



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E REPRODUÇÃO DE**  
**RUMINANTES**

**INFLUÊNCIA DA ADIPONECTINA SOBRE A MATURAÇÃO DE OÓCITOS *IN***  
***VITRO* NO MODELO CAPRINO**

**ELIZABETE TEIXEIRA GOMES**

**GARANHUNS – PE**

**2017**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E REPRODUÇÃO DE**  
**RUMINANTES**

**INFLUÊNCIA DA ADIPONECTINA SOBRE A MATURAÇÃO DE OÓCITOS *IN***  
***VITRO* NO MODELO CAPRINO**

**ELIZABETE TEIXEIRA GOMES**

Dissertação submetida à Coordenação do curso de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Sanidade e Reprodução de Ruminantes.

**GARANHUNS – PE**

**2017**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Dissertação à disposição na Biblioteca Central da Universidade Federal Rural de Pernambuco. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitadas às normas de ética científica.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Biblioteca Ariano Suassuna, Garanhuns - PE, Brasil

G633i Gomes, Elizabete Teixeira

Influência da adiponectina sobre a maturação de oócitos  
*in vitro* no modelo caprino / Elizabete Teixeira Gomes. - 2017.  
X 48 f. : il.

Orientador: André Mariano Batista.  
Dissertação ( Mestrado em Sanidade e Reprodução de Ruminantes) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós - Graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes, Garanhuns, BR - PE, 2017.  
Inclui referências, apêndice e anexos

1. Veterinária 2. Reprodução animal 3. Caprino  
4. Estrógenos I. Batista, André Mariano, orient. II. Título

CDD 636.089

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E REPRODUÇÃO DE**  
**RUMINANTES**

INFLUÊNCIA DA ADIPONECTINA SOBRE A MATURAÇÃO DE OÓCITOS *IN*  
*VITRO* NO MODELO CAPRINO

---

ELIZABETE TEIXEIRA GOMES

Dissertação aprovada em 11 de dezembro de 2017

---

Prof. Dr. André Mariano Batista

Orientador

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Aurea Wischral / DMV-UFRPE

Membro Titular

---

Prof. Dr. Cláudio Coutinho Bartolomeu / DMV-UFRPE

Membro Titular

---

Dr. Antônio Santana dos Santos Filho / IPA-Arcoverde

Membro Suplente

*Dedico*

*À luz dos meus olhos e força dos meus braços, presentes SEMPRE em minha vida, minha família: Eliene, João, Elaine e Vinícius.*

*“Combati o bom combate, acabei a carreira, guardei a fé”.*

*2 Tímóteo 4:7*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao único soberano e supremo Senhor e Salvador da minha vida, a Ele toda gratidão por me suster durante toda essa trajetória. Obrigada Deus por está presente em mim.

À minha família, Eliene, João, Elaine e Vinícius, meus maiores incentivos, por sempre acreditarem em mim e em meu potencial, pela presença em TODAS as situações, esse título também é de vocês!

Ao meu orientador, André Mariano, pela paciência, força, respeito, confiança, e esmero em me orientar. Sou grata a Deus pela oportunidade de aprender com ele.

Ao meu co-orientador, grande exemplo da minha vida profissional e pessoal, Antônio Santana, pelos ensinamentos, confiança, incentivo, e por ser o melhor exemplo de ser humano que posso seguir.

Ao meu amor, namorado, amigo e cúmplice, Neto, por completar essa carreira comigo, pela paciência, cuidado, ajuda e apoio em tudo que faço.

Às minhas amigas Aninha, Ilanna e Elizângela, por sempre me ouvir e transmitirem a força, que muitas vezes, estava quase no fim.

À minha amiga e colega de bancada, Joana, pela ajuda e contribuição para realização deste trabalho, e também pelas conversas, força, positividade e por sempre ser uma companhia agradável em meio ao cansaço dos sábados dentro do laboratório. **MUITO OBRIGADA MESMO!**

À Wasin, colega e amigo, pelo exemplo de vida e força de vontade, pela ajuda para realização deste trabalho.

À André, Besouro e Aninha pelo auxílio logístico para obtenção de ovários e por me ajudarem sempre que precisei.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Sanidade e Reprodução de Ruminantes.

À todos que viabilizaram a realização deste trabalho, a CAPES pela concessão da bolsa de estudos, a Estação Experimental do IPA em Arcoverde, por conceder o espaço do laboratório e a todos que contribuíram direta e indiretamente para este trabalho!

Muito Obrigada!!

## **APOIO FINANCEIRO**

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).



## RESUMO

No Brasil a caprinocultura é uma atividade em potencial crescimento, isso pode ser evidenciado com maior intensidade na região nordeste, que detém a grande maioria do rebanho caprino brasileiro. Com isso, a demanda por investimentos nessa atividade vem sendo expressiva nos últimos anos, exigindo assim, maior tecnificação para melhoria e expansão desse setor. Nesse sentido, as biotecnologias voltadas para reprodução demonstram ser instrumentos eficazes, e nelas destacamos a Produção *in vitro* de embriões (PIVE) que promove a multiplicação de genéticas superiores em um espaço de tempo mais curto que os métodos tradicionais. Entretanto, ainda há muito para se avançar com essa técnica na espécie caprina, uma vez que, atualmente seus resultados nessa espécie ainda são variáveis e limitados o que implica em limitação a nível comercial. A adiponectina é um hormônio proteico produzido predominantemente pelo tecido adiposo, pode ser uma alternativa de incremento nessa área. Algumas de suas funções estão relacionadas à reprodução da fêmea, como influência positiva sobre a esteroidogênese e também sobre a maturação de oócitos *in vitro* em algumas espécies, incluindo a espécie caprina. Este trabalho teve como objetivo investigar se: 1) a adiponectina influencia a maturação meiótica de oócitos caprinos; 2) a via MAPK MEK1/2 medeia os efeitos da adiponectina durante a maturação *in vitro* e 3) a adiponectina afeta de forma diferente a abundância de RNAm de genes relevantes para a transdução de sinal da adiponectina em oócitos e células cumulus. A adição de adiponectina (5 µg/mL) durante a maturação de oócitos caprinos afetou a porcentagem de oócitos que completaram a maturação nuclear com sucesso ( $P < 0,05$ ). A maturação nuclear de oócitos estimulada pela adiponectina foi significativamente prejudicada quando o inibidor específico de MEK 1/2 (U0126) foi adicionado ao meio de maturação. Não houve evidência de qualquer diferença induzida pela adiponectina na relativa abundância dos transcritos dos genes *AdipoR1*, *AdipoR2*, *AMPK $\alpha$ 1*, *PPAR $\alpha$*  e *PPAR $\gamma$* . A expressão de *AMPK $\alpha$ 2* foi significativamente inibida nas células do cumulus oriundas de complexos cumulus-oócitos maturados com 5 µg/mL de adiponectina comparados com aqueles maturados com 0 µg/mL ( $P < 0,05$ ). Em conclusão, a adiponectina melhora a maturação meiótica de oócitos caprinos através da via MAPK MEK 1/2. Adicionalmente, efeitos sobre os níveis do transcrito *AMPK $\alpha$ 2* foram detectados nas células do cumulus mas não nos oócitos.

**Palavras-chave:** adiponectina, células do cumulus, AMPK, PPARs

## LISTA DE FIGURAS

		<b>Página</b>
Figura 1	Porcentagens da configuração meiótica observada em oócitos caprinos maturados <i>in vitro</i> .....	39
Figura 2	Porcentagens da configuração meiótica observada em oócitos caprinos maturados <i>in vitro</i> em meio TCM199/Bicarbonato livre de soro contendo 0 ou 5 µg/ml de adiponectina na presença ou ausência do inibidor de MEK 1/2 (U0126; 10 µM).....	40

## LISTA DE TABELAS

		<b>Página</b>
Tabela 1	Sequência de oligonucleotídeos usados para realizar qPCR.....	37
Tabela 2	Efeito da adiponectina (0 ou 5 µg/mL) durante a maturação de oócitos na proporção de células que expressam RNAm para <i>AdipoR1</i> , <i>AdipoR2</i> , <i>AMPKα1</i> , <i>AMPKα2</i> , <i>PPARα</i> e <i>PPARγ</i> .....	43
Tabela 3	Efeito da adiponectina (0 ou 5 µg/mL) durante a maturação de oócitos sobre a expressão de RNAm de <i>AdipoR1</i> , <i>AdipoR2</i> , <i>AMPKα1</i> , <i>AMPKα2</i> , <i>PPARα</i> e <i>PPARγ</i> em oócitos e células do cumulus.....	44

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Maturação <i>in vitro</i> de oócitos.....</b>	<b>15</b>
2.1.1 <i>Maturação Nuclear.....</i>	15
2.1.2 <i>Maturação Citoplasmática.....</i>	17
<b>2.2 Meios e suplementos usados para MIV.....</b>	<b>18</b>
<b>2.3 Tecido adiposo e Reprodução.....</b>	<b>19</b>
<b>2.4 Adiponectina.....</b>	<b>20</b>
2.4.1 <i>Estrutura e sinalização.....</i>	20
2.4.2 <i>Papel no metabolismo energético.....</i>	21
2.4.3 <i>Papel na reprodução da fêmea.....</i>	22
<b>3. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>23</b>
<b>4. ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>31</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A caprinocultura brasileira é uma atividade com grande potencial de expansão em todo país, e de maneira mais acentuada na região Nordeste, onde a criação de caprinos tem grande importância para a economia local. Dados do Censo Agropecuário do IBGE (2016) mostram que o Estado de Pernambuco detinha mais de 25% do efetivo nacional desta espécie, considerado o segundo maior do país.

A criação de caprinos no país vem passando por um crescimento considerável e este fato tem transformado o cenário de nossos sistemas produtivos, requerendo novos conhecimentos técnicos e científicos. Avanços tecnológicos dirigidos aos diversos segmentos repercutem no aumento da produção animal, sendo que as biotecnologias reprodutivas têm uma atuação direta na obtenção de maior número de animais de elevada qualidade (GUERRA et al., 2011).

A Produção *In Vitro* de Embriões (PIVE) nos pequenos ruminantes tem importância fundamental, principalmente por prover embriões para uso em pesquisas básicas sobre biologia e fisiologia do desenvolvimento a um baixo custo, além de possibilitar a aplicação de biotecnologias emergentes, como a transferência nuclear e a produção de transgênicos. Entretanto, apesar dos esforços das pesquisas ao longo dos últimos 30 anos, os resultados da produção *in vitro* de embriões ainda são imprevisíveis e variáveis, configurando importante limitação à sua aplicação comercial (PARAMIO e IZQUIERDO, 2016).

Ao longo da última década, o tecido adiposo tem surgido como um elemento chave na modulação de várias funções fisiológicas, por meio da liberação de uma variedade de moléculas biologicamente importantes denominadas ‘adipocinas’, as quais modulam o metabolismo de lipídios e glicose, e sensibilidade à insulina (McGown et al., 2014). Em adição ao seu papel bem estabelecido no controle da fisiologia do tecido adiposo, as adipocinas têm sido implicadas na regulação das funções reprodutivas (DUPONT et al., 2012).

Uma destas adipocinas é a Adiponectina, um hormônio proteico de 30 kDa, que exerce sua ação ligando-se aos receptores tipo 1 (AdipoR1) e 2 (AdipoR2) (YAMAUCHI et al., 2014). Estes receptores ativam várias vias de sinalização intracelulares, incluindo a estimulação da MAPK (Proteína-quinase ativada por mitógenos), AMPK (proteína quinase ativada por adenosina monofosfato) e PPAR (receptores ativados por proliferador de

peroxissoma) (DUPONT et al., 2012; YAMAUCHI et al., 2014), as quais estão implicadas na regulação do metabolismo energético.

Tem sido reportado que durante protocolos de PIVE a suplementação dos meios com adiponectina melhoram a maturação de oócitos em suínos (CHAPPAZ et al., 2008) e o desenvolvimento embrionário em camundongos (RICHARDS et al., 2012). Em bovinos, entretanto, a suplementação do meio de MIV com adiponectina não afetou a maturação meiótica (MAILLARD et al., 2010), sugerindo um papel espécie específico para a adiponectina.

