências	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tamanho dos exossomos (nm) presentes no fluido uterino de vacas não gestantes e gestantes em diferentes períodos gestacionais. C18: não gestante dia 18 do ciclo estral; IA18: gestação obtida por IA no dia 18; FIV18: gestação obtida por FIV no dia 18; IA32: gestação obtida por IA no dia 32; FIV32: gestação obtida por FIV no dia 32..... 25

Figura 2. Concentração dos exossomos (partículas/ml) presentes no fluido uterino de vacas não gestantes e gestantes em diferentes períodos gestacionais. C18: não gestante dia 18 do ciclo estral; IA18: gestação obtida por IA no dia 18; FIV18: gestação obtida por FIV no dia 18; IA32: gestação obtida por IA no dia 32; FIV32: gestação obtida por FIV no dia 32. 26

DETERMINAÇÃO DO TAMANHO E QUANTIFICAÇÃO DOS EXOSSOMOS UTERINOS EM GESTAÇÕES BOVINAS PRODUZIDAS POR INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL E POR FERTILIZAÇÃO *IN VITRO*

Resumo Geral

As bases moleculares envolvidas no sucesso gestacional não estão totalmente definidas em todas as espécies. O fluido uterino contém uma variedade de nutrientes, proteínas, lipídeos e vesículas extracelulares, incluindo exossomos, provenientes de diversos tipos celulares de origem materna ou fetal. Os exossomos presentes no fluido uterino atuam na comunicação materno-fetal sendo capazes de transportar proteínas, moléculas de RNAm e microRNAs. O objetivo desse estudo foi determinar o tamanho e quantificar os exossomos presentes no fluido uterino de vacas não prenhes e prenhes por inseminação artificial (IA) e por fertilização *in vitro* em diferentes períodos gestacionais. As microvesículas extracelulares uterinas foram isoladas por centrifugação, o tamanho e a concentração dos exossomos foram analisados utilizando o *NanoSight NS300*. Observou-se aumento significativo na concentração dos exossomos do grupo IA 18 para o IA 32 e uma tendência de aumento na concentração do grupo FIV 18 para o grupo FIV 32. Os dados indicam que a concentração dos exossomos uterinos aumenta com a evolução da gestação, sendo necessário estudos em outras idades gestacionais e ainda estudos que determinem o conteúdo e origem desses exossomos, tornando possível elucidar questões relacionadas a comunicação materno-fetal, bem como as diferenças observadas na viabilidade de gestações oriundas de inseminação artificial e fertilização *in vitro*.

Palavras-chave: Vesículas extracelulares, comunicação materno-fetal, bovinos.

DETERMINATION OF SIZE AND QUANTIFICATION OF UTERINE EXOSOMES IN BOVINE GESTATIONS PRODUCED BY ARTIFICIAL INSEMINATION AND IN VITRO FERTILIZATION

Overview

Molecular basis involved in successful pregnancy is not fully defined in all species. Uterine fluid contains a variety of nutrients, proteins, lipids and extracellular vesicles, including the exosomes, excreted by different cell types of maternal or fetal origin. The exosomes present in uterine fluid modulate maternal-fetal communication, transporting proteins, mRNA molecules and microRNAs. The objective of this study was to determine the size and quantify the exosomes present in the uterine fluid of non-pregnant and pregnant cows from artificial insemination (AI) and *in vitro* fertilization (IVF), in different gestational periods. The uterine fluid was collected by uterine lavage on day 18 of the estrous cycle and at 18 and 32 days of gestation. Extracellular uterine microvesicles were isolated by centrifugation; the size and concentration of the exosomes were analyzed using the *NanoSight NS300*. There was a significant increase in the concentration of exosomes from group AI18 to AI32 and a tendency of concentration increase from group IVF 18 to group IVF 32. Data indicate that the concentration of uterine exosomes increases with the evolution of gestation. Studies in other gestational ages and studies that determine the content and origin of these exosomes are necessary, contributing to elucidate questions related to maternal-fetal communication, as well as the differences observed in the viability of pregnancies obtained by artificial insemination and *in vitro* fertilization.

keywords: Extracellular vesicles, maternal-fetal communication, bovine.

Considerações Gerais

A bovinocultura brasileira representa o segundo maior rebanho bovino do mundo, possuindo mais de 210 milhões de animais, responsável por 17% da produção mundial de carne bovina (MAPA, 2016). O desempenho reprodutivo do rebanho bovino é um dos fatores determinantes para eficiência produtiva da bovinocultura, contribuindo para o aumento da lucratividade da pecuária (SILVEIRA et al., 2004).

O período gestacional corresponde ao intervalo entre o acasalamento fértil e o parto, sofrendo interferência de diversos fatores, como maternos, fetais, genéticos e ambientais, e tem duração de 280 dias nos bovinos (HAFEZ, 2004).

O sucesso gestacional envolve diversos mecanismos e tipos celulares (DAHER; MATTAR, 2009), dependendo de um complexo e coordenado estabelecimento de comunicação materno-fetal; essa interação entre a mãe e o feto ocorre durante o período de pré-implantação, fase de implantação e o desenvolvimento da placenta (SALAMONSEN et al., 2009).

O período de pré-implantação compreende desde a cópula/inseminação até aproximadamente o 17º dia após a fecundação. As interações entre o embrião e o epitélio uterino são igualmente complexas e essenciais para o estabelecimento da gestação. Problemas durante esse período de pré-implantação desempenham um papel significativo, contribuindo com uma alta taxa de mortalidade embrionária (GOFF, 2002).

As reações que desencadeiam o processo de implantação necessitam especialmente de níveis críticos de progesterona e estrógeno. A secreção de progesterona está intimamente relacionada a manutenção da gestação (INSKEEP; DAILEY, 2005), seguida do estrógeno que atua no endométrio provocando a proliferação do epitélio e crescimento dos ductos das glândulas endometriais. A progesterona atua sinergicamente ao estrógeno participando da formação do leite uterino, o qual nutre o embrião antes da implantação (LIMA; SOUZA, 2009).

A formação do blastocisto é necessária para o processo de implantação assim como o estabelecimento da gestação (WATSON; NATALE; BARCROFT, 2004), a implantação nos bovinos inicia-se no 11º dia com o termino próximo aos 40 dias de gestação, ficando o embrião durante esse período livre no corno uterino (JUNIOR; MARTELLI, 2014).

A implantação tem início em um microambiente uterino que apresenta alta complexidade, contendo uma variedade de nutrientes, proteínas, lipídios e outras moléculas, incluindo vesículas extracelulares de comunicação, oriundas do endométrio, tubas uterinas e também do concepto, o qual está em constante mudança durante toda fase de implantação (SALAMONSEN et al., 2013). Nessa fase inicial, ocorrem diversos fenômenos mecânicos e biológicos, onde o embrião sintetiza substâncias como as citocinas, enzimas, prostaglandinas, hormônios e outras ainda desconhecidas que são reguladores do crescimento fetal e importantes durante toda gestação (PRESTES; LANDIM-ALVARENGA, 2006; ROY CHOUDHURY; KNAPP, 2000).

