UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

LETÍCIA SCHEFER

Influência do segundo mensageiro GMPc e suas vias de sinalização no conteúdo lipídico de complexos cumulus-oócitos bovinos maturados *in vitro*.

Pirassununga

2020

LETÍCIA SCHEFER

Influência do segundo mensageiro GMPc e suas vias de sinalização no conteúdo lipídico de complexos cumulus-oócitos bovinos maturados *in vitro*.

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências do programa de pós graduação em Biociência Animal.

Área de Concentração: Biociência Animal

Orientador: Professora Dra. Cláudia Lima Verde Leal.

Pirassununga

2020

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S316i Schefer, Leticia
 Influência do segundo mensageiro GMPc e suas
vias de sinalização no conteúdo lipídico de complexos
cumulus-oócitos bovinos maturados in vitro. /
Leticia Schefer ; orientadora Cláudia Lima Verde
Leal. -- Pirassununga, 2020.
66 f.

 Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
em Biociência Animal) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

 1. Reprodução Animal. 2. Produção in vitro de
embriões. 3. oócitos. 4. lipólise. I. Lima Verde
Leal, Cláudia, orient. II. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Influência do segundo mensageiro GMPc e suas vias de sinalização no conteúdo lipídico de complexos cumulus-oócitos bovinos maturados in vitro.", protocolada sob o CEUA nº 3171160518 (ID 001001), sob a responsabilidade de **Cláudia Lima Verde Leal e equipe; Letícia Schefer** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo - FZEA/USP (CEUA/FZEA) na reunião de 22/08/2018.

We certify that the proposal "Influence the cGMP Second Messenger and its signaling pathways on the lipid content of in vitro matured bovine cumulus-oocyte complexes.", utilizing 150 Bovines (150 females), protocol number CEUA 3171160518 (ID 001001), under the responsibility of **Cláudia Lima Verde Leal and team; Letícia Schefer** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Animal Science and Food Engineering - (São Paulo University) (CEUA/FZEA) in the meeting of 08/22/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **06/2018** a **12/2019** Área: **Biociência Animal**

Origem: **Animais provenientes de doação espontânea**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **1 a 10 anos**

N: **150**

Linhagem: **Mestiça**

Peso: **480 a 600 kg**

Local do experimento: Todos os experimentos serão realizados no Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento, Departamento de Medicina Veterinária, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo.

Pirassununga, 16 de junho de 2020

Profa. Dra. Cristiane Gonçalves Titto
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

Profa. Dra. Daniele dos Santos Martins
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: SCHEFER, Letícia

Título: Influência do segundo mensageiro GMPc e suas vias de sinalização no conteúdo lipídico de complexos cumulus-oócitos bovinos maturados *in vitro*.

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de **Mestre em Ciências** do programa de pós graduação em Biociência Animal.

Área de Concentração: Biociência Animal

Data da Aprovação: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a memória do **meu avô Arnaldo Scheffer**, que me dedicou tanto amor e carinho durante os anos que vivemos juntos. Ele que comemorou junto a mim a conquista da aprovação no Mestrado e tinha o sonho de me ver concluir esta etapa. Hoje, ele é meu anjo da guarda, e sei que onde está, está muito orgulhoso. Não há saudade nem distância que apaguem a admiração e ensinamentos teus estes quais carregarei para sempre. Obrigada por sempre acreditar em mim vovô.*

Letícia Schefer

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, pela minha vida e pelas oportunidades que colocou em meu caminho.

A minha orientadora, **Profa. Dr. Cláudia Lima Verde Leal**, pela confiança depositada em mim. Por ser um exemplo de profissionalismo e dedicação e por compartilhar seu conhecimento, contribuindo para meu crescimento científico.

Aos meus pais, **Arnaldo Cesar e Leandra**, por todo amor e carinho, incentivo, sempre acreditando na minha capacidade e na minha dedicação, idealizando junto comigo mais essa conquista. Por serem meu maior exemplo de valores, honestidade e perseverança.

A meu namorado, **José Marcos**, por também me incentivar, me dar forças e estar ao meu lado me apoiando em todos os momentos, me ajudando a superar as dificuldades durante esses anos. Por todo amor, carinho e dedicação. Também a sua família, pelo apoio e carinho.