Recentemente, a expressão da proteína e RNAm para adiponectina e seus receptores (AdipoR1 e AdipoR2), foi demonstrada em diferentes estágios do desenvolvimento folicular no ovário caprino (OLIVEIRA et al., 2017). Além disso, estes autores demonstraram que a suplementação com adiponectina durante a MIV aumentou a proporção de oócitos que atingiu o estágio de metáfase II (MII) (OLIVEIRA et al., 2017).

Embora a adiponectina possa estar integrada em um complexo sistema de comunicação intracelular que regula funções celulares específicas, não há estudos sobre os mecanismos moleculares essenciais à maturação de oócitos promovido pela adiponectina em caprinos. Entender estes mecanismos é essencial porque a influência da adiponectina sobre a habilidade da maturação de oócitos tem importantes implicações para a melhoria na eficiência da produção de embriões *in vitro* nessa espécie.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Maturação *in vitro* de oócitos

Com a remoção do ambiente folicular, o complexo *cumulus* oócito (COC) perde seu contato com as células foliculares, e como consequência da interrupção da transferência de fatores inibidores da maturação ao oócito, ocorre retomada “espontânea” da meiose independente do estágio de maturidade citoplasmática (BYSKOV et al., 1997).

A maturação *in vitro* envolve o cultivo dos oócitos imaturos para que estes atinjam estágio de metáfase II (MII) da meiose e complete a maturação citoplasmática, quando então estarão prontos para serem fecundados (COGNIE et al., 2003). Durante o cultivo, o ambiente e os meios utilizados devem ser cuidadosamente controlados, tentando mimetizar o máximo possível o ambiente folicular *in vivo* (GOTTARDI E MINGOTI, 2009).

Após a obtenção dos oócitos, aqueles que possuem no mínimo 3 a 4 camadas de células do *cumulus*, sem expansão, citoplasma uniformemente granulado e com coloração homogênea, são selecionados para maturação (BERNARDI, 2005). Os oócitos selecionados são lavados em meio de lavagem várias vezes e transferidos para placas com meio de maturação, em seguida são levados para estufa com atmosfera controlada (PADILHA, 2012).

Em ruminantes, de forma geral, o tempo de permanência dos oócitos na estufa para maturação varia entre 22 e 24h (MERMILLOD et al., 2006). Entretanto, estudos mais recentes mostraram que em caprinos esse tempo pode variar de 24 à 27h (AVELAR et al., 2012; PARAMIO E IZQUIERDO, 2014). Existem dois tipos de atmosfera utilizados na Produção *In Vitro* de Embriões (PIVE) que são: estufa a 38 °C com 5% de CO<sub>2</sub> e estufa a 38 °C com 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, e 90% N<sub>2</sub>, sendo a primeira mais utilizada nos laboratórios, uma vez que, a segunda apresenta custos maiores no que diz respeito ao abastecimento de nitrogênio.

#### 2.1.1 Maturação Nuclear

A maturação do oócito, envolvendo as transformações nucleares e citoplasmáticas, está ligada a uma série de mudanças estruturais e bioquímicas que tornam o gameta feminino apto a ser fecundado e ter desenvolvimento embrionário subsequente (GONÇALVES et al., 2008). A maturação nuclear inicia-se com a quebra de vesícula germinativa (GVBD) e termina apenas quando a meiose é finalizada, marcada pela segregação dos cromossomos e extrusão dos dois corpúsculos polares (CROCOMO et al., 2011).

Na maioria dos mamíferos, durante a vida intrauterina, os oócitos iniciam a meiose após intensas mitoses. Diversos fatores inibitórios sintetizados pelas células da granulosa e presentes no fluido folicular interrompem as divisões meióticas no estágio diplóteno da prófase I, morfológicamente designado como vesícula germinativa (VG). Neste estágio, os oócitos permanecem até a puberdade, quando passam a ser gradualmente mobilizados, havendo retomada da meiose (HURK E ZHAO, 2005).

A maturação nuclear é caracterizada pela habilidade do oócito em retomar a meiose até o estágio de MII (BLANCO et al., 2011), isso ocorre *in vivo* com o oócito ainda no folículo, após estímulo dado pelo pico do hormônio luteinizante (LH), momentos antes da ovulação (GONÇALVES et al., 2008). No entanto, essa gonadotrofina não atua diretamente no oócito, uma vez que este não apresenta receptores para LH. Sua ação é mediada por fatores parácrinos secretados pelas células somáticas LH-responsivas (células da granulosa), e pelo transporte de substâncias indutoras da meiose das células da granulosa/*cumulus* para os oócitos por meio das junções “*Gap*” comunicantes (GJCs) (GILULA et al., 1978).

O objetivo central da maturação nuclear é a produção de um gameta haploide (n cromossomos). Portanto, trata-se da divisão reducional dos cromossomos, consistindo de dois ciclos de divisão celular sem nova síntese de DNA. A primeira divisão separa os cromossomos homólogos e a segunda divisão separa as cromátides irmãs, formando os gametas haploides (SILVA, 2008). Os oócitos são mantidos em MII até a fertilização, quando a ativação do estímulo realizado pela penetração do espermatozoide desencadeia o término do ciclo da meiose e inicia o desenvolvimento embrionário (HURK E ZHAO, 2005).

Durante o crescimento do oócito dentro do folículo, muitas proteínas são sintetizadas. Uma dessas proteínas, é o fator promotor de meiose (FPM) no citoplasma, que é essencial no processo de desenvolvimento do oócito antes e após a ativação do genoma do zigoto (GONÇALVES et al., 2008). O FPM é uma proteína quinase constituída por uma subunidade catalítica (p34) e outra regulatória (ciclina B), e é descrito como um regulador universal do ciclo celular tanto na mitose como na meiose (GONÇALVES et al., 2008; CHAVES et al., 2012).

Além do FPM, Gonçalves et al., (2008) evidenciam a importância da proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK). Os autores descrevem que a MAPK é ativada no rompimento da vesícula germinativa, atinge a atividade máxima em metáfase I (MI) e permanece elevada até a formação dos pronúcleos, não diminuindo em metáfase II (MII). Esses achados sugerem que a MAPK é importante para manter o oócito em MII e entrar em interfase. Isso ocorre pelo fato da MAPK ser capaz de manter a atividade elevada do FPM.



A ação dessas proteínas já foi avaliada no processo de maturação meiótica de oócitos caprinos, onde foi possível observar o aumento da expressão das mesmas a partir do momento em que os oócitos saem do estágio de vesícula germinativa (VG) e entram em MI e MII. Esses achados reafirmam que estas proteínas têm ação sobre a progressão meiótica também em oócitos da espécie caprina (DEDIEU et al., 1998).

### *2.1.2 Maturação Citoplasmática*

A maturação citoplasmática pode ser considerada como o conjunto de processos pelo qual o oócito de mamíferos passa para se tornar uma célula capaz de fecundar e dar suporte ao desenvolvimento embrionário inicial. Estas mudanças dizem respeito à redistribuição das organelas celulares, dentre elas os grânulos corticais, a estocagem de proteínas e RNA, o desenvolvimento de mecanismos regulatórios do cálcio, entre outros (ANGUITA et al., 2007; WATSON, 2014).

Segundo Chaves et al. (2012), tal evento é necessário para a obtenção de condições de bloqueio à polispermia, e para descondensar o núcleo do espermatozoide que penetrou e formar o pronúcleo masculino após a fecundação. Dessa forma, um oócito que não completou ainda sua maturação citoplasmática possui baixa qualidade e é incapaz de se desenvolver normalmente.

A migração e a reorganização de organelas durante a maturação citoplasmática são coordenadas por uma rede de microtúbulos. Organelas citoplasmáticas como as mitocôndrias e os grânulos corticais exercem importantes funções durante a maturação e a fecundação do oócito. Devido a isso, durante a maturação, essas organelas migram e posicionam-se no citoplasma em locais mais apropriados para iniciar suas atividades específicas (GOTTARDI E MINGOTI, 2009).

O desenvolvimento do oócito, zigoto e embrião de menos de 16 células dependem do *pool* de RNAm e das proteínas acumuladas para suportar todas as modificações bioquímicas, moleculares e estruturais do oócito que ocorrem durante a maturação. Assim, a maturação do citoplasma em oócitos é adquirida após uma série de processos preparatórios que envolvem a transcrição e consequente tradução de transcritos durante a prófase meiótica (LONERGAN et al., 2003).

A maioria dos RNAm presentes no oócito são sintetizados e acumulados durante o período de crescimento oocitário (DE SOUSA et al., 1998). Isto ocorre porque a retomada da meiose envolve a condensação dos cromossomos, o que resulta em súbito bloqueio da

transcrição nuclear e em profundas modificações no padrão de neossíntese proteica (SIRARD et al., 2006; GOTTARDI E MINGOTI, 2009).

## 2.2 Meios e suplementos usados para MIV

Para se obter sucesso no processo de produção *in vitro* de embriões, de maneira geral, é necessário que o ambiente e o meio onde as células serão cultivadas mimetizem seu ambiente de origem. Assim, existem três classificações para os sistemas de MIV: (I) Aqueles com meio indefinido, onde Soro Fetal Bovino (SFB) e/ou células somáticas são utilizados; (II) meio semi-definido, sem células somáticas e SFB, que é substituído por Albumina Sérica Bovina (BSA); e (III) o sistema com meio definido, em que a albumina é substituída por macromoléculas, tais como álcool polivinílico (PVA) ou polivinil pirrolidona (PVP) (FARIN et al., 2001).

Nesse sentido, existem alguns meios que podem ser utilizados na etapa de maturação *in vitro*, entretanto, o mais utilizado é o meio de cultivo de tecido 199 (TCM- 199). O TCM-199 é um meio constituído por uma fórmula complexa, originalmente designada para as necessidades metabólicas de células somáticas. Desta forma, esse meio não é específico para suprir as necessidades complexas e dinâmicas de COCs durante o cultivo de maturação *in vitro* (GOTTARDI E MINGOTI, 2009), sendo rotineiramente suplementado com substâncias que ajudam a mimetizar o ambiente folicular e assim, colaboram diretamente no desenvolvimento do oócito.

A maturação de oócitos caprinos *in vitro* é amplamente realizada com TCM-199 suplementado com L-glutamina, piruvato, hormônios (FSH, LH, estradiol) e antibióticos (COGNIÉ e BARIL, 2002; COGNIÉ et al., 2003; BALDASSARRE e KARATZAS, 2004; PARAMIO, 2010). L-glutamina e piruvato são utilizados como fonte de energia para o oócito, enquanto que os hormônios como FSH, LH e estradiol, são adicionados ao meio para melhorar a maturação nuclear e citoplasmática de oócitos, bem como a expansão das células do *cumulus* (COGNIÉ et al., 2003). A fonte proteica mais comumente utilizada como suplemento do meio de cultura para PIVE em pequenos ruminantes são o SFB e BSA (PARAMIO E IZQUIERDO, 2014; GOTTARDI e MINGOT, 2009).

Convencionalmente, os meios de MIV são suplementados com SFB ou fluido folicular (FF), ambos com composição desconhecida. As suas ações não são completamente compreendidas, mas acredita-se que eles proporcionam proteínas e alguns fatores de crescimento que contribuem para o êxito da maturação *in vitro* e subsequente desenvolvimento embrionário. Apesar da natureza indefinida e de composição variável, esta

suplementação é amplamente realizada em uma concentração convencional de 10-20% (PARAMIO E IZQUIERDO, 2014).

Tióis como cisteamina, 2- mercaptoetanol, cisteína, cistina e glutatona (GSH) foram adicionados ao meio de maturação com intuito de proteger o oócito contra os efeitos de radicais livres oriundos dos sistemas de atmosfera gerado pela estufa (MATOS et al., 2002). Paralelamente, a adição de cisteamina melhorou a taxa de blastocistos caprinos, onde foram observadas taxas de blastocisto de 22,2% do grupo com cisteamina e 6,4% do grupo controle (RODRIGUEZ- GONZALÉZ et al., 2003).