O reconhecimento materno da gestação ocorre com a sinalização da presença do concepto para a mãe, envolvendo uma série de eventos hormonais, como secreção de progesterona, manutenção do corpo lúteo (PEREIRA et al., 2015) e liberação de sinalizadores essenciais para sobrevivência e desenvolvimento do embrião (IMAKAWA; CHANG; CHRISTENSON, 2004); ocorrem adaptações maternas desde o período de pré-implantação, as quais são indispensáveis para manutenção da gestação (MINCHEVA-NILSSON et al., 2006; TAYLOR; AKYOL; GERCEL-TAYLOR, 2006).

O momento em que ocorre o reconhecimento materno da gestação varia entre as espécies, nos ruminantes ocorre por volta do 15º dia, período em que o embrião se apresenta em fase de blastocisto e produz substâncias luteotróficas e antiluteolíticas, com destaque para o interferon-tau (INF- τ) (DEMMERS; DERECKA; FLINT, 2001).

O INF- τ é uma proteína produzida por células trofoblásticas (HAFEZ, 2004) que age bloqueando a prostaglandina (PGF2 α) endometrial impedindo a luteólise, mantendo assim o corpo lúteo e sua secreção de progesterona (MARQUES et al., 2007). No reconhecimento imunológico da gestação o IFN- τ age junto à prostaglandina inibindo a proliferação de linfócitos aparentemente regulando a produção de citocinas pelos linfócitos endometriais (DAHER; MATTAR, 2009).

A relação materno-fetal torna-se mais estreita quando há formação placentária, podendo ocorrer trocas de substâncias vitais para sobrevivência e desenvolvimento embrionário (IMAKAWA; CHANG; CHRISTENSON, 2004). Conhecida como um órgão intermediário entre a mãe e o feto, a placenta é responsável pelo suprimento de oxigênio, remoção de detritos, produção e secreção hormonal e fatores de crescimento (MINCHEVA-NILSSON et al., 2006), estando diretamente relacionada com o

metabolismo fetal, responsável pelas trocas de nutrientes durante toda gestação (GADELHA DA COSTA; GADELHA, 2006).

A evolução dos mecanismos de implantação, invasão e formação da placenta foram essenciais no processo reprodutivo de animais vivíparos, suas variações evolucionárias resultaram em diferentes formas de placentação que vai desde uma interação embrio-endometrial com uma adesão simples e firme a uma completa erosão do endométrio pelo embrião humano (LEFÈVRE; CAMPOS; MURPHY, 2007).

Nos bovinos, a placentação tem início ao 17º dias de gestação quando começa o primeiro estágio da implantação embrionária (BERTOLINI et al., 2007). A placenta é chamada de cotiledonária nos ruminantes, microscopicamente é composta pelo endotélio vascular materno, tecido conjuntivo e epitélio, e do lado fetal, epitélio coriônico, tecido conjuntivo e vasos sanguíneos (HAFEZ, 2004). Apresenta ainda, células binucleadas que desempenham uma função endócrina durante a gestação (NAKANO et al., 2001).

Além dos mecanismos descritos para reconhecimento materno da gestação envolvendo o INF- τ , estudos indicam que o embrião em desenvolvimento pode demonstrar sua presença antes da sua chegada no útero, afetando a expressão de genes na tuba uterina como os que modulam o seu próprio transporte (LEE; YEUNG, 2006). Sabe-se que a comunicação celular ocorre por mediadores, podendo esses serem microvesículas ligadas à membrana que transmitem sinais/informações para células receptoras locais ou distantes (MINCHEVA-NILSSON; BARANOV, 2010). Em humanos, microvesículas de membrana com morfologia definida, os exossomos, são secretadas a partir de corpos multivesiculares endossomais mediante fusão com a membrana plasmática e liberados pela placenta (HEDLUND et al., 2009). Essas microvesículas atuam tanto localmente como a distância, sendo encontradas também no soro materno (SABAPATHA; GERCEL-TAYLOR; TAYLOR, 2006).

Os exossomos são vesículas esféricas uniformes medindo 50 a 100 nm (ZONG et al., 2018), formadas no interior dos endossomas (MINCHEVA-NILSSON; BARANOV, 2010; ZABOROWSKI et al., 2015). São compostos por proteínas, RNAm, microRNAs, sendo seu conteúdo dependentes do tipo de tecido ou célula que se originam. No entanto, independentemente de sua origem, os exossomos apresentam um grupo conservado de proteínas, incluindo tubulina, actina, anexinas e proteínas Rab, hsp70 e hsp90; quinases, proteínas G, TSG101 (NG et al., 2013; ZABOROWSKI et al., 2015).

Diversas funções biológicas tem sido atribuídas as microvesículas uterinas, como a sinalização intercelular, apresentação de antígenos, regulação imunológica, efeitos pró- ou anti-apoptóticos, transporte de proteínas graças a sua ligação à membrana plasmática e transporte de RNAs bioativos entre as células (DENZER et al., 2000; SKOG et al., 2008).

A secreção de exossomos durante o ciclo reprodutivo foi descrita em humanos (NG et al., 2013) e em ovelhas (BURNS; BROOKS; SPENCER, 2016; RUIZ-GONZÁLEZ et al., 2015a), sugerindo que estes podem ser importantes moduladores da função endometrial no período de pré concepção e implantação ou atuar regulando funções no concepto ou até mesmo nos espermatozoides. Além disso, exossomos tem sido descrito como uma característica das gestações normais. Exossomos placentários já foram isolados no sangue periférico de mulheres gestantes (SABAPATHA; GERCEL-TAYLOR; TAYLOR, 2006; TAYLOR; AKYOL; GERCEL-TAYLOR, 2006), e em estudos com culturas de tecidos placentários de gestações normais e células trofoblásticas (FRÄNGSMYR et al., 2005; HEDLUND et al., 2009; MINCHEVA-NILSSON et al., 2006). Além disso, exossomos foram identificados no fluido uterino de ovelhas gestantes (BURNS; BROOKS; SPENCER, 2016; RUIZ-GONZÁLEZ et al., 2015a).

Os exossomos placentários humanos expressam o marcador específico de exossomo CD63 e a fosfatase alcalina placentária e, diferentemente dos outros exossomos, não expressam o complexo principal de histocompatibilidade (MHC), mas sim moléculas relacionadas a MHC, a MICA/B e ERA-T1/ULBP1-5, ligantes do receptor de ativação de células natural killer NKG2D, expressando ainda moléculas proapoptóticas FasL1 - 4 e TRAIL (MINCHEVA-NILSSON; BARANOV, 2010). Diferenças na bioatividade de exossomos presentes no fluido uterino foram descritas entre mulheres não gestantes e mulheres gestantes (SALOMON et al., 2014). Além disso, observa-se que o número de exossomos está aumentado em mulheres não gestantes em condições associadas a inflamação ou síndromes metabólicas (REDMAN; SARGENT, 2007), em gestantes as células do trofoblasto regulam o remodelamento vascular dentro do útero através da liberação de exossomos, no decorrer do desenvolvimento gestacional, havendo uma diminuição em sua atividade biológica apenas no final da gestação (SALOMON et al., 2014).