A toda a **minha família, Schefer e Murarolli**, avô, avós, tios, tias, primos, primas, agregados, por todo carinho, por sempre estarem presentes em diversos momentos durante esses anos e me apoiando muito para a conclusão do meu mestrado.

A todos os colegas do **LMMD**, em especial, **Daniela Paschoal, Fernanda Cavallari, Hugo Fernandes, Sophia Carrijo, Alessandra Bridi, Ramon Botigelli, Rosane Mazzarella, Juliano Sangalli, Gabriela Mamede, Ana Clara Ávila e Cibeles Prado**, pela amizade, apoio, colaborações e pelos agradáveis momentos compartilhados.

Aos professores que compõem o laboratório, **Prof. Dr. Flávio Meirelles, Prof. Dr. Juliano da Silveira, Prof. Dr. Felipe Perecin e Profa. Dra. Fabiana Bressan** pelas colaborações e disponibilidade de estrutura e equipamentos para o desenvolvimento da pesquisa.

A **Daniela Maggio** pelas incríveis aulas de inglês, por todo apoio no meu preparo para o estágio internacional e pela amizade.

Ao **Prof. Matthew B. Wheeler** da University of Illinois at Urbana-Champaign (EUA), por me receber para a realização do estágio de pesquisa e ajudar no financiamento da pesquisa no exterior. Além disso por todo carinho e conhecimento compartilhado.

As pessoas que se tornaram minha segunda família durante o período em que morei nos Estados Unidos, **Luciana Naves, Paula Marchioreto, Lúdia Arend, Raquel Arcanjo** e minha “roommate” **Laura Valderrama** pela amizade e carinho em todos os momentos.

Aos colegas de trabalho no Laboratory of Reproductive Biology & Tissue Engineering (UIUC) e na fazenda “Chessie Creek”, **Luciana Naves, Paula Marchioreto, Eduardo Pradebon, Eduardo Júnior, Bruno Pasqual e Dr. Marcello Rubessa** pelas colaborações e conhecimentos compartilhados.

A **Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - USP** pela oportunidade no programa de pós graduação e pela estrutura oferecida para a minha formação.

Ao **Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica** da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pela estrutura e equipamentos e a querida técnica, **Elisabete Rosa (Bete)** pela amizade, paciência e ensinamentos durante as análises de microscopia confocal.

Ao Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva, comandado pela **Profa. Helena Lage Ferreira** e a técnica **Julia Cristina Benassi**, pela disponibilização do microscópio de fluorescência para as análises.

Aos frigoríficos “**Mirella**” (Santa Gertrudes, SP), “**Olhos D’agua**” (Ipuã, SP) e “**Vale do Prata**” (São João da Boa Vista, SP) por possibilitar a coleta de ovários bovinos necessários para essa pesquisa e ao **Leonardo Amaral**, responsável por essas coletas e transporte dos materiais até o laboratório.

A **Capes** e a **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo apoio financeiro no país e no exterior (Processos: 2017/05483-0, 2018/20527-7, 2015/20379-0 e 2019/18019-6).

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

Isaac Newton

RESUMO

SCHEFER, L. **Influência do segundo mensageiro GMPc e suas vias de sinalização no conteúdo lipídico de complexos cumulus-oócitos bovinos maturados *in vitro***. 2020. 81f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga - SP, 2020.