Vitaminas também foram utilizadas como suplementos em meio de maturação para caprinos, e foi observado que com a adição de vitaminas específicas (tiamina, riboflavina, cloridrato de piridoxal, ácido fólico, pantotenato de cálcio e nicotinamida), a taxa de clivagem e produção de blastocisto foi maior em relação ao grupo controle (BORMANN et al., 2003).

Fatores de crescimento também têm sido adicionados aos meios para melhorar o sistema de maturação e conseqüentemente a taxa de embrião. O fator de crescimento epidérmico (EGF) é o mais utilizado e demonstra bons resultados na taxa de maturação de oócitos em mamíferos (MARQUES et al., 2007). Além deste, Carneiro (2007), relata aumento na taxa de maturação nuclear de oócitos caprinos após a adição do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I).

### **2.3 Tecido adiposo e Reprodução**

Ao longo da última década, o tecido adiposo tem surgido como um elemento chave na modulação de várias funções fisiológicas, por meio da liberação de uma variedade de moléculas biologicamente importantes denominadas ‘adipocinas’, as quais modulam o metabolismo de lipídios e glicose, e sensibilidade à insulina (McGown et al., 2014).

Adicionalmente o tecido adiposo também está envolvido com as funções reprodutivas, uma vez que estas são dependentes de recursos energéticos. O papel do peso, composição corporal, distribuição de gordura e o efeito da dieta têm sido amplamente estudados em mulheres e fêmeas domésticas onde as suas alterações podem comprometer o tempo de maturação sexual e fertilidade (DUPONT et al., 2014). No entanto, os mecanismos celulares envolvidos na coordenação do balanço energético e reprodução são desconhecidos (DUPONT et al., 2012).

É evidente que o cérebro e as estruturas do hipotálamo recebem sinais endócrinos e/ou metabólicos que fornecem informações sobre o estado nutricional e o grau de depósitos de gordura no organismo. Entretanto, atualmente é amplamente aceito que existem efeitos

nutricionais diretos no desenvolvimento dos ovários e atresia folicular, que regulam a produção de células germinativas. Assim, é sugerido que existem mecanismos específicos de detecção de energia no folículo (SAM e DHILLO, 2010).

Entre estes sensores de energia, existem fatores liberados pelo tecido adiposo chamados de adipocinas (leptina, adiponectina, resistina, visfatina) e também suas vias de sinalização como, por exemplo, a proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK) (DUPONT et al., 2012). No ovário, comunicações bidirecionais entre as células germinativas (oócitos) e células somáticas (células da granulosa) são cruciais para a maturação do oócito, crescimento folicular e ovulação. Assim, todo processo que compreende a formação folicular, bem como seu desenvolvimento tem a participação de mediadores do balanço energético (BINELLI E MURPHY, 2010).

As adipocinas, de maneira geral, podem ser localizadas em diferentes células do ovário (MAILLARD et al., 2011) participando, não só da esteroidogênese, como também do desenvolvimento das estruturas do ovário (SHEN et al., 2010; MAILLARD et al., 2010; MAILLARD et al., 2011).

## **2.4 Adiponectina**

### *2.4.1 Estrutura e sinalização*

A adiponectina é uma proteína de 244 aminoácidos (peso molecular 30 000 Da) derivada predominantemente a partir de adipócitos em tecido adiposo branco. É uma das mais abundantes adipocinas, correspondendo a 0,05% das proteínas séricas (HU et al., 1996).

Existem três formas diferentes de adiponectina circulantes no plasma e essas formas variam de acordo com seu peso molecular, sendo: a forma de um trímero de um peso molecular baixo, uma combinação de dois trímeros como médio peso molecular, ou como seis trímeros de elevado peso molecular (KONSTANTINOS et al., 2010). O monómero de adiponectina é composto por três domínios: uma região N-terminal variável, uma hélice colagenosa helicoidal composta por múltiplas repetições G-X-X, e um domínio globular C-terminal distintivo de aproximadamente 140 aminoácidos (SHAPIRO E SCHERER, 1998). Ela sofre uma extensa modificação pós-tradução, particularmente dentro do domínio colágeno, como a hidroxilação de sete resíduos de prolina e hidroxiglicosilação de cinco resíduos de lisina (RICHARDS et al., 2006).

A adiponectina atua principalmente através de dois receptores transmembranares chamados de AdipoR1 e AdipoR2 (KONSTANTINOS et al., 2010). Esses receptores são

distintos entre si desempenhando diferentes papéis nas funções inerentes à adiponectina. Kadowai e Yamauchi (2005) afirmam que a expressão de AdipoR1 e AdipoR2 é influenciada pela secreção de insulina e esteroides sexuais.

#### *2.4.2 Papel no metabolismo energético*

O papel fisiológico da adiponectina não está completamente elucidado, mas sabe-se que ela apresenta funções importantes sobre o metabolismo. Contrastando com a maioria das proteínas secretadas pelos adipócitos, sua expressão diminui à medida que o tecido adiposo aumenta (OUCHI et al., 1999) e sua concentração no soro encontra-se reduzida em indivíduos obesos ou resistentes à insulina (SAM e DHILLO, 2010).

Foi sugerido que indivíduos com concentrações circulantes elevadas de adiponectina estão menos sujeitos ao desenvolvimento de diabetes tipo II, quando comparados àqueles com concentrações reduzidas (SPRANGER et al., 2003), afirmando assim suas funções nesse sistema. Para tanto estudo revelou que a adiponectina atua de forma favorável sobre a regulação do metabolismo da glicose e dos ácidos graxos, bem como sobre o mecanismo central da fome e do gasto energético (GUIMARÃES et al., 2007).

Como vimos anteriormente, a adiponectina atua através de dois receptores o AdipoR1 e AdipoR2. Os AdipoR1 são expressos abundantemente no músculo esquelético, enquanto os AdipoR2 apresentam maior expressão no fígado (YAMAUCHI et al., 2004). No músculo esquelético as ações do AdipoR1 são mediadas pelo receptor ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR) e pela proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK), estimulando a reabsorção da glicose e  $\beta$ -oxidação (WANG et al., 2009).

No tocante a ação do AdipoR2, estudos demonstram que estes receptores podem ser responsáveis por mediar alguns dos efeitos metabólicos do GH ( hormônio do crescimento) no tecido adiposo. Além disso, a regulação positiva dos AdipoR2 pelo GH possivelmente contribui para a melhora da sensibilidade à insulina, promovida pela adiponectina no tecido adiposo (GUIMARÃES et al., 2007).

A adiponectina apresenta, também, importante função sobre a diminuição da resistência à insulina. Seu efeito nesse sentido é mediado, pelo menos em parte, por um aumento da oxidação de gordura por ativação da enzima adenina monofosfato quinase, em músculos esqueléticos, semelhante à ação sinalizada pela própria insulina. Além disso, adiponectina também ativa essa enzima no fígado, resultando na redução da produção de glicose hepática (YAMAUCHI et al., 2002).

Podemos afirmar que as ações da adiponectina estão relacionadas com sua capacidade de estimular as vias da proteína kinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK) e também de inibir a atividade do fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa).

#### 2.4.3 Papel na reprodução da fêmea

Além da regulação energética, a adiponectina, atua em vários níveis para controlar a fertilidade feminina, através de efeitos centrais no eixo hipotálamo-hipófise e efeitos periféricos nos ovários, útero e embrião (TABANDEH et al., 2010). Os receptores da adiponectina, já foram identificados em células ovarianas de suínos (CHAPPAZ et al., 2008), galinhas (RAMACHANDRAN et al., 2007), bovinos (MAILLARD et al., 2010), roedores (DUPONT, 2007) e cabras (OLIVEIRA et al., 2017).

Tem sido demonstrado que a nível hipotalâmico-hipofisário a adiponectina atua regulando a secreção de hormônios envolvidos na reprodução, principalmente o LH, através da ativação da AMPK. Este resultado foi mostrado por Lu et al. (2008), que relataram que a redução aguda nos níveis de adiponectina leva a secreção aumentada de LH, mas sem impacto sobre o FSH. Ainda no eixo hipotálamo-hipófise foi demonstrado que em células pituitárias primárias de ratos, a adiponectina recombinante regula a expressão de receptores de GnRH, isso, por mecanismos ainda pouco conhecidos (RODRIGUEZ-PACHECO et al., 2007).

Diretamente nos ovários, então, acredita-se que a adiponectina induz a expressão de proteínas envolvidas na ovulação, tais como a ciclo-oxigenase-2, a prostaglandina E2, e o fator de crescimento epidérmico (EGF) (LEDOUX et al., 2006). Além de tais funções, um estudo em ratos demonstrou que a adiponectina atua regulando positivamente a síntese de hormônios esteróides no ovário. O mesmo estudo mostrou, ainda, que há interação sinérgica da adiponectina com a insulina e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) nesse processo de síntese (DUPONT et al., 2007).

Tem sido demonstrado que a adição de adiponectina ao meio MIV melhora a taxa de maturação *in vitro* de oócitos caprinos (OLIVEIRA et al., 2017) e suínos (CHAPPAZ et al., 2008). Em adição, foi demonstrado, também, que a adiponectina melhorou o desenvolvimento embrionário *in vitro* em suínos (CHAPPAZ et al., 2008) e ratos (RICHARD et al., 2012). Em bovinos, entretanto, a suplementação do meio de MIV com adiponectina não afetou a maturação meiótica (MAILLARD et al., 2010), sugerindo um papel espécie específico para a adiponectina.

### 3 REFERÊNCIAS

ANGUITA, B.; JIMENEZ-MACEDO, A. R.; IZQUIERDO, D.; MOGAS, T.; PARAMIO, M. T. Effect of oocyte diameter on meiotic competence, embryo development, p34 (cdc2) expression. And MPF activity in prepubertal goat oocytes.

**Theriogenology**, Barcelona, v. 67, p. 526-536, jun/ago, 2007.

AVELAR, S.R.G. et al. Oocyte production and in vitro maturation in Canindé goats following hormonal ovarian stimulation. **Animal Reproduction**, v.9, n.1, p.27-32, jan./mar. 2012.

BALDASSARE, H.; KARATZAS, C. N. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. **Animal Reproduction Science**, v. 82, p. 255–266, 2004.

BERNARDI, M. L. Produção *in vitro* de embriões ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 33, n.1, p. 1-16. 2005.

BLANCO, M. R.; DEMYDA S.; MORENO, M. M.; GENERO, E. Developmental competence of in vivo and in vitro matured oocytes: A review. **Biotechnology and Molecular Biology Review**. v. 6, n.7, p. 155-165, 2011.

BINELLI, M.; MURPHY, B.D.; Coordinated regulation of follicle development by germ and somatic cells. **Reprod Fertil Dev**. 22, 1-12, 2010.

BORMANN, C. L.; ONGERI, E. M.; KRISHER, R. L. The effect of vitamins during maturation of caprine oocytes on subsequeute developmental potential in vitro.

**Theriogenology**, Estados Unidos, v. 59, p. 1373-1380, 2003.

BYSKOV, A. G.; ANDERSEN, C. Y.; HOSSAINI, A.; GUOLIAN , X. Cumulus Cells of Oocyte-Cumulus Complexes Secrete a Meiosis-Activating Substance when Stimulated with FSH. **Molecular Reproduction and Development**, v. 46, p. 296–305, 1997.

CARNEIRO, G. F. Biotecnologia da reprodução na espécie caprina: perspectivas atuais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.2, p.268-273, abr./jun. 2007.

CHAPPAZ, E. et al. Adiponectin enhances in vitro development of swine embryos. **Dom. Anim. Endocrinol.** 35, 198-207, 2008.

CHAVES, R. M. et al. Efeito do diâmetro folicular sobre a qualidade dos oócitos obtidos de ovários de ovelhas (*ovis aries*) e cabras (*capra hircus*). **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n. 3, p. 683-688, 2010.

COGNIÉ, Y. BARIL, G. Le point sur la production et le transfert d'embryons obtenus in vivo et in vitro chez la brebis et la chèvre. **INRA Prod. Anim**, v. 15, p.199-207. 2002.