Exossomos liberados no ambiente uterino antes e durante a gestação são essenciais para a comunicação materno-fetal e adaptação inicial do organismo à

gestação (ABRAHAMS et al., 2004; FRÄNGSMYR et al., 2005; HEDLUND et al., 2009). Perdas gestacionais podem estar relacionadas a um microambiente materno inadequado com falha da mãe em responder apropriadamente os sinais do embrião, defeitos intrínsecos embrionários (HANSEN, 2002), baixa qualidade do oócito ou do embrião (SIRARD et al., 2006) e falhas endócrinas (HASHIZUME et al., 2002). No entanto, acredita-se que a principal causa esteja relacionada à ocorrência de problemas de sinalização conceito-maternal (SPENCER, 2004), a qual pode ocorrer através da comunicação intercelular envolvendo mediadores secretados e capturados por exossomos (DA SILVEIRA et al., 2012).

Em bovinos perdas embrionária de gestações naturais ocorrem entre o 8º e 17º dia, estando estas muitas vezes relacionadas a insuficiente comunicação entre a mãe e o embrião como consequência da falha no reconhecimento inicial da gestação (THATCHER et al., 2001). Essas perdas acontecem de forma mais expressiva nas gestações por fertilização *in vitro* com taxa de recuperação e detecção do disco embrionário aos 16 dias de gestação de 86% e 56% para embriões controle e 37 e 35% para embriões produzidos *in vitro* (BERTOLINI; ANDERSON, 2002). Além disso, as taxas de prenhez aos 30 dias de gestação para embriões produzidos por FIV e clonados por transferência de núcleo de células somáticas (TNCS) são menores que as de embriões produzidos por superovulação e inseminação artificial, porém comparáveis. Já as perdas entre os dias 30 e 60 de gestação são significativamente maiores em embriões produzidos por FIV (15-60%) e TNCS (40-100%) (BERTOLINI et al., 2007). O entendimento dos sinais moleculares necessários para a adequada comunicação materno-fetal é de grande importância para o entendimento de parte dos problemas de perdas gestacionais, principalmente em casos de embriões gerados por fertilização *in vitro* (FIV), onde os processos de manipulação e cultivo celular podem alterar o perfil de expressão gênica embrionário e conseqüentemente seu desenvolvimento e sinalização ao endométrio

Nesse sentido, a comunicação intercelular através dos exossomos traz novas perspectivas para o entendimento da comunicação entre a mãe e o conceito, possibilitando elucidar questões relacionadas as mudanças e adaptações do organismo materno durante o período gestacional, assim como responder questões ainda não definidas relacionadas as taxas de sucesso obtidas na fertilização *in vitro*. Assim, esse estudo teve como objetivo determinar o tamanho e quantificar os exossomos presentes

no lavado uterino de vacas não prenhes e prenhes em diferentes períodos de gestação oriundas de inseminação artificial e fertilização in vitro.

Capítulo I

**DETERMINAÇÃO DO TAMANHO E QUANTIFICAÇÃO DOS EXOSSOMOS
UTERINOS EM GESTAÇÕES BOVINAS PRODUZIDAS POR INSEMINAÇÃO
ARTIFICIAL E POR FERTILIZAÇÃO *IN VITRO***

Manuscrito submetido à revista

¹Revista Caatinga

1 **DETERMINAÇÃO DO TAMANHO E QUANTIFICAÇÃO DOS EXOSSOMOS**
2 **UTERINOS EM GESTAÇÕES BOVINAS PRODUZIDAS POR INSEMINAÇÃO**
3 **ARTIFICIAL E POR FERTILIZAÇÃO *IN VITRO***

4
5
6 **RESUMO** - A comunicação intercelular ocorre por meio de diversos mecanismos, dentre eles
7 a excreção de vesículas extracelulares como os exossomos. Os exossomos presentes no fluido
8 uterino atuam na comunicação materno-fetal, sendo capazes de transportar proteínas,
9 moléculas de RNAm e microRNAs. O objetivo desse estudo foi determinar o tamanho e
10 quantificar os exossomos presentes no fluido uterino de vacas não prenhes e prenhes por
11 inseminação artificial (IA) e por fertilização *in vitro* em diferentes períodos gestacionais. O
12 fluido uterino foi coletado por lavagem uterina no dia 18 do ciclo estral e aos 18 e 32 dias de
13 gestação. As microvesículas extracelulares uterinas foram isoladas por centrifugação, o
14 tamanho e a concentração os exossomos foram analisados utilizando o *NanoSight NS300*.
15 Observou-se aumento significativo na concentração dos exossomos do grupo IA 18 para o IA
16 32 e uma tendência de aumento na concentração do grupo FIV 18 para o grupo FIV 32. Os
17 dados indicam que a concentração dos exossomos uterinos aumenta com a evolução da
18 gestação, sendo necessário estudos em outras idades gestacionais e ainda estudos que
19 determinem o conteúdo e origem desses exossomos, tornando possível elucidar questões
20 relacionadas a comunicação materno-fetal, bem como as diferenças observadas na viabilidade
21 de gestações oriundas de inseminação artificial e fertilização *in vitro*.

22
23 **Palavras-chave:** Vesículas extracelulares. Comunicação materno-fetal. bovinos.

24
25
26
27 **DETERMINATION OF SIZE AND QUANTIFICATION OF UTERINE EXOSOMES**
28 **IN BOVINE GESTATIONS PRODUCED BY ARTIFICIAL INSEMINATION AND IN**
29 **VITRO FERTILIZATION**

30
31
32 **ABSTRACT** - Intercellular communication occurs through several mechanisms, among them
33 the excretion of extracellular vesicles like the exosomes. Exossomes present in the uterine

34 fluid act in maternal-fetal communication, being able to carry proteins, mRNA molecules and
35 microRNAs. The objective of this study was to determine the size and quantify the exosomes
36 present in the uterine fluid of non-pregnant and pregnant cows from artificial insemination
37 (AI) and *in vitro* fertilization (IVF), in different gestational periods. The uterine fluid was
38 collected by uterine lavage on day 18 of the estrous cycle and at 18 and 32 days of gestation.
39 Extracellular uterine microvesicles were isolated by centrifugation; the size and concentration
40 of the exosomes were analyzed using the *NanoSight NS300*. There was a significant increase
41 in the concentration of exosomes from group AI18 to AI32 and a tendency of concentration
42 increase from group IVF 18 to group IVF 32. Data indicate that the concentration of uterine
43 exosomes increases with the evolution of gestation. Studies in other gestational ages and
44 studies that determine the content and origin of these exosomes are necessary, contributing to
45 elucidate questions related to maternal-fetal communication, as well as the differences
46 observed in the viability of pregnancies obtained by artificial insemination and *in vitro*
47 fertilization.

48

49 **keywords:** Extracellular vesicles. Maternal-fetal communication. bovine.