A produção *in vitro* de embriões (PIV) é uma biotecnologia amplamente utilizada no Brasil e no mundo. No entanto, ainda existem limitações quanto à sua eficiência em comparação com embriões produzidos *in vivo*. Em bovinos, uma das dificuldades encontradas é o acúmulo lipídico em blastocistos de PIV que diminui a qualidade embrionária e sua resistência à criopreservação. Buscando alternativas para resolver este problema, é necessário compreender do metabolismo lipídico de complexos cumulus-oócitos bovinos (CCOs). A via AMPc/PKA é a via clássica da lipólise celular, porém, foi demonstrada também a atuação da via do GMPc/PKG no metabolismo lipídico. Assim, como CCOs bovinos expressam componentes dessa via, o objetivo do presente estudo foi investigar o envolvimento do GMPc no metabolismo lipídico de CCOs bovinos através da manipulação farmacológica da mesma. No primeiro estudo, dividido em três experimentos, foi avaliado o conteúdo lipídico de oócitos e células do cumulus (CC) sob influência de estimuladores de síntese do GMPc (NPPB e Protoporfirina IX) e sob a influência da inibição da PKG (KT5823). Observamos que apenas o NPPB foi capaz de reduzir o conteúdo lipídico dos oócitos e nas células do cumulus. Além disso, avaliamos a expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico (*PLIN2*), dos receptores de peptídeos natriuréticos (NPRs) e foi realizada a quantificação dos níveis intracelulares de GMPc nos mesmos tratamentos anteriormente utilizados, porém não houve diferença significativa em nenhum dos parâmetros avaliados. Durante todos os experimentos realizados, foram avaliadas as taxas de maturação nuclear dos oócitos e nenhum dos tratamentos utilizados afetou a maturação oocitária. No segundo estudo, dividido em dois experimentos, foram utilizados os mesmos estimuladores de síntese de GMPc (NPPB e Protoporfirina IX) na MIV, sendo avaliados os perfis lipídicos de oócitos e embriões produzidos *in vitro*. Os perfis de oócitos e embriões bovinos não foram

alterados pela manipulação da via GMPc. As taxas de clivagem e blastocisto com NPPB não foram afetadas, porém, no grupo tratado com Protoporfirina IX, as taxas foram zeradas. Em conclusão, sugerimos o envolvimento da via GMPc no metabolismo lipídico de CCOs bovinos e que a manipulação dessa via pode reduzir o conteúdo lipídico dos oócitos sem afetar o perfil lipídico dos oócitos e embriões resultantes.

Palavras-chave: Peptídeos Natriuréticos, Protoporfirina IX, *PLIN2*, lipídios, lipólise, criopreservação.

ABSTRACT

SCHEFER, L. **Influence of the second messenger cGMP and its signaling pathways on the lipid content of *in vitro* matured bovine cumulus-oocyte complexes.** 2020. 81f. M.Sc. Dissertation - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga - SP, 2020.

In vitro embryo production (IVP) is a biotechnology widely used in Brazil and worldwide. However, there are still limitations regarding its efficiency compared to embryos produced *in vivo*. In cattle, one of the difficulties encountered is the accumulation of lipids in IVP blastocysts, which reduces embryonic quality and its resistance to cryopreservation. Looking for alternatives to solve this problem, it is necessary to understand the lipid metabolism of bovine cumulus-oocyte complexes (COCs). The cAMP/PKA pathway is the classic cell lipolysis pathway, but the role of the cGMP/PKG pathway in lipid metabolism has also been demonstrated. Thus, as bovine COCs express components of this pathway, the objective of the present study was to investigate the involvement of cGMP in the lipid metabolism of bovine COCs through its pharmacological manipulation. In the first study, divided into three experiments, the lipid content of oocytes and cumulus cells (CC) was evaluated under the influence of cGMP synthesis stimulators (NPPB and Protoporphyrin IX) and under the influence of PKG inhibition (KT5823). We observed that only NPPB was able to reduce the lipid content of oocytes and cumulus cells. In addition, we evaluated the expression of genes related to lipid metabolism (*PLIN2*), natriuretic peptide receptors (NPRs) and the quantification of intracellular cGMP levels was performed in the same treatments, however, there were no significant differences in any of the parameters evaluated. During all the experiments carried out, nuclear oocyte maturation rates were evaluated and none of the treatments used affected oocyte maturation. In the second study, divided into two experiments, the same cGMP synthesis stimulators (NPPB and Protoporphyrin IX) were used during IVM, and the lipid profiles of oocytes and embryos produced *in vitro* were evaluated. The lipid profiles of bovine oocytes and embryos were not altered by manipulation of the cGMP pathway. Cleavage and blastocyst rates were not affected by NPPB, but in the group treated with

Protoporphyrin IX, no development was observed. In conclusion, we suggest the involvement of the cGMP pathway in the lipid metabolism of bovine CCOs and that manipulation of this pathway can reduce the lipid content in oocytes without affecting the lipid profile of these of oocytes and resulting embryos.