COGNIÉ, Y.; BARIL, N. P.; MERMILLOD, P. Current status of embryo Technologies in sheep and goat. **Theriogenology**, França, v. 59, p. 171-188, 2003.

CROCOMO, L. F.; FILHO, W. C. M.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; BICUDO, S. D. aspectos bioquímicos e ultraestruturais da maturação oocitária. **Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v. 18, n.4, p. 542-552, 2011.

DEDIEU, T.; GALL, L.; HUE, I.; LEDAN, E.; CROZET, N.; RUFFINI S.; SEVELLEC, C. S. S. p34 Expression and meiotic competence in growing goat oocytes. **Molecular reproduction and development**, v. 50, p. 251–262. 1998.

DE SOUSA P.A.; CAVENEY, A.; WESTHUSIN, M.E.; WATSON, A.J. Temporal patterns of embryonic gene expression and their dependence on oogenetic factors. **Theriogenology**, v. 49, p.115-128, 1998.

DUPONT, J. et al. Involvement of adipokines, AMPK, PI3K and the PPAR signaling pathways in ovarian follicle development and cancer. **Int. J. Dev. Biol.** 56, 959-967, 2012.



DUPONT, J.; REVERCHON, M.;BERTOLDO, M. J.; FROMENT, P. Nutritional signals and reproduction. *Molecular and Cellular Endocrinology* v. 382, p. 527–537, 2014.

FARIN, P.W.; CROSIER, A.E.; FARIN, C.E. Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle. *Theriogenology* 55, 151–170, 2001.

FONSECA, V. U.; PAPA, P. C.; CAMPOS, D. B. Potencial envolvimento da adiponectina e seus receptores da esteroidogênese em corpo lúteo ao longo do diestro. *Pes. Vet. Brasileira*, v. 32, p. 1055-1060,2012.

GALIC, S. et al. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol. Cell. Endocrinol.* 316, 129-139,2010.

GILULA, N. B.; EPSTEIN, M. L.; BEERS, W. H. Cell-to-cell communication and ovulation: A Study of the Cumulus-Oocyte Complex. *The journal of cell Biology*, v.78, p. 21-25, 1978.

GONÇALVES, P. B. D.; OLIVEIRA, M. A. L.; MEZZALIRA, A.; MONTAGNER, M. M.; VISINTIN, J. A.; COSTA, L. F. S. Produção in vitro de embriões. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**, 2ª Edição, São Paulo, Roca. p. 261-291. 2008.

GOTTARDI, F.P.; MINGOTI, G.Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.33, n.2, p.82-94, abr./jun. 2009.

GUERRA, M. M. P.; SILVA, S. V.; BATISTA, A.M.; COLETO, Z. F.; SILVA, E. C. B.; MONTEIRO JR, P. L. J.; CARNEIRO, G. F. Goat reproductive biotechnology in Brazil. *Small Ruminant Research* v. 98, p. 157-163, 2011.

GUIMARÃES, D. E. D.; SARDINHA, F. L. C.; MIZURINI, D. M.; TAVARES DO CARMO, M. G. Adipocitocinas: uma nova visão do tecido adiposo. **Rev. Nutrição Campinas**, v. 20(5), p. 549-559, set./out., 2007.

HU E.; LIANG P.; SPIEGELMAN B.M. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. **J. Biol. Chem.** v. 271, p. 10697–10703, 1996.

HURK, R. V. D.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p.1717–1751, 2005.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da Pecuária Municipal 2014, v. 39, p.1-63, 2014.

KADOWAKI, T.; YAMAUCHI, T. Adiponectin and adiponectin receptors. **Endocr. Rev.** 26, 439-451, 2005.

KONSTATINOS, G.; MICHALATIS, M. D.; SEGARS, J. H. The role of adiponectin in reproduction: from polycystic ovary syndrome to assisted reproduction. **Fertility and Esterility**. v. 94, p. 6, 2010.

LEDOUX, S.; CAMPOS, D. B.; LOPES, F. L.; DOBIAS-GOFF, M.; PALIN, M. F.; MURPHY, B.D.; Adiponectin induces periovulatory changes in ovarian follicular cells. **Endocrinology**. v. 147, p. 5178-86, 2006.

LONERGAN, P.; FAERGE, I.; HYTTEL, P.M.; BOLAND, M.; FAIR, T. Ultrastructural modifications in bovine oocytes maintained in meiotic arrest in vitro using roscovitine or butyrolactone. **Mol Reprod Dev**, v.64, p.369-378, 2003.

LU, M.; TANG, Q.; OLEFSKY, J.M.; MELLON, P.L.; WEBSTER, N. J. Adiponectin activates adenosine monophosphate-activated protein kinase and decreases luteinizing hormone secretion in LbetaT2 gonadotropes. **Mol Endocrinol.** 22, 760-71, 2008.

MAILLARD, V.; UZBEKOVA, S.; GUIGNOT, F.; PERREAU, C.; RAMÉ, C.; COYRAL-CASTEL, S.; DUPONT, J. Effect of adiponectin on bovine granulosa cell steroidogenesis, oocyte maturation and embryo development. **Reproductive Biology**

**and Endocrinology** , 8-23, 2010.

MAILLARD, V., FROMENT, P., RAME, C., UZBEKOVA, S., ELIS, S. and DUPONT, J. Expression and effect of resistin on bovine and rat granulosa cell steroidogenesis and proliferation. **Reproduction** 141, 467-479, 2011.

MARQUES, M.G.; NICACIO, A.C.; OLIVEIRA, V.P.; NASCIMENTO, A.B.; CAETANO, H.V.A.; MENDES, C.M.; MELLO, M.R.B.; MILAZZOTTO, M.P.; ASSUMPCÃO, M.E.O.A.; VISINTIN, J.A. In vitro maturation of pig oocytes with different media, hormone and meiosis inhibitors. **Anim Reprod Sci**, v.97, p.375-381, 2007.

MATOS, D. G.; GASPARRINI, B.; PASQUALINI, S. R.; THOMPSON, J. G. Effect of glutathione synthesis stimulation during in vitro maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. **Theriogenology**, Argentina, v.57, p. 1443- 1451, 2002.

MERMILLOD, P. et al. In vitro production of ruminant embryos: results, limits and perspectives. **Scientific Cooperation in Agriculture**, França, v. 7, p. 10-13, 2006.

McGOWN, C.; BIRERDINC, A.; YOUNOSSI, Z. M. Adipose tissue as an endocrine organ. *Clin. Liver Dis.* v. 18, p. 41-58, 2014.

OLIVEIRA, B. S. P.; COSTA, J. A. S.; GOMES, E. T.; SILVA, D. M. F.; TORRES, S. M.; MONTEIRO, P. L. J.; FILHO, A. S. S.; GUERRA, M. M. P.; CARNEIRO, G. F.; WISCHRAL, A.; BATISTA, A. M. Expression of adiponectin and its receptors (AdipoR1 and AdipoR2) in goat ovary and its effect on oocyte nuclear maturation *in vitro*. **Theriogenology**, v. 104, p. 127-133, 2017.

OUCHI N.; KIHARA S.; ARITA Y. Novel modulator for endothelial adhesion molecules; adipocyte-derived plasma protein, adiponectin. **Circulation**. V. 100, p.2473-6, 1999.

PADILHA, L. C. Maturação in vitro de oócitos de ovelhas santa inês submetidas a sucessivas sessões de aspiração folicular por videolaparoscopia. 2012. 84f. Dissertação

(Mestrado em Reprodução Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2012.

PARAMIO, M. T. In vivo and in vitro embryo production in goats. **Small Ruminants Research**, v. 89, p. 144-148, jan/fev. 2010.

PARAMIO, M.T.; IZQUIERDO, D. Current status of in vitro embryo production in sheep and goats. *Reprod. Dom. Anim.* 49, suppl. 4, 37-48, 2014.

PARAMIO, M.T.; IZQUIERDO, D. Recent advances in *in vitro* embryo production in small ruminants. *Theriogenology*, v. 86, p. 152-159, 2016.

PAULA, N. R. O.; CARDOSO, J. F. S.; OLIVEIRA, M. A. L.; FREITAS, V. J. F. Embriões caprinos produzidos in vivo ou in vitro: técnicas, problemas e perspectivas. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.32, n.1, p.21-35, jan./mar. 2008.

RAMACHANDRAN, R.; OCON-GROVE, O.M.; METZGER, S. L.; Molecular cloning and tissue expression. Of chicken AdipoR1 and AdipoR2 complementary deoxyribonucleic acids. **Domest Animal Endocrinol.** 33, 19-31, 2007.

RICHARDS, A. A.; STEPHENS, T.; CHARLTON, H.K.; JONES, A.; MACDONALD, G. A.; PRINS, J. B.; WHINTEHEAD, J.P. Adiponectin Multimerization is dependente on conserved lysines in the collagenous domain: Evidence for regulation of regulation of multimerization by alterations is posttranlation al modification. **Molecular Endocrinology**, v.20, p.1673-1687, 2006.

RICHARDS, J.S. et al. Adiponectin and its receptors modulate granulosa cell and cumulus cell functions, fertility and early embryo development in the mouse and human. *Fertil. Steril.* 98, 471-479, 2012.

RODRIGUEZ-PACHECO, F.; MARTINEZ-FUENTES, A.J.; TOVAR, S.; PINILLA, I.; TENA-SEMPERE, M.; DIEGUEZ, C.; Regulation of pituitary cell funcion by

adiponectin. **Endocrinology**. 48, 401-10, 2008.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, E.; BEJAR, M. L.; MERTENS, M.; PARAMIO, M. T. Effects on In Vitro Embryo Development and Intracellular Glutathione Content of the Presence of Thiol Compounds During Maturation of Prepubertal Goat Oocytes. **Molecular reproduction and development**, Barcelona, v. 65, p. 446–453, 2003.

SAM, H. A.; DHILLO, W. S. Review Endocrine links between fat and reproduction. **The Obstetrician e Gynecologist**, v. 12, p. 231-236, 2010.

SHAPIRO, L.; SCHERER, P.E.; The crystal structure of a complement-1q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor. **Curr. Biol.** v. 8, p.335–338, 1998.

SHEN, C.J., TSAI, E.M., LEE, J.N., CHEN, Y.L., LEE, C.H. and CHAN, T.F. The concentrations of visfatin in the follicular fluids of women undergoing controlled ovarian stimulation are correlated to the number of oocytes retrieved. **Fertil Steril** 93, 1844-1850, 2010.

SILVA, I. O. Inibição e reversão da maturação nuclear , avaliação da maturação citoplasmática e produção de esteroides em complexos cumulus oophorus bovinos cocultivados com hemiseções foliculares em meio de cultura definido. 2008. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

SIRARD, M.A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**. 65, 126-36, 2006.

SPRANGER J.; KROKE A.; MOHLIN M.; BERGMANN M. M.; RISTOW, M.,; BOEING, H. Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. **Lancet**. V. 361, p. 226-8, 2003.

TABANDECH, M.R; HOSSEINI, A.; SAEB, M.; KAFI, M.; SAEB, S. Changes in the gene expression. Of adiponectin and adiponectin receptors (AdipoR1 and AdipoR2) in ovarian follicular cells of dairy cow at diferente stages of development. **Theriogenology**.

73, 659-669, 2010.

WANG, Y.; ZHOU, M.; LAM, K. S.L.; XU, A. Protective roles of adiponectin in obesity-related fatty liver diseases: mechanisms and therapeutic implications. *Bras Endocrinol Metab.* v.53, n.2, p.201-212, 2009.

WATSON, A. J.; Oocyte cytoplasmic maturation: A key mediator of oocyte and embryo developmental competence. *J. Anim. Sci.* V. 85, 2014.

Yamauchi, T.; Kamon, J.; Minokoshi, Y.; Ito, Y.; Waki, H.; Uchida, S.; Yamashita, S.; Noda, M.; Kita, S.; Ueki, K.; Eto, K.; Akanuma, Y.; Froguel, P.; Foufelle, F.; Ferre, P.; Carling, D.; Kimura, S.; Nagai, R.; Kahn, B.B.; Kadowaki, T. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med.* V. 8, p. 1288-95, 2002.