50

51

52

53

54

55 **INTRODUÇÃO**

56

57 A gestação é considerada como sendo um paradoxo do ponto de vista imunológico
58 (DAHER; MATTAR, 2009), seu estabelecimento requer estreita sincronia entre o endométrio
59 e o blastocisto. Essa interação funcional ocorre durante todo processo de implantação até a
60 fase de desenvolvimento da placenta (SALAMONSEN et al., 2009), estando associados
61 inúmeros fatores expressos tanto pelo endométrio como pelo concepto (IMAKAWA;
62 CHANG; CHRISTENSON, 2004).

63 A comunicação e sinalização intercelular ocorre por meio de diversos mecanismos,
64 dentre eles a excreção de vesículas extracelulares, podendo ser corpos apoptóticos,
65 microvesículas e exossomos (WILLMS et al., 2016). Os exossomos são vesículas esféricas
66 medindo de 50 a 100 nm (ZONG et al., 2018), produzidos por uma variedade de células e

67 presentes no microambiente uterino (NG et al., 2013). Essas vesículas transportam proteínas e
68 moléculas de RNAm e microRNA que atuam localmente ou à distância, sendo também
69 encontradas na circulação e no soro materno (SABAPATHA; GERCEL-TAYLOR;
70 TAYLOR, 2006; TAYLOR; AKYOL; GERCEL-TAYLOR, 2006).

71 Células trofoblásticas excretam exossomos capazes de transportar moléculas que
72 influenciam diversos mecanismos e funções biológicas, promovendo a sobrevivência
73 embrionária (MINCHEVA-NILSSON; BARANOV, 2010; SKOG et al., 2008)). Os
74 exossomos, liberados durante todo período gestacional, são considerados essenciais para
75 comunicação inicial entre a mãe e o conceito e na manutenção da gestação (ABRAHAMS et
76 al., 2004; HEDLUND et al., 2009; MINCHEVA-NILSSON et al., 2006; NG et al., 2013;
77 SABAPATHA; GERCEL-TAYLOR; TAYLOR, 2006; TAYLOR; AKYOL; GERCEL-
78 TAYLOR, 2006).

79 Em ovelhas, os exossomos são liberados na luz uterina durante o ciclo estral e início da
80 gestação estimulando a secreção de interferon-tau (RUIZ-GONZÁLEZ et al., 2015b). Em
81 bovinos sugere-se que microvesículas extracelulares apresentem um papel importante durante
82 a maturação dos oócitos e desenvolvimento precoce do embrião *in vitro* (DA SILVEIRA et
83 al., 2017), podendo ser responsáveis pela comunicação inicial e pela preparação do organismo
84 para gestação, evitando perda embrionária e auxiliando ainda na manutenção da gestação. A
85 caracterização morfológica e a quantificação dos exossomos presentes no fluido uterino de
86 bovinos, permitirá elucidar questões ainda não definidas em gestações obtidas por
87 inseminação artificial e fertilização *in vitro*. Assim, o objetivo desse estudo foi determinar o
88 tamanho e quantificar os exossomos presentes no fluido uterino de vacas não prenhes e
89 prenhes oriundas de inseminação artificial (IA) e de fertilização *in vitro* (FIV) em diferentes
90 períodos gestacionais.

91

92

93 **MATERIAIS E MÉTODOS**

94

95 **Animais e coleta de amostras**

96 Amostras de fluido uterino foram obtidas por lavagem uterina *post mortem* a partir
97 vacas inseminadas artificialmente aos 18 (n=11) e 32 dias (n=16) ou após FIV aos 18 (n=17)
98 e 32 dias (n=8). Fluido uterino de vacas não prenhes, utilizadas como grupo controle (C), foi
99 obtido aos 18 dias (n=7) do ciclo estral. As amostras foram obtidas de fêmeas *Bos taurus*
100 *indicus* (Nelore) inseminadas com sêmen *Bos taurus taurus* (Angus) ou após transferência de

101 embriões produzidos por fertilização *in vitro* (FIV) utilizando óocitos doados por fêmeas *Bos*
102 *taurus indicus* (Nelore) e o mesmo sêmen. O procedimento de fertilização *in vitro* foi
103 realizado conforme descrito por Seneda et al. (2001). As amostras de fluido uterino de
104 animais não gestantes foram obtidas de fêmeas *Bos taurus indicus* (Nelore).

105

106 Isolamento das microvesículas extracelulares

107 Para remoção de células mortas e debris celulares, os lavados uterinos foram
108 centrifugados a 300 x g durante 10 minutos, a 2.000 x g durante 10 minutos e a 16.500 x g
109 durante 30 minutos. Após a terceira centrifugação, as amostras foram filtradas em filtro 0.22
110 µm, transferidas para tubos de policarbonato de parede de 3,5 mm de espessura e uma
111 quantidade de solução salina tamponada com fosfato (PBS) foi adicionada para ajustar o
112 volume para 20 mL. As amostras foram ultracentrifugadas a 34.100 rpm durante 70 minutos a
113 4 °C, utilizando a ultracentrifuga Optima XE-90 para sedimentar as microvesículas
114 extracelulares. Os sobrenadantes foram removidos completamente, pellets enriquecidos com
115 exossomos foram lavados com 10 mL de PBS e centrifugados novamente a 34.100 rpm
116 durante 70 minutos a 4 °C. Após este procedimento, as microvesículas foram diluídas em
117 PBS1X sem Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺ para posterior utilização.

118

119 Análise do tamanho e da concentração dos exossomos

120 A análise do tamanho e da concentração dos exossomos foi realizada utilizando o
121 equipamento *NanoSight NS300 (Malvem)* por meio do *NanoSight NTA Software v3.1*. Para
122 calibração do equipamento foram utilizados *beads* de 50 nm, 100 nm e 200 nm,
123 respectivamente, para verificar a precisão do tamanho e concentração. As amostras de
124 exossomos oriundas do lavado uterino das vacas foram diluídas em PBS e introduzidas
125 manualmente no equipamento. Cinco vídeos de 30 segundos foram gravados com a câmera
126 *level 14*, à temperatura de 37°C para se obter os dados de tamanho e concentração de cada
127 amostra. O tamanho dos exossomos utilizado é o dado da moda, por ser o valor que mais se
128 repete, determinada a partir dos vídeos adquiridos.

129

130 Análise estatística

131 Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, para avaliar as diferenças
132 entre os tratamentos. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). As análises
133 foram realizadas utilizando o *software Jump*.