Keywords: Natriuretic Peptides, Protoporphyrin IX, *PLIN2*, lipids, lipolysis, cryopreservation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Esquema hipotético de funcionamento da via GMPc nas células.....	08
Figura 2: Estimativa do conteúdo lipídico de oócitos bovinos oriundos de CCOs maturados <i>in vitro</i> por 24h na presença de diferentes concentrações de NPPB e corados por NR. Controle maturado sem a presença da droga. A - Resultados referentes a 4 repetições. B – Imagem obtida através de microscopia de epifluorescência após marcação lipídica por NR.....	27
Figura 3: Abundância relativa de transcritos para os dos receptores de peptídeo natriurético (<i>NPR1</i> - A e <i>NPR3</i> - B) e para <i>PDE3B</i> (C) em células do cumulus oriundas de CCOs maturados <i>in vitro</i> por 24h na presença de diferentes concentrações de NPPB. Resultados referentes a 5 repetições.....	28
Figura 4: Comparação da estimativa do conteúdo lipídico de oócitos oriundos de CCOs bovinos maturados <i>in vitro</i> por 9h e 24h na presença de diferentes estimuladores de síntese de GMPc. Controle maturado sem a presença da droga.....	31
Figura 5: Níveis intracelulares de GMPc em oócitos e células do cumulus maturados <i>in vitro</i> por 9h na presença ou não (controle) dos estimuladores de síntese do nucleotídeo, NPPB e Protoporfirina IX.....	32
Figura 6: Abundância relativa de transcritos da <i>PLIN 2</i> (A e B) e da <i>PDE3B</i> (C e D) em células do cumulus de CCOs bovinos maturados <i>in vitro</i> por 9h e 24h na presença dos estimuladores de síntese de GMPc.....	34
Figura 7: Abundância relativa de transcritos da <i>PLIN 2</i> em células do cumulus de CCOs bovinos maturados <i>in vitro</i> por 24h na presença do NPPB associado ou não ao inibidor da PKG, KT5823.....	37
Figura 8: Lipídios identificados na análise por espectrometria de massa e selecionados por gráfico ANOVA com valor de p limiar 0,05. Foram utilizados dois métodos expostos, respectivamente, nos gráficos 1 e 2 desta figura.....	53
Figura 9: Gráficos de pontuação em pares entre os PCs selecionados para oócitos (Controle, Protoporfirina IX e NPPB). A variação explicada de cada PC é mostrada na célula diagonal correspondente. Foram utilizados dois métodos expostos, respectivamente, nos gráficos 1 e 2 desta figura.....	54
Figura 10: Gráfico de escores entre os PCs selecionados para oócitos (Controle, Protoporfirina IX e NPPB). As variações explicadas são mostradas entre colchetes. Foram utilizados dois métodos expostos, respectivamente, nos gráficos 1 e 2 desta figura.....	54

Figura 11: Gráficos de pontuação em pares entre os PCs selecionados para oócitos (Controle e NPPB). A variação explicada de cada PC é mostrada na célula diagonal correspondente. Foram utilizados dois métodos expostos respectivamente nos gráficos 1 e 2 desta figura.....56

Figura 12: Gráfico de escores entre os PCs selecionados para oócitos (Controle e NPPB). As variações explicadas são mostradas entre colchetes. Foram utilizados dois métodos expostos respectivamente nos gráficos 1 e 2 desta figura.....57