Yamauchi, T.; Kamon, J.; Ito, Y.; Tsuchida, A.; Yokomizo, T.; Kita, S.; Sugiyama, T.; Miyagishi, M.; Hara, K.; Tsunoda, M.; Murakami, K.; Ohteki, T.; Uchida, S.; Takekawa, S.; Waki, H.; Tsuno, N.H.; Shibata, Y.; Terauchi, Y.; Froguel, P.; Tobe, K.; Koyasu, S.; Taira, K.; Kitamura, T.; Shimizu, T.; Nagai, R.; Kadowaki, T. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*, v. 423, p.762–769, 2004.

YAMAUCHI, T.; IWABU, M.; OKADA-IWABU, M.; KADOWAKI, T. Adiponectin receptors: A review of their structure, function and how they work. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* v. 28, p. 15–23, 2014.

## **Efeito da suplementação com adiponectina durante a maturação *in vitro* de oócitos caprinos sobre a progressão meiótica e padrão de expressão gênica**

### **Resumo**

Estudos recentes têm demonstrado que a adiponectina, um hormônio proteico predominantemente produzido pelo tecido adiposo, influencia e regula o sistema reprodutivo. Entretanto, os mecanismos de ação da adiponectina sobre a maturação de oócitos caprinos permanecem para ser determinado. Este trabalho teve como objetivo investigar se: 1) a adiponectina influencia a maturação meiótica de oócitos caprinos; 2) a via MAPK MEK1/2 medeia os efeitos da adiponectina durante a maturação *in vitro* e 3) a adiponectina afeta de forma diferente a abundância de RNAm de genes relevantes para a transdução de sinal da adiponectina em oócitos e células cumulus. A adição de adiponectina (5 µg/mL) durante a maturação de oócitos caprinos afetou a porcentagem de oócitos que completaram a maturação nuclear com sucesso ( $P < 0,05$ ). A maturação nuclear de oócitos estimulada pela adiponectina foi significativamente prejudicada quando o inibidor específico de MEK 1/2 (U0126) foi adicionado ao meio de maturação. Não houve evidência de qualquer diferença induzida pela adiponectina na relativa abundância dos transcritos dos genes *AdipoR1*, *AdipoR2*, *AMPK $\alpha$ 1*, *PPAR $\alpha$*  e *PPAR $\gamma$* . A expressão de *AMPK $\alpha$ 2* foi significativamente inibida nas células do cumulus oriundas de complexos cumulus-oócitos maturados com 5 µg/mL de adiponectina comparados com aqueles maturados com 0 µg/mL ( $P < 0,05$ ). Em conclusão, a adiponectina melhora a maturação meiótica de oócitos caprinos através da via MAPK MEK 1/2. Adicionalmente, efeitos sobre os níveis do transcrito *AMPK $\alpha$ 2* foram detectados nas células do cumulus mas não nos oócitos.

**Palavras-chave:** *adiponectina, células do cumulus, AMPK, PPARs*

## Introdução

Adiponectina é um hormônio proteico de 30 kDa produzido predominantemente pelo tecido adiposo e abundantemente presente na circulação (1 a 50  $\mu\text{g/mL}$ ) em mamíferos (Rak *et al.* 2017). Os níveis circulantes de adiponectina são inversamente correlacionados com a massa de gordura corporal e positivamente associado com metabolismo lipídico, homeostase de glicose e sensibilidade à insulina (Yamauchi *et al.* 2001, De Koster *et al.* 2016). Além do papel na regulação da homeostase energética, a adiponectina tem sido implicada nas funções reprodutivas de várias espécies (Campos *et al.* 2008, Palin *et al.* 2012, Rak *et al.* 2017). Há evidências acumuladas que a adiponectina desempenha função na cascata de eventos associados com a maturação de oócitos.

Experimentos prévios têm demonstrado que a suplementação com adiponectina durante a maturação *in vitro* (MIV) de oócitos de humanos, camundongos e suínos exerce efeitos positivos sobre a progressão meiótica e o desenvolvimento embrionário inicial (Chappaz *et al.* 2008, Richards *et al.* 2012). Adicionalmente, nosso grupo demonstrou que concentrações fisiológicas de adiponectina recombinante humana (5 ou 10  $\mu\text{g/mL}$ ), adicionadas ao meio de maturação *in vitro* livre de soro, também aumenta a maturação meiótica de oócitos caprinos (Oliveira *et al.* 2017). Em contraste, o tratamento de complexos cumulus-oócitos bovinos com adiponectina não apresentou efeito sobre a progressão meiótica ou desenvolvimento embrionário *in vitro* (Maillard *et al.* 2010, Divar *et al.* 2016).

A adiponectina exerce sua ação por meio da ligação a dois receptores específicos, AdipoR1 e AdipoR2 (Yamauchi *et al.* 2014). A expressão de ambos receptores têm sido relatada no ovário de várias espécies (humanos: Chabrolle *et al.* 2009, roedores: Chabrolle *et al.* 2007a; suínos: Lord *et al.* 2005; aves: Chabrolle *et al.* 2007b; bovinos: Tabandeh *et al.* 2010). Em caprinos, nós demonstramos a expressão gênica e protéica de AdipoR1 e AdipoR2 em oócitos, células do cumulus, células da granulosa e teca oriundos de folículos em diferentes estágios de desenvolvimento (Oliveira *et al.* 2017). Todos estes dados sugerem que a adiponectina possa exercer função importante no processo de maturação de oócitos.

A ligação da adiponectina aos seus receptores leva à sinalização de vários caminhos: proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK), receptores ativados por proliferador de peroxixomos (PPARs) e proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) (Yamauchi *et al.* 2014). Há evidências que implicam a via MAPK ERK1/2 como mediadora da ação da adiponectina sobre a esteroidogênese de células da granulosa cultivadas de bovino (Maillard *et al.* 2010). Além disso, tem sido demonstrado que os efeitos positivos da



adiponectina sobre maturação meiótica de oócitos suínos é mediada através da via p38MAPK (Chappaz *et al.* 2008).

Embora a adiponectina possa estar integrada em um complexo sistema de comunicação intracelular que regula funções celulares específicas (Rak *et al.* 2017), não há informações sobre os mecanismos moleculares através dos quais a adiponectina promove maturação de oócitos em caprinos. Portanto, o objetivo do presente estudo foi investigar se: 1) a adição de adiponectina durante a maturação de oócitos caprinos afeta a progressão meiótica; 2) o efeito benéfico da adiponectina sobre a função do oócito é mediado pela via MAPK MEK1/2; e 3) a adiponectina afeta de forma diferente a abundância de RNAm de genes relevantes para a transdução de sinal da adiponectina em oócitos e células cumulus.

## **Material e Métodos**

### ***Coleta de oócitos e MIV***

Ovários de cabras adultas (*Capra hircus*) foram obtidos em abatedouro comercial e transportados ao laboratório em solução salina (0,9% NaCl) a 38 °C, contendo solução antibiótico/antimicótico (Ab/Am; 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina e 0.25 µg/ml amfotericina B; Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Folículos antrais entre 2-8 mm de diâmetro foram aspirados com agulha 18 G conectada a seringa de 10 mL. Os aspirados foliculares foram agrupados em tubo cônico e permitido sedimentar por 10 min. Após sedimentação, os complexos cumulus-oócitos (COCs) foram recuperados do fluido folicular, separados e lavados três vezes em Meio de Cultura de Tecidos 199 (TCM199/HEPES; Gibco, Life Technologies) suplementado com gentamicina (50 µg/mL). Apenas COCs com citoplasma homogêneo e uma ou mais camadas de células do cumulus compactas foram selecionados, lavados e alocados em gotas de 90 µL de meio de maturação em placas de petri 35 mm (Nunc, Roskilde, Dinamarca). As gotas foram cobertas com óleo mineral e incubadas por 27 horas a 38,5 °C com 5% de CO<sub>2</sub> e umidade máxima.

## **Desenho Experimental**

### ***Efeito da adiponectina recombinante sobre a maturação meiótica de oócitos***

Este experimento (o estudo de “acompanhamento”) foi projetado *de novo* para confirmar e ampliar os resultados de nossos estudos prévios (Oliveira *et al.* 2017). COCs ( $n = 390$  oócitos) selecionados morfológicamente, foram distribuídos aleatoriamente em grupos de 20-25 em gotas de 90 µL de meio de maturação livre de soro suplementado ou não com adiponectina (0 ou 5 µg/mL) ou 10% (v/v) de Soro Fetal Bovino (SFB) como controle

positivo. O meio de maturação consistiu de TCM199/Bicarbonato (Gibco, Life Technologies), suplementado com 2 mM de L-glutamina, 0.3 mM de piruvato de sódio e 50 µg/mL de gentamicina. A adiponectina recombinante humana (adiponectina humana de comprimento total, RD 172023100) derivada de células de mamíferos (células HEK 293) foi adquirida da BioVendor Laboratory Medicine (Heidelberg, Alemanha).

#### ***Avaliação da via mediada pela adiponectina MEK 1/2 durante a MIV***

A fim de avaliar se a adiponectina atua sobre a maturação do oócito ativando a via MAPK MEK 1/2, COCs ( $n = 430$  oócitos) foram distribuídos aleatoriamente em grupos de 20-25, para um dos seguintes tratamentos: MIV com 0 ou 5 µg/mL de adiponectina, na presença ou ausência de inibidor específico de MEK 1/2 (10 µM; U0126, EMD Millipore Corp., Billerica, MA, USA).

#### ***Determinação do estágio meiótico***

Após a maturação, as células do *cumulus* foram removidas mecanicamente através de cuidadosas pipetagens em PBS-PVP. Os oócitos desnudos foram incubados com 10 µg/mL Hoechst 33342 em PBS-PVP por 30 min à temperatura ambiente, lavados três vezes em PBS-PVP e montados em lâminas com meio de montagem ProLong<sup>®</sup> Golg (Molecular Probes, Life Technologies, Eugene, OR, USA), cobertos por lamínulas suportadas por colunas de parafina e seladas com verniz para unhas. As observações foram realizadas sob microscópio de fluorescência Axioplan Zeiss (Carl Zeiss, Inc., Göttingen, Alemanha), em aumento de 400 x. A maturação nuclear completa foi mensurada em termos de taxa de metáfase II (MII). As demais configurações foram classificadas como oócitos que reiniciaram o processo de meiose (taxa de metáfase I; M I) ou não (taxa de vesícula germinativa; GV).