134

135

136 **RESULTADOS**

137

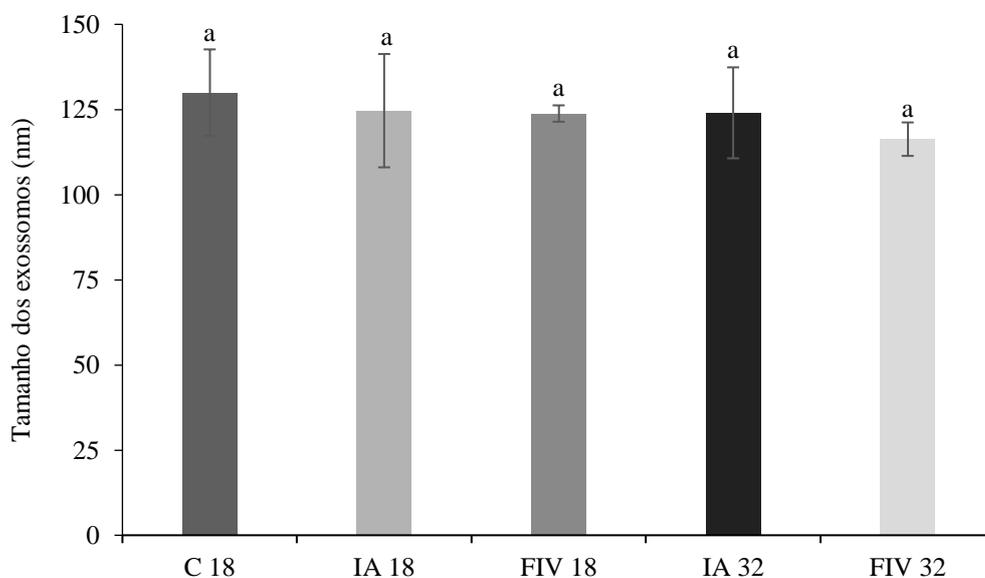
138 As vesículas extracelulares foram isoladas do lavado uterino usando método padrão.

139 A análise de rastreamento de nanopartículas mostrou partículas com média de $123,72 \pm 12,76$

140 nm. O fluido uterino de animais não gestantes aos 18 dias do ciclo apresentou exossomos com

141 média de $129,94 \pm 12,72$ nm. O fluido oriundo de gestações obtidas por IA aos 18 dias142 apresentou exossomos com tamanho médio de $124,66 \pm 16,64$ nm e aos 32 dias de gestação143 com $124,03 \pm 4,91$ nm. O fluido obtido de gestações obtidas por FIV aos 18 dias apresentou144 exossomos com tamanho médio de $123,83 \pm 2,40$ nm e aos 32 dias de gestação com $116,30 \pm$ 145 $4,91$ nm. Não foi identificada diferença significativa ($p > 0,05$) no tamanho dos exossomos

146 entre vacas não gestantes e gestantes nos diferentes períodos gestacionais (Figura 1).



147

148 **Figura 1.** Tamanho dos exossomos (nm) presentes no fluido uterino de vacas não gestantes e gestantes em

149 diferentes períodos gestacionais. C18: não gestante dia 18 do ciclo estral; IA18: gestação obtida por IA no dia

150 18; FIV18: gestação obtida por FIV no dia 18; IA32: gestação obtida por IA no dia 32; FIV32: gestação obtida

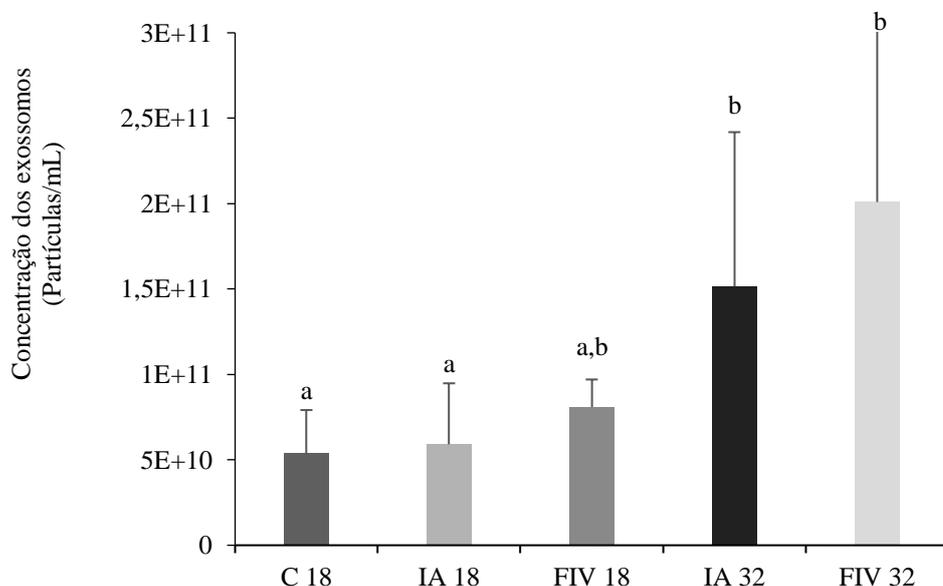
151 por FIV no dia 32.

152

153 A concentração de exossomos no fluido uterino de animais não gestantes aos 18 dias do

154 ciclo foi de $5,38E+11 \pm 2,54E+10$ partículas/ml. O fluido uterino oriundo de gestações155 obtidas por IA aos 18 dias apresentou concentração média de $5,91E+10 \pm 3,57E+10$ 156 partículas/ml e aos 32 dias de gestação concentração média de $1,52E+11 \pm 9,03E+10$ 157 partículas/ml. As gestações FIV aos 18 dias apresentaram uma concentração de $8,09E+10 \pm$ 158 $1,62E+10$ partículas/ml e aos 32 dias concentração média de $2,01E+11 \pm 1,92E+11$

159 partículas/ml. Foi observada diferença estatística ($p < 0,05$) na concentração dos exossomos
 160 entre os grupos IA18 e IA32, a qual aumentou 156% dos 18 aos 32 dias de gestação. Além
 161 disso, observou-se uma tendência de aumento entre os grupos FIV18 e FIV32 ($p = 0,06$),
 162 sendo verificado um aumento de 149% da concentração de exossomos aos 32 dias de gestação
 163 (Figura 2).



164
 165 **Figura 2.** Concentração dos exossomos (partículas/ml) presentes no fluido uterino de vacas não gestantes e
 166 gestantes em diferentes períodos gestacionais. C18: não gestante dia 18 do ciclo estral; IA18: gestação obtida por
 167 IA no dia 18; FIV18: gestação obtida por FIV no dia 18; IA32: gestação obtida por IA no dia 32; FIV32:
 168 gestação obtida por FIV no dia 32.

169

170

171 DISCUSSÃO

172 As vesículas extracelulares contêm materiais bioativos (DA SILVEIRA et al., 2017) e
 173 podem ser consideradas veículos de comunicação celular, devido sua capacidade de
 174 transferência de lipídios e ácidos nucleicos, que influenciam várias funções fisiológicas das
 175 células receptoras (YÁÑEZ-MÓ et al., 2015). Na literatura, o tamanho médio dos exossomos
 176 é descrito como sendo de 50 a 100 nm (ZONG et al., 2018). O tamanho dos exossomos
 177 encontrados no lavado uterino de vacas gestantes e não gestantes variou entre 95,3 e 155,2
 178 nm. Exossomos liberados por células trofoblásticas cultivadas mediram 165 nm (ATAY et al.,
 179 2011), exossomos presentes no fluido uterino humano (NG et al., 2013) e do sinciotrofoblasto
 180 (TANNETTA et al., 2017) variaram de 50 a 150 nm. A presença desses exossomos contendo
 181 proteínas, RNAs e microRNAs específicos no microambiente uterino em que ocorre a

182 implantação embrionária e a placentação pode determinar a efetiva comunicação materno
183 fetal, essencial para o sucesso da gestação.