Figura 13: Gráficos comparativos dos valores de intensidade absoluta entre os grupos estudados para as classes lipídicas SM, PC e TAG.....57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados para quantificação relativa dos genes selecionados.....	25
Tabela 2: Taxa de maturação nuclear* de oócitos submetidos à maturação <i>in vitro</i> por 24 horas na presença de diferentes concentrações de NPPB (estimulador de síntese de GMPc).....	27
Tabela 3: Conteúdo lipídico (intensidade de fluorescência) de oócitos bovinos oriundos de CCOs maturados <i>in vitro</i> por 9h na presença de diferentes estimuladores de GMPc e corados por NR.....	29
Tabela 4: Conteúdo lipídico de células do cumulus oriundas de CCOs bovinos maturados <i>in vitro</i> por 9h na presença de diferentes estimuladores de GMPc e corados por BP.....	30
Tabela 5: Conteúdo lipídico (intensidade de fluorescência) de oócitos bovinos oriundos de CCOs maturados <i>in vitro</i> por 24h na presença de diferentes estimuladores de GMPc e corados por NR.....	30
Tabela 6: Conteúdo lipídico de células do cumulus oriundas de CCOs bovinos maturados <i>in vitro</i> por 24h na presença de diferentes estimuladores de GMPc e corados por BP.....	31
Tabela 7: Taxa de maturação nuclear de oócitos submetidos à maturação <i>in vitro</i> por 24 horas na presença de diferentes estimuladores de síntese de GMPc.....	33
Tabela 8: Conteúdo lipídico (intensidade de fluorescência) de oócitos bovinos oriundos de CCOs maturados <i>in vitro</i> por 24h na presença do estimulador de síntese de GMPc, o NPPB associado ou não ao inibidor da PKG, KT5823, corados por NR.....	35
Tabela 9: Conteúdo lipídico de células do cumulus oriundas de CCOs bovinos maturados <i>in vitro</i> por 24h na presença de NPPB associado ou não ao KT5823 e corados por BP.....	35
Tabela 10: Taxa de maturação nuclear de oócitos submetidos à maturação <i>in vitro</i> por 24 horas na presença de diferentes estimuladores de síntese de GMPc.....	36
Tabela 11: Valores de intensidade absoluta de lipídios identificados pelos métodos de MRM – MS.....	55
Tabela 12: Taxas de clivagem e blastocisto da produção de embriões <i>in vitro</i> . As taxas de clivagem e blastocisto foram calculadas a partir no número de CCOs sujeitos à maturação <i>in vitro</i>	56

SUMÁRIO

1. Introdução e Fundamentação Teórica	02
1.1 SISTEMAS DE PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i>	03
1.2 OVÁRIO E AMBIENTE FOLICULAR.....	04
1.3 MATURAÇÃO E COMPETÊNCIA OOCITÁRIA.....	05
1.4 METABOLISMO LIPÍDICO CELULAR E OOCITÁRIO.....	06
1.5 REFERÊNCIAS	10
2. Artigo 1 – Efeitos da manipulação farmacológica de enzimas de síntese de GMPc no conteúdo lipídico de complexos cumulus-oócitos bovinos maturados <i>in vitro</i>.....	16
2.1 INTRODUÇÃO.....	17
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	20
2.2.1 Delineamento Experimental.....	20
2.2.2 Coleta de Ovários.....	21
2.2.3 Aspiração Folicular e Seleção de CCOs.....	21
2.2.4 Maturação <i>In vitro</i>	21
2.2.5 Determinação do teor de lipídios e da taxa de maturação nuclear em oócitos...	22
2.2.6 Determinação do conteúdo lipídico em células do cumulus por Bodipy.....	22
2.2.7 Determinação da abundância relativa de transcritos por PCR em tempo real....	23
2.2.8 Mensuração dos níveis intracelulares de GMPc.....	25
2.2.9 Análise Estatística.....	26
2.3 RESULTADOS.....	26
2.3.1 Efeito de diferentes concentrações de NPPB sobre a taxa de maturação, o teor de lipídios e expressão de <i>NPR1</i> , <i>NPR3</i> e da <i>PDE3B</i> em CCOs bovinos MIV.....	26
2.3.1.1 Conteúdo lipídico dos oócitos.....	26
2.3.1.2 Maturação nuclear.....	27
2.3.1.3 Expressão gênica nas células do cumulus.....	28
2.3.2 Efeito de diferentes estimuladores de síntese de GMPc sobre o teor de lipídios de oócitos e células do cumulus maturados <i>in vitro</i>	29
2.3.2.1 Conteúdo lipídico de oócitos e células do cumulus em MIV por 9h e 24h.....	29
2.3.2.2 Níveis intracelulares de GMPc nos oócitos e células do cumulus MIV por 9h.....	32