#### ***Efeito da adiponectina sobre o nível de transcritos específicos em oócitos e células do cumulus***

Grupos de 15 oócitos (em 5 µL) e suas respectivas células do cumulus (em 50 µL) foram recuperados separadamente e armazenados a -80 °C até a extração de RNA. A abundância dos transcritos de *AdipoR1*, *AdipoR2*, *AMPK $\alpha$ 1*, *AMPK $\alpha$ 2*, *PPAR $\alpha$*  e *PPAR $\gamma$*  foram analisados por PCR em tempo real quantitativo (qPCR). Os genes analisados neste estudo foram selecionados com base em sua associação com a via de sinalização da adiponectina. Os iniciadores utilizados foram desenhados a partir de sequências publicadas para caprinos obtidas no banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology

Information). O iniciador para o gene de referência *Ubiquitina* (UBQ) foi descrito previamente (Frota *et al.* 2010). A sequência dos iniciadores e os números de acesso relevantes estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1. Sequência de oligonucleotídeos usados para realizar qPCR.**

Gene		Sequência (5'-3')	Gebank
<i>AdipoR1</i>	Forward	GAAGGTGGTGTTCGGGATGT	HQ846828.1
	Reverse	CAGTGTGGAAGAGCCAGGAG	
<i>AdipoR2</i>	Forward	GCTCTCAGGCTCAGGAAAGG	JX573540.1
	Reverse	AAGCCAGACGCCTCTACAAG	
<i>AMPK<math>\alpha</math>1</i>	Forward	GCTGTATAGCCCACAGGGAAG	XM_018065502.1
	Reverse	ATGTTTGCCAAATTGTTGGCCT	
<i>AMPK<math>\alpha</math>2</i>	Forward	ACCAGCTTGCAGTGGCTTAT	XM_018044652.1
	Reverse	GAACCGGTAGGGGGACTAGA	
<i>PPAR<math>\gamma</math></i>	Forward	TCCTCATATCCGAGGGCCAA	NM_001285658.1
	Reverse	CGCGTTGAACTTCACAGCAA	
<i>PPAR<math>\alpha</math></i>	Forward	CCTGCCTCCTCTGGGAAGTA	XM_018048906.1
	Reverse	GTGTCCACCATCTCCATCGG	
<i>Ubiquitina</i>	Forward	GAAGATGGCCGCACTCTTCTGAT	GI:57163956
	Reverse	ATCCTGGATCTTGGCCTTCACGTT	

#### *Isolamento de RNA e Transcrição Reversa*

O RNA total foi extraído de cada *pool* celular utilizando o kit RNeasy Micro (Qiagen<sup>®</sup>, Hiden, Germany), seguindo as instruções do fabricante. Cada amostra foi homogeneizada com 350  $\mu$ L do tampão de lise RLT e de 1 vol etanol a 70% e transferidas para coluna de centrifugação RNeasy MinElute sobre um tubo de recolha de 2 mL. Repetidas centrifugações foram realizadas por 15s a 8000 g, primeiramente com a adição de 350  $\mu$ L tampão RW1, 500  $\mu$ L do tampão RPE e 1 vol etanol a 80%. Ao final foi adicionado 14  $\mu$ L de água RNase-free à coluna e centrifugada a velocidade máxima para eluir o RNA. A possível contaminação por DNA genômico foi eliminada pelo tratamento com DNase I RNase-free (Qiagen<sup>®</sup>).

Imediatamente após a extração, o cDNA foi formado utilizando o Kit GoScript<sup>™</sup> Reverse Transcriptase (Promega<sup>®</sup>, Madison, WI, USA), seguindo as instruções do fabricante.

Foi adicionado 1  $\mu\text{L}$  do primer iniciador de reação Oligo (dT)<sub>15</sub> e 1  $\mu\text{L}$  de Random Primers em seguida incubado no termociclador por um ciclo de 70 °C por 5 minutos seguidos de um resfriamento rápido por 5 minutos à 4 °C. Em seguida foram adicionados 4  $\mu\text{L}$  de GoScript™ 5X Buffer de Reação, 1  $\mu\text{L}$  de mix de nucleotídeos, 4  $\mu\text{L}$  de MgCl<sub>2</sub>, 3  $\mu\text{L}$  de água livre de nucleases, 1  $\mu\text{L}$  de GoScript™ Transcriptase Reversa em cada amostra e incubados novamente no termociclador por um ciclo de 25 °C por 5 min, 42 °C por 60 min e inativação de enzima à 70 °C por 15 min. As amostras de cDNA total foram quantificadas utilizando o espectrofotômetro Nano Vue Plus (GE Healthcare Life Sciences Chicago, Illinois, USA). As amostras foram padronizadas na concentração de 1000 ng/ $\mu\text{L}$  e armazenadas a -80 °C.

#### *PCR Quantitativo (qPCR)*

A reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (qPCR) foi realizada utilizando o kit de amplificação Quantifast™ SYBR Green PCR (Qiagen®) no sistema PCR em Tempo Real Rotor Gene (Qiagen®). Para amplificação da amostra foram adicionados 1  $\mu\text{L}$  de cDNA, 0,3  $\mu\text{L}$  de cada primer *forward* e *reverse*, 5,9  $\mu\text{L}$  de água livre de nuclease e 7,5  $\mu\text{L}$  do Quantifast™ SYBR Green PCR (Qiagen®), em volume de reação final de 15  $\mu\text{L}$ . O protocolo consistiu de uma fase de ativação (95 °C por 2 min), seguida de uma fase de alongamento (95 °C por 15 segundos) e uma fase de anelamento/extensão (60 °C por 60 segundos), as duas últimas sendo repetidas por 40 ciclos. As reações foram realizadas em duplicata com controle negativo para cada primer analisado. O método delta-delta-CT ( $\Delta\Delta\text{Ct}$ ) foi utilizado para transformar os valores de CT em níveis de expressão normalizado (Livak & Schmittgen 2001).

#### *Análise estatística*

Os dados categóricos foram analisados utilizando-se o Procedimento Glimmix do SAS ajustados para distribuição binomial e a função “*logit*” foi utilizada. No entanto devido ao resultado 0 ou 100%, algumas análises foram realizadas pelo Teste Exato de Fisher usando o procedimento FREQ do SAS.

Para os dados da maturação *in vitro*, o procedimento Glimmix do SAS foi utilizado ajustando-se para distribuição Gaussiana e a função “*identify*” foi utilizada. As variáveis foram analisadas por meio de um modelo matemático que incluiu efeito fixo de tratamento. O método residual foi utilizado para calcular os denominadores graus de liberdade para aproximar os testes F nos modelos mistos. A proporção relativa dos oócitos em cada estágio de maturação nuclear foi calculada com a seguinte equação: Proporção relativa = número de

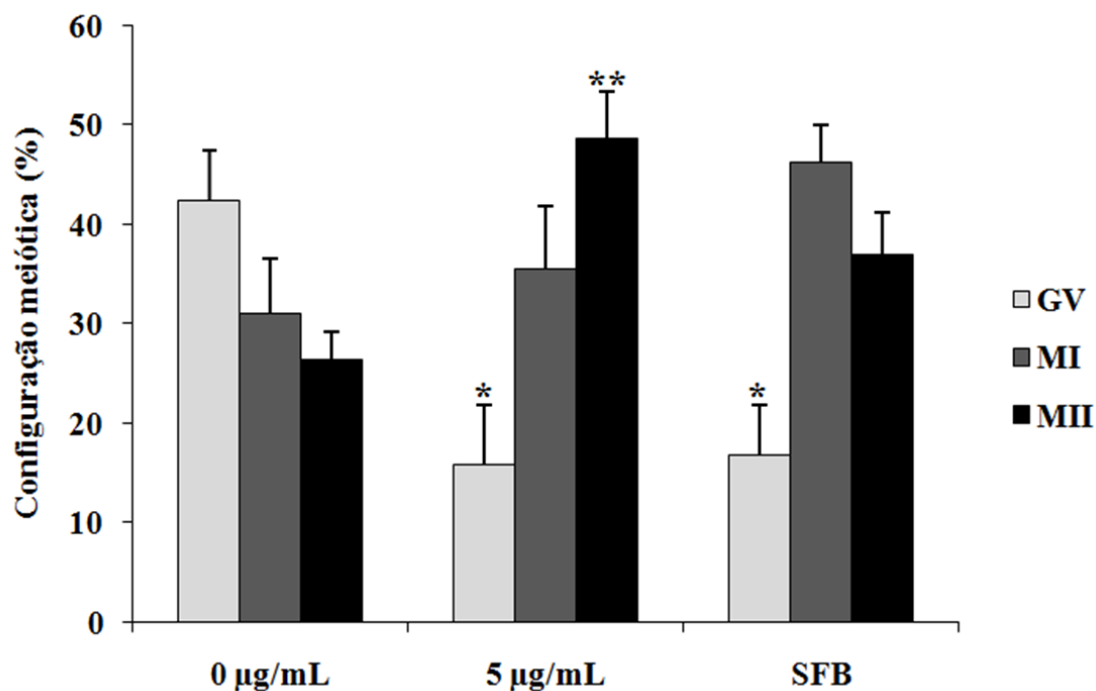
oócitos em cada estágio / total de oócitos. Todas as comparações estatísticas foram feitas utilizando médias ajustadas pelo método dos quadrados mínimos.

Os dados da qPCR são apresentados utilizando o método comparativo desenvolvido por Livak e Schmittgen (2001), utilizando células *cumulus* como referência para expressão relativa da abundância de RNAm, que foi ajustado para o valor relativo de 1. Os valores de *threshold* do ciclo delta ( $\Delta$ CT) para cada gene alvo foram obtidos após normalização do valor CT do gene de referência. Os dados foram analisados utilizando o  $\Delta$ CT com o procedimento Glimmix do SAS ajustado a uma distribuição Gaussiana e a função “*identify*” foi utilizada. Como efeito fixo do modelo foi considerado o tipo de célula e o tratamento, e o efeito aleatório de cada *pool* de células. Os  $\Delta\Delta$ CT foram obtidos a partir de diferenças de  $\Delta$ CT LSM de comparações entre pares entre tratamentos e a célula do *cumulus* do grupo controle foi utilizada como grupo de referência (Yuan *et al.* 2006). Os valores de expressão relativa foram obtidos aumentando a eficiência de amplificação de PCR ( $E = 2$ ) para a potência  $\Delta\Delta$ CT (Yuan *et al.* 2006). Todos os resultados são apresentados como médias  $\pm$  erro padrão da média (SEM). As diferenças com  $P \leq 0,05$  foram consideradas significativas e aquelas com  $0,05 < P \leq 0,10$  foram consideradas tendências.

## Resultados

### *Efeito da adiponectina sobre a maturação meiótica de oócitos*

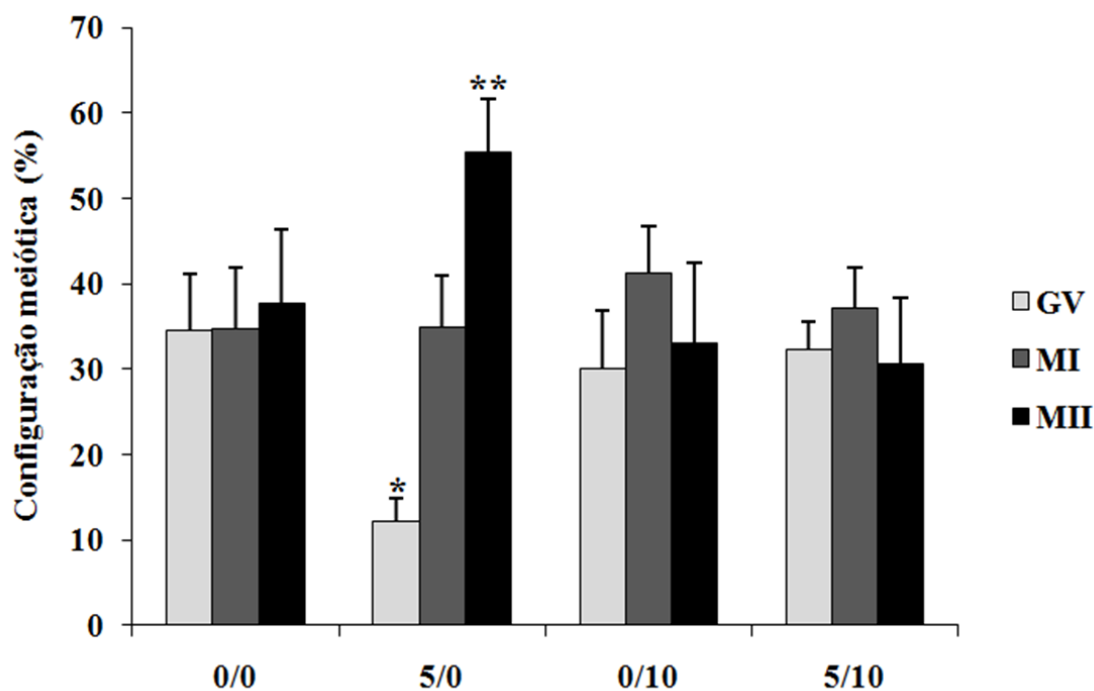
A adição de adiponectina (5  $\mu$ g/mL) durante a maturação de oócitos caprinos afetou a porcentagem de oócitos que completaram a maturação nuclear (taxa de MII) com sucesso ( $P < 0,05$ ; Fig. 1). Além disso, foi demonstrado que 5  $\mu$ g/mL de adiponectina reduziu ( $P < 0,05$ ) a porcentagem de oócitos em estágio de vesícula germinativa, enquanto não teve efeito ( $P > 0,05$ ) sobre a porcentagem de oócitos em metáfase I. Não houve efeito do SFB sobre a proporção de oócitos em metáfase II (Fig. 1).