184 Os dados obtidos nesse estudo demonstraram que, com o avanço da idade gestacional,
185 ocorre um aumento significativo da concentração dos exossomos no microambiente uterino,
186 tanto em gestações obtidas por IA quanto FIV. Resultados semelhantes foram obtidos em
187 estudos com humanos, relacionando o aumento de exossomos circulantes no sangue materno
188 ao avanço gestacional, os quais podem ser provenientes da mãe ou do embrião (SALOMON
189 et al., 2014).

190 O significado fisiológico desse aumento observado no número de exossomos no fluido
191 uterino durante a gestação ainda precisa ser investigado. O microambiente uterino pode ser
192 alterado de acordo com o protocolo utilizado na IA e na FIV, alterando aspectos celulares e
193 moleculares (FRANCHI; CASTILHO, 2016) Esses exossomos podem ser liberados
194 juntamente com diversos tipos celulares (ZABOROWSKI et al., 2015), relacionados com a
195 resposta imune do animal, indicando o envolvimento na organização de grandes complexos
196 moleculares (THÉRY; ZITVOGEL; AMIGORENA, 2002).

197 O período inicial da gestação é caracterizado por perdas embrionárias (ASSIS NETO et
198 al., 2009), ocorrendo principalmente entre 8 e 17 dias, devido à insuficiente comunicação
199 materno fetal, com conseqüente falha no reconhecimento da gestação (THATCHER et al.,
200 2001) e envolvendo diversos mecanismos que coordenam o crescimento e sobrevivência
201 embrionária (LIMA; SOUZA, 2009). Os estudos recentes indicam que os exossomos podem
202 ser responsáveis por essa comunicação inicial, modulando o estabelecimento da gestação (NG
203 et al., 2013). Essas perdas se tornam ainda mais expressivas quanto se consideram as
204 gestações obtidas por FIV (BERTOLINI; ANDERSON, 2002). Nesse estudo não foram
205 identificadas diferenças estatísticas entre o número de exossomos encontrados no
206 microambiente uterino em gestações obtidas por IA e FIV, no entanto, um aumento numérico
207 de exossomos foi notado em gestações produzidas *in vitro*. Sabe-se que o conteúdo e
208 composição da membrana das vesículas extracelulares são altamente heterogêneos e
209 dinâmicos, dependentes da fonte celular, estado e condições ambientais (SALOMON et al.,
210 2014). Assim, considerando que em embriões gerados por fertilização *in vitro* (FIV) passam
211 por processos de manipulação e cultivo celular que podem alterar o perfil de expressão gênica
212 embrionário e conseqüentemente seu desenvolvimento e sinalização ao endométrio (ZHOU;
213 LAMONT, 2007), supõe-se que as diferenças observadas entre gestações IA e FIV estejam
214 relacionadas a divergências no conteúdo das microvesículas. A investigação do conteúdo
215 proteico e gênico dos exossomos uterinos de gestações IA e FIV poderá contribuir para o

216 entendimento das falhas gestacionais frequentemente observadas em gestações obtidas por
217 FIV.

218 A concentração de exossomos no fluido uterino de animais aos 18 dias do ciclo estral
219 não diferiu da concentração encontrada em animais gestantes. Exossomos encontrados em
220 animais gestantes podem ter origem fetal ou materna (GIACOMINI et al., 2017). Em animais
221 não gestantes, somente exossomos de origem materna compõem o fluido uterino. A secreção
222 de exossomos durante o ciclo estral foi descrita em humanos (NG et al., 2013) e ovelhas
223 (BURNS; BROOKS; SPENCER, 2016; RUIZ-GONZÁLEZ et al., 2015b). A presença de
224 exossomos durante o ciclo estral sugere que estes podem ser importantes durante o preparo
225 para a gestação e a concepção, podendo modular a própria função endometrial ou até mesmo
226 regular a função espermática. A identificação do conteúdo desses exossomos se faz necessária
227 para entendimento da função dos mesmos durante o ciclo estral e durante a gestação.

228

229

230 CONCLUSÕES

231

232 A concentração dos exossomos presentes no fluido uterino aumenta de acordo com o
233 período gestacional em gestações obtidas por IA e tende a aumentar em gestações obtidas por
234 FIV. Futuros estudos que identifiquem a origem e o conteúdo desses exossomos durante o
235 ciclo estral e a gestação contribuirão para o entendimento de questões relacionadas ao preparo
236 para a gestação e à comunicação materno-fetal, bem como as diferenças observadas na
237 viabilidade de gestações oriundas de inseminação artificial e fertilização *in vitro*.

238

239

240 REFERENCIAS

241

242 ABRAHAMS, V. M. et al. **First trimester trophoblast cells secrete Fas ligand which**
243 **induces immune cell apoptosis** *Molecular Human Reproduction*, jan. 2004. Disponível em:
244 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14665707>>. Acesso em: 5 maio. 2016.

245

246 ASSIS NETO, A. C. DE et al. Evolução morfométrica dos anexos embrionários e fetais
247 bovinos obtidos por monta natural, com 10 a 70 dias da gestação. **Pesquisa Veterinaria**
248 **Brasileira**, v. 29, n. 10, p. 859–862, 2009.

249

- 250 ATAY, S. et al. Morphologic and proteomic characterization of exosomes released by
251 cultured extravillous trophoblast cells. **Experimental Cell Research**, v. 317, n. 8, p. 1192–
252 1202, 1 maio 2011.
- 253
- 254 BERTOLINI, M.; ANDERSON, G. B. The placenta as a contributor to production of large
255 calves. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 181–187, 2002.
- 256
- 257 BURNS, G. W.; BROOKS, K. E.; SPENCER, T. E. Extracellular Vesicles Originate from the
258 Conceptus and Uterus During Early Pregnancy in Sheep. **Biology of Reproduction**, v. 94, n.
259 January, p. 1–11, 2016.
- 260
- 261 DA SILVEIRA, J. C. et al. Supplementation with small-extracellular vesicles from ovarian
262 follicular fluid during in vitro production modulates bovine embryo development. **PLoS**
263 **ONE**, v. 12, n. 6, p. 1–25, 2017.
- 264
- 265 DAHER, S.; MATTAR, R. Gestação: um fenômeno imunológico? **Revista Brasileira de**
266 **Alergia e imunopatologia**, v. 32, p. 5, 2009.
- 267
- 268 FRANCHI, F. F.; CASTILHO, A. C. DE S. Efeitos da superestimulação ovariana sobre a
269 competência oocitária e embrionária em bovinos: possível participação dos exossomos
270 presentes no fluido folicular. 4 mar. 2016.
- 271
- 272 GIACOMINI, E. et al. Secretome of in vitro cultured human embryos contains extracellular
273 vesicles that are uptaken by the maternal side. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.
- 274
- 275 HEDLUND, M. et al. Human placenta expresses and secretes NKG2D ligands via exosomes
276 that down-modulate the cognate receptor expression: evidence for immunosuppressive
277 function. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 183, n. 1, p. 340–351, 1 jul.
278 2009.
- 279
- 280 IMAKAWA, K.; CHANG, K.-T.; CHRISTENSON, R. K. Pre-implantation conceptus and
281 maternal uterine communications: molecular events leading to successful implantation. **The**
282 **Journal of reproduction and development**, v. 50, n. 2, p. 155–69, 2004.
- 283

284 LIMA, I. M. T.; SOUZA, A. L. Desenvolvimento e sobrevivência de embriões no período de
285 pré-implantação: enfoque em ruminantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33,
286 n. 4, p. 194–202, 2009.