2.3.2.4	Maturação nuclear.....	32
2.3.2.5	Expressão gênica nas células do cumulus.....	33
2.3.3	Ação do GMPc pela via PKG em CCOs maturados durante 24h na presença de estimulador de síntese de GMPc (NPPB) associado ou não a inibidor da PKG.....	34
2.3.3.1	Conteúdo lipídico de oócitos e células do cumulus em MIV por 24h.....	34
2.3.3.2	Maturação nuclear.....	36
2.3.3.3	Expressão gênica nas células do cumulus.....	36
2.4.	DISCUSSÃO.....	37
2.5.	CONCLUSÃO.....	41
2.6	REFERÊNCIAS.....	41
3.	Artigo 2 - Perfil lipídico de oócitos e embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> sob influência da manipulação farmacológica da síntese de GMPc através de espectrometria de massa MRM.....	46
3.1	INTRODUÇÃO.....	47
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	49
3.2.1	Delineamento Experimental.....	49
3.2.2	Coleta de CCOs.....	50
3.2.3	Maturação <i>in vitro</i>	50
3.2.4	Fertilização <i>in vitro</i> e cultivo de embriões.....	50
3.2.5	Análises do perfil lipídico por Multiple Reaction Monitoring – Mass Spectrometry (MRM-MS).....	51
3.2.6	Análise Estatística.....	52
3.3	RESULTADOS.....	53
3.3.1	Efeitos da estimulação de síntese de GMPc durante a MIV no perfil lipídico em oócitos bovinos por EM.....	53
3.3.2	Efeitos da estimulação de síntese de GMPc durante a MIV no perfil lipídico embrionário por EM.....	55
3.4	DISCUSSÃO.....	58
3.5	CONCLUSÃO.....	60
3.6	REFERÊNCIAS.....	61
4.	Conclusão Geral.....	66

Introdução

1. Introdução e Fundamentação Teórica

Nas últimas duas décadas o cenário da produção *in vitro* de embriões (PIVE) se desenvolveu fazendo com que o Brasil assumisse uma posição de vanguarda na adoção da PIVE em bovinos, tornando-se uma referência mundial na técnica (VIANA et al., 2018). Diante disso, as técnicas envolvidas na produção *in vitro* (PIV) de embriões vêm se desenvolvendo continuamente, requerendo muitos estudos a respeito da reprodução animal. Apesar dos avanços na PIV, ela ainda apresenta algumas limitações que devem ser investigadas, como os baixos índices de blastocistos, os custos dos embriões produzidos *in vitro* e a dificuldade na criopreservação dos mesmos (RUMPF, 2007).

A dificuldade na criopreservação de embriões produzidos *in vitro* ocorre devido à qualidade inferior do embrião em relação aos produzidos *in vivo*, resultando em uma menor criotolerância. Isso está associado, dentre outros fatores, ao maior acúmulo de lipídios no citoplasma dos oócitos e blastocistos de PIV (RIZOS et al., 2002). Os triacilgliceróis (TAG) são os principais lipídios citoplasmáticos e alterações no perfil lipídico podem estar relacionadas com os danos causados durante o processo de criopreservação (KUNDU et al., 2000; WATSON, 1995; WATSON, 2000). Esses danos fazem com que parte das células preservadas percam sua viabilidade e sua funcionalidade (MASSIP, 2003; BULGARELLI et al. 2012).

O conteúdo lipídico de uma célula é o resultado do balanço entre a síntese (lipogênese) e hidrólise (lipólise) dos lipídios celulares (MIYOSHI et al., 2008). A lipólise celular é classicamente mediada através do segundo mensageiro adenosina monofosfato cíclica (AMPc) que promove a ativação da proteína cinase dependente de AMPc (PKA), que por sua vez, fosforila proteínas relacionadas à lipólise (LANGIN, 2006). Em adipócitos humanos, foi observado que o segundo mensageiro guanosina monofosfato cíclica (GMPc) ativa a proteína cinase dependente de GMPc (PKG), a qual fosforilaria as mesmas proteínas envolvidas no processo de lipólise mediado por AMPc/PKA (LAFONTAN et al., 2008).