**Figura 1.** Porcentagens da configuração meiótica observada em oócitos caprinos maturados *in vitro*. A maturação *in vitro* do COCs foi realizada em meio TCM 199/Bicarbonato livre de soro suplementado ou não com adiponectina (0 ou 5 µg/mL) ou 10% de SFB (controle positivo) por 27 h. Os dados representam valores médios  $\pm$  SE de cinco repetições. Diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) comparado ao grupo controle (0 µg/mL adiponectina) são indicadas por um (GV) ou dois (MII) asteriscos. GV: vesícula germinativa; MI: Metáfase I; MII: Metáfase II.

#### ***Efeito da inibição da via MAPK e adiponectina sobre a maturação nuclear de oócitos***

A maturação nuclear de oócitos estimulada pela adiponectina foi significativamente prejudicada quando o inibidor específico de MEK 1/2 (10 µM U0126) foi adicionado ao meio de maturação (Fig. 2). A frequência de oócitos imaturos (GV) foi maior ( $P < 0,01$ ) no grupo 5 µg/mL de adiponectina suplementado com o inibidor de MEK 1/2 em comparação ao grupo suplementado apenas com adiponectina (Fig. 2). Não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) na porcentagem de MI entre os grupos. A porcentagem de MII foi maior ( $P < 0,05$ ) no grupo 5 µg/mL de adiponectina em comparação ao grupo suplementado com o inibidor. A adição do inibidor ao grupo 0 adiponectina não modificou a proporção de GV, MI e MII. Esses resultados sugerem que o efeito da adiponectina na promoção da maturação meiótica dos oócitos caprinos é mediado através da via MAPK MEK 1/2.



**Figura 2.** Porcentagens da configuração meiótica observada em oócitos caprinos maturados *in vitro* em meio TCM199/Bicarbonato livre de soro contendo 0 ou 5 µg/ml de adiponectina na presença ou ausência do inibidor de MEK 1/2 (U0126; 10 µM). Diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) são indicadas por um (GV) ou dois (MII) asteriscos. GV: vesícula germinativa; MI: Metáfase I; MII: Metáfase II.

### *Efeito da adiponectina sobre o nível de transcritos específicos em oócitos e células do cumulus*

A suplementação com adiponectina durante a maturação *in vitro* não aumentou a proporção de células a expressarem os genes *AdipoR1*, *AdipoR2*, *AMPKα1*, *AMPKα2*, *PPARα* e *PPARγ* em nenhum dos dois tipos de células pesquisadas, oócito e células do cumulus (Tabela 2).

Quando foi avaliado o efeito da suplementação com 5 µg/mL na abundância de RNAm nas células que apresentaram expressão dos genes pesquisados, foi observado inibição total na expressão de *AMPKα2* nas células do cumulus. Não foi observado efeito do tratamento na abundância de RNAm dos demais genes pesquisados (Tabela 3). No entanto, independente de tratamento, quando foi avaliado a expressão dos genes de acordo com o tipo de célula, foi observado maior expressão ( $P < 0.01$ ) de *PPARγ* e *AMPKα1* nas células do cumulus do que nos oócitos. Por outro lado, os genes *AdipoR1* e *AdipoR2* apresentaram tendência ( $P = 0.08$  e  $P = 0.06$ , respectivamente) a ser menos expresso nas células do cumulus

do que nos oócitos. As células do cumulus e os oócitos apresentaram a mesma expressão de *PPAR $\alpha$*  (Tabela 3).

## Discussão

Os resultados do presente estudo demonstraram que a adição de adiponectina recombinante (5  $\mu\text{g/mL}$ ) no meio MIV, aumentou a taxa de maturação meiótica de oócitos caprinos. Estes resultados são consistentes com os estudos iniciais que demonstraram aumento na proporção de oócitos caprinos atingindo estágio de MII pelo tratamento com adiponectina (5 e 10  $\mu\text{g/mL}$ ), em meio de maturação livre de soro (Oliveira *et al.* 2017). A concentração de adiponectina utilizada neste estudo representa níveis séricos fisiológicos encontrados em cabras (Wang *et al.* 2016, Guzel *et al.* 2017). Entretanto, resultados controversos têm sido relatado na literatura. Em suínos, a adiponectina demonstrou ter efeito positivo sobre a maturação meiótica e o desenvolvimento embrionário *in vitro* (Chappaz *et al.* 2008). Outros autores relataram que a adiponectina não afetou a competência de desenvolvimento dos oócitos bovinos e o desenvolvimento embrionário inicial (Maillard *et al.* 2010, Divar *et al.* 2016). Esta discrepância pode ser causada por inúmeras diferenças, incluindo as espécies, a concentração de adiponectina testada, e as diferentes composições do meio de cultura utilizado para maturação dos oócitos.

A maturação meiótica de oócitos é um processo complexo que envolve dissolução da vesícula germinativa (GVBD), seguido por condensação e segregação da cromatina e reorganização dos microtúbulos (Li & Albertini 2013). Evidências têm demonstrado que a MAPK desempenha papel fundamental na regulação da progressão do ciclo celular meiótico em oócitos (Liang *et al.* 2007, Pomerantz & Dekel 2013). A adiponectina tem sido previamente apresentada por ativar a via MAPK MEK 1/2 em vários tipos celulares, incluindo células Hek293 (Lee *et al.* 2008), macrófagos e hepatócitos humano (Wanninger *et al.* 2009), linhagem de células de tumor da granulosa humana KGN (Pierre *et al.* 2009) e células da granulosa de bovinos (Maillard *et al.* 2010). Com base neste conhecimento, nós investigamos se o efeito da adiponectina sobre a maturação meiótica de oócitos caprinos é mediado através da via MAPK MEK 1/2. Nossas descobertas indicaram que o efeito da adiponectina sobre a progressão meiótica foi bloqueado em oócitos expostos ao inibidor de MEK 1/2 (U0126). Esses dados fornecem evidências de que a adiponectina pode agir ativando a via MAPK MEK



**Table 2.** Efeito da adiponectina (0 ou 5  $\mu\text{g/mL}$ ) durante a maturação de oócitos na proporção de células que expressam RNAm para *AdipoR1*, *AdipoR2*, *AMPK $\alpha$ 1*, *AMPK $\alpha$ 2*, *PPAR $\alpha$*  e *PPAR $\gamma$*

	Cumulus cells			Oocytes		
	0 $\mu\text{g/mL}$	5 $\mu\text{g/mL}$	<i>P</i> -value	0 $\mu\text{g/mL}$	5 $\mu\text{g/mL}$	<i>P</i> -value
<i>AdipoR1</i>	44.4 % (4/9)	55.6 % (5/9)	1.00	100.0 % (8/8)	100.0 % (8/8)	1.00
<i>AdipoR2</i>	33.3 % (3/9)	22.2 % (2/9)	1.00	100.0 % (8/8)	87.5 % (7/8)	1.00
<i>AMPK<math>\alpha</math>1</i>	33.3 % (3/6)	44.4 % (4/9)	1.00	100.0 % (8/8)	100.0 % (8/8)	1.00
<i>AMPK<math>\alpha</math>2*</i>	33.3 % (3/9)	0.0 % (0/9)	0.21	100.0 % (8/8)	100.0 % (8/8)	1.00
<i>PPAR<math>\gamma</math></i>	88.9 % (8/9)	88.9 % (8/9)	1.00	100.0 % (8/8)	100.0 % (8/8)	1.00
<i>PPAR<math>\alpha</math></i>	50.0 % (3/6)	33.3 % (3/9)	0.62	100.0 % (8/8)	100.0 % (8/8)	1.00

\* A análise estatística foi realizada considerando apenas três tratamentos independentes (Células do cumulus 0  $\mu\text{g/mL}$ , Oócitos 0  $\mu\text{g/mL}$  e 5  $\mu\text{g/mL}$ ).

**Table 3.** Efeito da adiponectina (0 ou 5 µg/mL) durante a maturação de oócitos sobre a expressão de RNAm de *AdipoR1*, *AdipoR2*, *AMPKα1*, *AMPKα2*, *PPARα* e *PPARγ* em oócitos e células do cumulus

	Cumulus cells		Oocytes		P-value		
	0 µg/mL (n = 9)	5 µg/mL (n = 9)	0 µg/mL (n = 8)	5 µg/mL (n = 8)	TRT	Cells	TRT x Cells
<i>AdipoR1</i>	1.00	2.02 (0.57-7.15)	2.44 (0.67-8.95)	4.07 (1.11-14.91)	0.18	0.08	0.83
<i>AdipoR2</i>	1.00	1.81 (0.56-5.78)	3.67 (1.11-12.15)	2.43 (0.73-8.03)	0.83	0.06	0.23
<i>AMPKα1</i>	1.00	1.86 (0.17-19.91)	0.03 (0.00-0.25)	0.02 (0.00-0.14)	0.98	< 0.01	0.39
<i>AMPKα2</i> *	1.00 <sup>a</sup>	NE	0.01 (0.00-0.18) <sup>b</sup>	0.03 (0.00-0.66) <sup>b</sup>	0.02	-	-
<i>PPARγ</i>	1.00	1.03 (0.27-3.89)	0.21 (0.06-0.79)	0.18 (0.05-0.66)	0.88	< 0.01	0.82
<i>PPARα</i>	1.00	7.57 (0.35-164.97)	0.89 (0.07-11.50)	0.96 (0.07-12.42)	0.24	0.22	0.27

NE – Não apresentou expressão.

\* A análise estatística foi realizada considerando apenas três tratamentos independentes (Células do cumulus 0 µg/mL, Oócitos 0 µg/mL e 5 µg/mL).

1/2 ou afetando proteínas a jusante cuja presença ou ativação dependem da ativação da MAPK MEK 1/2.

Em suínos, entretanto, foi demonstrado que o efeito da adiponectina sobre a maturação meiótica é mediada pela ativação da p38MAPK, outro membro da família MAPK ativado durante a maturação de oócitos suínos (Chappaz *et al.* 2008). Isto sugere que as ações da adiponectina sobre a maturação meiótica são mediadas através de múltiplos caminhos intracelulares. Além disso, a ligação da adiponectina aos seus receptores (AdipoR1 e AdipoR2), também ativa alvos a jusante, os quais podem diferir significativamente na cabra em comparação com suínos e outras espécies. Outra possível explicação pode ser os diferentes tipos de adiponectina utilizadas nos experimentos. Nós usamos adiponectina recombinante humana, enquanto Chappaz *et al.* (2008) utilizaram adiponectina recombinante suína. Novamente, deve-se ter cuidado ao comparar diferentes estudos devido à condições de cultura extensivamente diferentes dependendo das espécies examinadas.

A adiponectina demonstrou regular diferencialmente a expressão de genes envolvidos no metabolismo, esteroidogênese, ovulação e apoptose em células ovarianas de várias espécies (Ledoux *et al.* 2006, Richards *et al.* 2012). Embora, os RNAm para *AdipoR1* e *AdipoR2* tenham sido expressos em ambos oócitos e células do cumulus, a maturação de COCs caprinos na presença de adiponectina, não modificou a abundância dos transcritos *AdipoR1* e *AdipoR2*. Esses resultados diferem daqueles obtidos em camundongos, nos quais o tratamento com adiponectina aumentou a expressão de *AdipoR1* e *AdipoR2* em COCs (Richards *et al.* 2012). Estes resultados, sugerem que a adiponectina pode influenciar a expressão dos seus receptores de forma diferente de acordo com a espécie e os diferentes tipos de células ovariana.

No presente estudo, identificamos os RNAm das subunidades AMPK  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  em células do cumulus e oócitos caprinos. Além disso, foi observado maior expressão de *AMPK $\alpha 1$*  nas células do cumulus do que nos oócitos. Estes resultados estão em concordância com dados demonstrando que as diferentes subunidades da AMPK são expressas no ovário caprino (Coyral-Castel *et al.* 2010). De acordo com nossos dados, o tratamento com adiponectina não teve efeito sobre a expressão de *AMPK $\alpha 1$*  nos COCs. Entretanto, o tratamento com adiponectina inibiu a expressão de *AMPK $\alpha 2$*  nas células do cumulus, mas não em oócitos.