287
288 MINCHEVA-NILSSON, L. et al. Placenta-Derived Soluble MHC Class I Chain-Related
289 Molecules Down-Regulate NKG2D Receptor on Peripheral Blood Mononuclear Cells during
290 Human Pregnancy: A Possible Novel Immune Escape Mechanism for Fetal Survival. **The**
291 **Journal of Immunology**, v. 176, n. 6, p. 3585–3592, 15 mar. 2006.

292
293 MINCHEVA-NILSSON, L.; BARANOV, V. **The Role of Placental Exosomes in**
294 **Reproduction****American Journal of Reproductive Immunology** Blackwell Publishing Ltd, ,
295 11 mar. 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0897.2010.00822.x>>.
296 Acesso em: 7 maio. 2016.

297
298 NG, Y. H. et al. Endometrial Exosomes/Microvesicles in the Uterine Microenvironment: A
299 New Paradigm for Embryo-Endometrial Cross Talk at Implantation. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p.
300 e58502, 13 mar. 2013.

301
302 RUIZ-GONZÁLEZ, I. et al. Exosomes, endogenous retroviruses and toll-like receptors:
303 Pregnancy recognition in ewes. **Reproduction**, v. 149, n. 3, p. 281–291, 2015.

304
305 SABAPATHA, A.; GERCEL-TAYLOR, C.; TAYLOR, D. D. Specific isolation of placenta-
306 derived exosomes from the circulation of pregnant women and their immunoregulatory
307 consequences. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 56, n. 5–6, p. 345–355,
308 2006.

309
310 SALAMONSEN, L. A. et al. Society for reproductive biology founders lecture 2009.
311 Preparing fertile soil: The importance of endometrial receptivity. **Reproduction, Fertility**
312 **and Development**, v. 21, n. 7, p. 923–934, 2009.

313
314 SALOMON, C. et al. A gestational profile of placental exosomes in maternal plasma and
315 their effects on endothelial cell migration. **PloS one**, v. 9, n. 6, p. e98667, 6 jun. 2014.

316
317 SENEDA, M. M. et al. ASPIRAÇÃO FOLICULAR TRANSVAGINAL SEM ESTÍMULO

- 318 HORMONAL EM VACAS HOLANDESAS (OVUM PICK-UP (OPU) IN HOLSTEIN
319 COWS WITHOUT GONADOTROPHIC THERAPY). **ARS VETERINARIA**, v. 17, n. 1, p.
320 11–16, 2001.
- 321
- 322 SKOG, J. et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour
323 growth and provide diagnostic biomarkers. **Nature cell biology**, v. 10, n. 12, p. 1470–6, 2008.
- 324
- 325 TANNETTA, D. et al. Update of syncytiotrophoblast derived extracellular vesicles in normal
326 pregnancy and preeclampsia. **Journal of reproductive immunology**, v. 119, p. 98–106, fev.
327 2017.
- 328
- 329 TAYLOR, D. D.; AKYOL, S.; GERCEL-TAYLOR, C. Pregnancy-associated exosomes and
330 their modulation of T cell signaling. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v.
331 176, n. 3, p. 1534–1542, 2006.
- 332
- 333 THATCHER, W. W. et al. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle.
334 **Theriogenology**, v. 56, n. 9, p. 1435–1450, 2001.
- 335
- 336 THÉRY, C.; ZITVOGEL, L.; AMIGORENA, S. Exosomes: composition, biogenesis and
337 function. **Nature reviews. Immunology**, v. 2, n. 8, p. 569–579, 2002.
- 338
- 339 WILLMS, E. et al. Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and
340 biological properties. **Scientific Reports**, v. 6, n. February, p. 1–12, 2016.
- 341
- 342 YÁÑEZ-MÓ, M. et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological
343 functions. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 4, n. 2015, p. 1–60, 2015.
- 344
- 345 ZABOROWSKI, M. P. et al. Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and
346 Methods of Study. **BioScience**, v. 65, n. 8, p. 783–797, 2015.
- 347
- 348 ZHOU, H.; LAMONT, S. J. Global gene expression profile after *Salmonella enterica* Serovar
349 enteritidis challenge in two F8 advanced intercross chicken lines. **Cytogenetic and Genome
350 Research**, v. 117, n. 1–4, p. 131–138, 2007.
- 351

352 ZONG, S. et al. Single molecule localization imaging of exosomes using blinking silicon
353 quantum dots. **Nanotechnology**, v. 29, n. 6, p. 65705, 9 fev. 2018.

354

355

Considerações Finais

A concentração dos exossomos presentes no fluido uterino aumenta de acordo com o período gestacional em gestações obtidas por inseminação artificial e tende a aumentar em gestações obtidas por fertilização *in vitro*.

É necessário estudos futuros que identifiquem a origem e o conteúdo dos exossomos presentes no fluido uterino durante o ciclo estral e a gestação, elucidando questões relacionadas as perdas gestacionais e o estabelecimento inicial da gestação, assim como o entendimento da comunicação materno-fetal durante todo período gestacional.

O conhecimento da origem e conteúdo dos exossomos permitirá ainda identificar diferenças na viabilidade de gestações oriundas de inseminação artificial e fertilização *in vitro*.

Referências

- ABRAHAMAS, V. M. et al. **First trimester trophoblast cells secrete Fas ligand which induces immune cell apoptosis** *Molecular Human Reproduction*, jan. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14665707>>. Acesso em: 5 maio. 2016.
- BERTOLINI, M. et al. Developmental problems during pregnancy after in vitro embryo manipulations Problemas gestacionais decorrentes das manipulações embrionárias in vitro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 391–405, 2007.
- BERTOLINI, M.; ANDERSON, G. B. The placenta as a contributor to production of large calves. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 181–187, 2002.
- BURNS, G. W.; BROOKS, K. E.; SPENCER, T. E. Extracellular Vesicles Originate from the Conceptus and Uterus During Early Pregnancy in Sheep. **Biology of Reproduction**, v. 94, n. January, p. 1–11, 2016.
- DA SILVEIRA, J. C. et al. Cell-Secreted Vesicles in Equine Ovarian Follicular Fluid Contain miRNAs and Proteins: A Possible New Form of Cell Communication Within the Ovarian Follicle. **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 3, p. 71–71, 19 mar. 2012.
- DAHER, S.; MATTAR, R. Gestação: um fenômeno imunológico? **Revista Brasileira de Alergia e imunopatologia**, v. 32, p. 5, 2009.
- DEMMERS, K. J.; DERECKA, K.; FLINT, A. Trophoblast interferon and pregnancy. **Journals of Reproduction and Fertility**, v. 121, n. 1, p. 41–49, 2001.
- DENZER, K. et al. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. **Journal of cell science**, v. 113 Pt 19, p. 3365–3374, 2000.
- FRÄNGSMYR, L. et al. Cytoplasmic microvesicular form of Fas ligand in human early placenta: Switching the tissue immune privilege hypothesis from cellular to vesicular level. **Molecular Human Reproduction**, v. 11, n. 1, p. 35–41, jan. 2005.
- GADELHA DA COSTA, A.; GADELHA, P. S. Importância da Placenta nas Doenças Gestacionais. **Femina**, v. 34, n. 10, p. 695–699, 2006.
- GOFF, A. K. Embryonic signals and survival. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, n. 3, p. 133–139, jun. 2002.
- HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. [s.l.: s.n.].
- HANSEN, P. Embryonic mortality in cattle from the embryo's perspective. **Journal of Animal Science**, v. 80, n. E-Suppl_2, p. E33–E44, 2002.
- HASHIZUME, K. et al. Implantation and placental development in somatic cell clone recipient cows. **Cloning and stem cells**, v. 4, n. 3, p. 197–209, set. 2002.

- HEDLUND, M. et al. Human placenta expresses and secretes NKG2D ligands via exosomes that down-modulate the cognate receptor expression: evidence for immunosuppressive function. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 183, n. 1, p. 340–351, 1 jul. 2009.
- IMAKAWA, K.; CHANG, K.-T.; CHRISTENSON, R. K. Pre-implantation conceptus and maternal uterine communications: molecular events leading to successful implantation. **The Journal of reproduction and development**, v. 50, n. 2, p. 155–69, 2004.
- INSKEEP, E. K.; DAILEY, R. A. Embryonic death in cattle. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 21, n. 2 SPEC. ISS., p. 437–461, 2005.
- JUNIOR, B. G.; MARTELLI, A. Aspectos Clínicos E Fisiopatológicos Da Retenção De Placenta Em Vacas / Clinical and Pathophysiological Aspects of Retained Placenta in Cows. **Saúde em Foco**, v. 1, n. 1, p. 103–117, 2014.
- LEE, K.-F.; YEUNG, W. S. B. Gamete/embryo - oviduct interactions: implications on in vitro culture. **Human fertility (Cambridge, England)**, v. 9, n. 3, p. 137–43, 3 jan. 2006.
- LEFÈVRE, P.; CAMPOS, D. B.; MURPHY, B. D. **Talk to me: The embryo dictates gene expression by the endometrium** *Endocrinology*, 2007.
- LIMA, I. M. T.; SOUZA, A. L. Desenvolvimento e sobrevivência de embriões no período de pré-implantação: enfoque em ruminantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, n. 4, p. 194–202, 2009.
- MAPA. Ministério da Agricultura , Pecuária e Abastecimento.
<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>, p. 7042, 2016.
- MARQUES, V. B. et al. Interferon-tau e o reconhecimento da gestação em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 4, p. 479–488, 2007.
- MINCHEVA-NILSSON, L. et al. Placenta-Derived Soluble MHC Class I Chain-Related Molecules Down-Regulate NKG2D Receptor on Peripheral Blood Mononuclear Cells during Human Pregnancy: A Possible Novel Immune Escape Mechanism for Fetal Survival. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 6, p. 3585–3592, 15 mar. 2006.
- MINCHEVA-NILSSON, L.; BARANOV, V. **The Role of Placental Exosomes in Reproduction** *American Journal of Reproductive Immunology* Blackwell Publishing Ltd, , 11 mar. 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0897.2010.00822.x>>. Acesso em: 7 maio. 2016
- NAKANO, H. et al. Expression of placental lactogen and cytokeratin in bovine placental binucleate cells in culture. **Cell and Tissue Research**, v. 303, n. 2, p. 263–270, 29 jan. 2001.
- NG, Y. H. et al. Endometrial Exosomes/Microvesicles in the Uterine Microenvironment: A

- New Paradigm for Embryo-Endometrial Cross Talk at Implantation. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e58502, 13 mar. 2013.
- PEREIRA, M. A. et al. Reconhecimento materno da gestação em animais de produção. **revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 13, n. 1, p. 30–35, 2015.
- REDMAN, C. W. G.; SARGENT, I. L. Microparticles and immunomodulation in pregnancy and pre-eclampsia. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 76, n. 1–2, p. 61–67, 2007.
- ROY CHOUDHURY, S.; KNAPP, L. A. Human reproductive failure I: Immunological factors. **Human Reproduction Update**, v. 7, n. 2, p. 113–134, 2000.
- RUIZ-GONZÁLEZ, I. et al. Exosomes, endogenous retroviruses and toll-like receptors: Pregnancy recognition in ewes. **Reproduction**, v. 149, n. 3, p. 281–291, 2015.
- SABAPATHA, A.; GERCEL-TAYLOR, C.; TAYLOR, D. D. Specific isolation of placenta-derived exosomes from the circulation of pregnant women and their immunoregulatory consequences. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 56, n. 5–6, p. 345–355, 2006.
- SALAMONSEN, L. A. et al. Society for reproductive biology founders lecture 2009. Preparing fertile soil: The importance of endometrial receptivity. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 21, n. 7, p. 923–934, 2009.
- SALAMONSEN, L. A. et al. Proteomics of the human endometrium and uterine fluid: A pathway to biomarker discovery. **Fertility and Sterility**, v. 99, n. 4, p. 1086–1092, 2013.
- SALOMON, C. et al. A gestational profile of placental exosomes in maternal plasma and their effects on endothelial cell migration. **PloS one**, v. 9, n. 6, p. e98667, 6 jun. 2014.
- SILVEIRA, J. C. DA et al. Fatores Ambientais e Parâmetros Genéticos para Características Produtivas e Reprodutivas em um Rebanho Nelore no Estado do Mato Grosso do Sul Study of Genetic and Environmental Factors on Production and Reproduction Traits in a Nellore Herd in Mato Grosso. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, p. 1432–1444, 2004.
- SIRARD, M. A. et al. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 126–136, 2006.
- SKOG, J. et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. **Nature cell biology**, v. 10, n. 12, p. 1470–6, 2008.
- SPENCER, T. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. **Animal Reproduction Science**, v. 15, p. 1–15, 2004.
- TAYLOR, D. D.; AKYOL, S.; GERCEL-TAYLOR, C. Pregnancy-associated exosomes and their modulation of T cell signaling. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v.

176, n. 3, p. 1534–1542, 2006.

THATCHER, W. W. et al. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle.

Theriogenology, v. 56, n. 9, p. 1435–1450, 2001.

WATSON, A. J.; NATALE, D. R.; BARCROFT, L. C. **Molecular regulation of blastocyst formation**. Animal Reproduction Science. **Anais...** jul. 2004 Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432004000569>>. Acesso em: 18 jul. 2016

ZABOROWSKI, M. P. et al. Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. **BioScience**, v. 65, n. 8, p. 783–797, 2015.

ZONG, S. et al. Single molecule localization imaging of exosomes using blinking silicon quantum dots. **Nanotechnology**, v. 29, n. 6, p. 65705, 9 fev. 2018.