É bem conhecido que a comunicação entre células do cumulus e oócitos é crucial para a maturação meiótica dos oócitos e para adquirir total competência de desenvolvimento (Gilchrist 2011, Li & Albertini 2013). Assim, podemos formular a hipótese de que o efeito

positivo da adiponectina sobre a maturação meiótica de oócitos caprinos, também seja provavelmente mediada pela inibição da expressão da *AMPK $\alpha$ 2* nas células do cumulus. Isto é suportado por descobertas que indicam que a maturação nuclear de oócitos bovinos e suínos é inibida pela ativação farmacológica da AMPK e que as células do cumulus são essenciais para os efeitos dos ativadores sobre a maturação de oócitos nestas espécies (Tosca *et al.* 2007, Santiquet *et al.* 2014). Embora, a função da AMPK na maturação de oócitos caprinos, ainda permaneça para ser determinada, estes dados sugerem que a via de sinalização AMPK em células do cumulus, possivelmente através da isoforma *AMPK $\alpha$ 2*, é regulada pela adiponectina.

Transcritos dos genes *PPAR $\alpha$*  e *PPAR $\gamma$*  foram detectados nas células do cumulus e oócitos caprinos no presente estudo, mas seus níveis de expressão não foram influenciados pelo tratamento com adiponectina. No entanto, independente de tratamento, foi observado maior expressão de *PPAR $\gamma$*  nas células do cumulus do que nos oócitos. Até onde sabemos, não há relatos na literatura sobre a expressão destes transcritos em complexos cumulus-oócitos caprinos. Os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) são sensores metabólicos que estão amplamente envolvidos na reprodução feminina (Vitti *et al.* 2016). *PPAR $\gamma$* , o qual tem sido o isotipo mais extensivamente estudado, foi detectado em ovários de camundongo, rato, suínos, ovinos, bovinos e humano (Komar *et al.* 2005, Froment *et al.* 2006). O *PPAR $\gamma$*  também está envolvido em processos que são críticos para a função normal do ovário, como angiogênese, inflamação e controle do ciclo celular, indicando que o *PPAR $\gamma$*  pode ser um fator importante que regula a expressão gênica ovariana (Dupont *et al.* 2012).

Como os *AMPK $\alpha$ 1* e *PPAR $\gamma$*  foram principalmente expresso em células do cumulus, estes podem influenciar o desenvolvimento dessas células e sua capacidade de suportar a maturação normal dos oócitos caprinos. Entretanto, outras investigações são necessárias para avaliar a importância exata e os mecanismos de ação dessas moléculas em algumas funções ovarianas, incluindo, por exemplo, a maturação de oócitos.

Em conclusão, o presente estudo fornece evidências que a adiponectina melhora a maturação meiótica de oócitos caprinos através da via MAPK MEK 1/2. Além disso, efeitos sobre os níveis do transcrito *AMPK $\alpha$ 2* foram detectados nas células do cumulus mas não nos oócitos. Estas são descobertas importantes à medida que expandem nosso conhecimento sobre a função da adiponectina na maturação de oócitos caprinos.

### **Declaração de interesse**

Os autores declaram que não há conflitos de interesse que possam ser percebidos como prejudicando a imparcialidade da pesquisa relatada.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo financiamento da pesquisa (APQ-1115-5.05/14).

### **Referências**

**Campos DB, Palin MF, Bordignon V & Murphy BD** 2008 The “beneficial” adipokines in reproduction and fertility. *International Journal of Obesity* **32** 223-231.

**Chabrolle C, Tosca L & Dupont J** 2007a Regulation of adiponectin and its receptors in rat ovary by human chorionic gonadotrophin treatment and potential involvement of adiponectin in granulosa cell steroidogenesis. *Reproduction* **133** 719-731.

**Chabrolle C, Tosca L, Crochet S, Tesseraud S & Dupont J** 2007b Expression of adiponectin and its receptors (AdipoR1 and AdipoR2) in chicken ovary: Potential role in ovarian steroidogenesis. *Domestic Animal Endocrinology* **33** 480-487.

**Chabrolle C, Tosca L, Rame C, Lecomte P, Royere D & Dupont J** 2009 Adiponectin increases insulin-like growth factor I-induced progesterone and estradiol secretion in human granulosa cells. *Fertility and Sterility* **92** 1988-1996.

**Chappaz E, Abornoz MS, Campo D, Che L, Palin MF, Murphy BD & Bordignon V** 2008 Adiponectin enhances in vitro development of swine embryos. *Domestic Animal Endocrinology* **35** 198-207.

**Coyral-Castel S, Ramé C, Fatet A & Dupont J** 2010 Effects of unsaturated fatty acids on progesterone secretion and selected protein kinases in granulosa cells. *Domestic Animal Endocrinology* **38** 272-283.

**De Koster J, Urh C, Hostens M, Van den Broeck W, Sauerwein H & Opsomer G** 2016 Relationship between serum adiponectin concentration, body condition score, and peripheral tissue insulin response of dairy cows during the dry period. *Domestic Animal Endocrinology* **59** 100–104.

**Divar MR, Kafi M, Mohammadi A & Azari M** 2016 The In Vitro Effect of Adiponectin on Early Bovine Embryonic Development and Transcriptomic Markers of Oocyte Competence. *JFIV Reproductive Medicine and Genetics* **4** 172.

**Dupont J, Reverchon M, Cloix L, Froment P & Ramé C** 2012 Involvement of adipokines,

AMPK, PI3K and the PPAR signaling pathways in ovarian follicle development and cancer. *International Journal of Developmental Biology* **56** 959-967.

**Froment P, Gizard F, Defever D, Staels B, Dupont J & Monget P** 2006 Peroxisome proliferator-activated receptors in reproductive tissues: from gametogenesis to parturition. *Journal of Endocrinology* **189** 199–209.

**Frota IM, Leitão CC, Costa JJ, Brito IR, van den Hurk R & Silva JR** 2010 Stability of housekeeping genes and expression of locally produced growth factors and hormone receptors in goat preantral follicles. *Zygote* **19** 71-83.

**Gilchrist RB** 2011 Recent insights into oocyte-follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to in vitro maturation. *Reproduction Fertility and Development* **23** 23–31.

**Guzel S, Yibar A, Belenli D, Cetin I & Tanriverdi M** 2017 The concentrations of adipokines in goat milk: relation to plasma levels, inflammatory status, milk quality and composition. *Journal of Veterinary Medical Science* **79** 602-607.

**Komar CM** 2005 Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and ovarian function-implications for regulating steroidogenesis, differentiation, and tissue remodeling. *Reproduction Biology and Endocrinology* **3** 41.

**Ledoux S, Campos DB, Lopes FL, Dobias-Goff M, Palin MF & Murphy BD** 2006 Adiponectin induces periovulatory changes in ovarian follicular cells. *Endocrinology* **147** 5178–5186.

**Lee MH, Klein RL, El-Shewy HM, Luttrell DK & Luttrell LM** 2008 The adiponectin receptors AdipoR1 and AdipoR2 activate ERK1/2 through a Src/Ras-dependent pathway and stimulate cell growth. *Biochemistry* **47** 11682-11692.

**Li R & Albertini DF** 2013 The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **14**, 141–152.

**Liang CG, Su YQ, Fan HY, Schatten H & Sun QY** 2007 Mechanisms regulation oocyte meiotic resumption: roles of mitogen-activated protein kinase. *Molecular Endocrinology* **21** 2037-2055.

**Livak KJ & Schmittgen TD** 2001 Analysis of gene expression data using real-time quantitative PCR. *Methods*, **25** 402-408.

**Lord E, Ledoux S, Murphy BD, Beaudry D & Palin MF** 2005 Expression of adiponectin and its receptors in swine. *Journal of Animal Science* **83** 565-578.

**Maillard V, Uzbekova S, Guignot F, Perreau C, Ramé C, Coyral-Castel S, Dupont J** 2010 Effect of adiponectin on bovine granulosa cell steroidogenesis, oocyte maturation and

embryo development. *Reproductive Biology and Endocrinology* **8** 1-23.

**Pomerantz Y & Dekel N** 2013 Molecular participants in regulation of the meiotic cell cycle in mammalian oocyte. *Reproduction Fertility and Development* **25** 484-494.

**Oliveira BSP, Costa JAS, Gomes ET, Silva DMF, Torres SM, Monteiro Jr PLJ, Santos Filho AS, Guerra MMP, Carneiro GF, Wischral A & Batista AM** 2017 Expression of adiponectin and its receptors (AdipoR1 and AdipoR2) in goat ovary and its effect on oocyte nuclear maturation *in vitro*. *Theriogenology* **104** 127-133.

**Palin MF, Bordignon VV & Murphy BD** 2012 Adiponectin and the control of female reproductive functions. *Vitamins and Hormones* **90** 239-287.

**Pierre P, Froment P, Negre D, Rame C, Barateau V, Chabrolle C, Lecomte P & Dupont J** 2009 Role of adiponectin receptors, AdipoR1 and AdipoR2, in the steroidogenesis of the human granulosa tumor cell line, KGN. *Human Reproduction* **24** 2890–2901.

**Rak A, Mellouk N, Froment P & Dupont J** 2017 Adiponectin and resistin: potential metabolic signals affecting hypothalamo-pituitary gonadal axis in females and males of different species. *Reproduction* **153** R215-R226.

**Richard JS, Liu Z, Kawai T, Tabata K, Watanabe H, Suresh D, Kuo FT, Pisarska MD & Shimada M** 2012 Adiponectin and its receptors modulate granulosa cell and cumulus cell functions, fertility and early embryo development in the mouse and human. *Fertility and Sterility* **98** 471-479.

**Santiquet N, Sasseville M, Laforest M, Guillemette C, Gilchrist RB & Richard FJ** 2014 Activation of 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase blocks cumulus cell expansion through inhibition of protein synthesis during *in vitro* maturation in swine. *Biology of Reproduction* **91** 1–12.

**Tabandeh MR, Hosseini A, Saeb M, Kafi M & Saeb S** 2010 Changes in the gene expression of adiponectin and adiponectin receptors (AdipoR1 and AdipoR2) in ovarian follicular cells of dairy cow at different stages of development. *Theriogenology* **73** 659-669.

**Tosca L, Chabrolle C, Uzbekova S & Dupont J** 2007 Effect of metformin on bovine granulosa cell steroidogenesis: possible involvement of adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase (AMPK). *Biology of Reproduction* **76** 368–378.

**Wang Z, Meng C, Ding X, Zhang G & Wang F** 2016 Effect of body condition on follicle transcriptome in estrous. *Peerj Preprints* **4** 1-34.

**Wanninger J, Neumeier M, J. Weigert J, Bauer S, Weiss TS, Schaffler A, Krepl C, Bleyl C, Aslanidis C, Scholmerich J & Buechler C** 2009 Adiponectin-stimulated CXCL8 release in primary human hepatocytes is regulated by ERK1/ERK2, p38 MAPK, NF-

kappaB, and STAT3 signaling pathways. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* **297** 611-618.

**Wu YG, Zhou P, Lan GC, Gao D, Li Q, Wei DL, Wang HL & Tan JH** 2010 MPF Governs the Assembly and Contraction of Actomyosin Rings by Activating RhoA and MAPK during Chemical-Induced Cytokinesis of Goat Oocytes. *PLoS ONE* **5** 12706.

**Vitti M, Di Emidio G, Di Carlo M, Carta G, Antonosante A, Artini PG, Cimini A, Tatone C & Benedetti E** 2016 Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Female Reproduction and Fertility. *PPAR Research* **46** 12306.

**Yamauchi T, Iwabu M, Okada-Iwabu M & Kadowaki T** 2014 Adiponectin receptors: a review of their structure, function and how they work. *Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism* **28** 15–23.

**Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P & Kadowaki T** 2001 The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nature Medicine* **7** 941–946.

**Yuan JS, Reed A, Chen F & Stewart Jr CN** 2006 Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* **7** 85.