Estudos anteriores mostraram que enzimas da via GMPc são expressas em oócitos (OO) e células do cumulus (CC) bovinos e que a manipulação farmacológica de algumas dessas enzimas tem efeito sobre o seu metabolismo lipídico (SCHEFER et al., 2016; SCHWARZ et al., 2018). A melhor compreensão das vias de sinalização da lipólise em CCOs bovinos permitirá obter novas informações sobre o metabolismo lipídico, de forma que a via de sinalização possa ser manipulada para produzir embriões com menor teor de lipídios e, conseqüentemente, de melhor qualidade.

1.1 SISTEMAS DE PRODUÇÃO *IN VITRO*

A produção de embriões *in vitro* envolve três principais etapas, a maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV). O processo de MIV se inicia com a remoção do complexo-cumulus oócito (CCO) do interior do folículo ovariano (HOSHI, 2003) e sua inclusão em um sistema de cultivo *in vitro*, em que os CCOs devem permanecer em estufa com controle de atmosfera gasosa e temperatura (RODRIGUES; GARCIA, 2000). A MIV tem duração média de 22 horas até que o oócito chegue ao estágio de metáfase II da meiose (THOMPSON, 2000). Além das modificações nucleares e citoplasmáticas que ocorrem no oócito, as células do cumulus realizam algumas funções importantes para os oócitos como a passagem de nutrientes e moléculas reguladoras através das junções comunicantes (NAGAI, 2001). Nesta etapa, os meios de cultivo e suplementações utilizados variam em cada laboratório, porém na maioria deles o soro fetal bovino (SFB) tem sido utilizado como suplementação ao meio base além de gonadotrofinas (FSH e LH) (RODRIGUES; GARCIA, 2000). Sabe-se que a MIV pode ser afetada por diversos fatores como pH, temperatura, atmosfera gasosa, uso de suplementações, entre outros. Para que o processo de MIV ocorra de forma similar ao *in vivo*, porém, é preciso que os meios utilizados mimetizem as condições encontradas durante o processo (SANGILD et al., 2000), no entanto, ainda há necessidade de melhorias nesse sentido.

Após a maturação *in vitro*, os oócitos completam a maturação com a extrusão do primeiro corpúsculo polar possibilitando a fertilização (AVELINO et al., 2002). Para a FIV, palhetas de sêmen congelado possuem espermatozoides viáveis e inviáveis que são separados pelo gradiente de Percoll (GALLI; LAZZARI, 1996), e os viáveis são avaliados

em relação à motilidade e concentração que são essenciais para calcular a concentração que deverá ser utilizada na FIV. (YOUNG; SINCLAIR; WILMUT, 1998). A partir da fertilização inicia-se o CIV que é a etapa de desenvolvimento do oócito fertilizado (zigoto) até o estágio de blastocisto (SANGILD et al., 2000). As condições dessa etapa são muito importantes para que bons índices de produção de embriões sejam alcançados. Durante esse período ocorre a ativação do genoma embrionário, o processo de divisão celular, compactação dos blastômeros no estágio de mórula e início da diferenciação embrionária com a formação da blastocle (HOSHI, 2003). O desenvolvimento embrionário é avaliado no 7º dia de CIV e os embriões são selecionados para transferência ou criopreservação.

1.2 OVÁRIO E AMBIENTE FOLICULAR

Os ovários são órgãos que fazem parte do sistema reprodutor das fêmeas e são o local onde se dá a gametogênese, ou seja, produção dos gametas. Além disso, eles também são responsáveis pela produção de hormônios relacionados à reprodução. Os ovários são formados após a migração das PGCs (células germinativas primordiais), ainda durante o desenvolvimento fetal (HAFEZ; HAFEZ, 2004; RUSSE, 1983), do saco vitelínico para as cristas genitais. Cada ovário é constituído por um epitélio germinativo (externo), túnica albugínea e região cortical onde estão localizados os folículos (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Os folículos são responsáveis pelo desenvolvimento dos oócitos, pois é nesse ambiente em que irão adquirir a competência necessária para fertilização. Após a formação dos ovários, inicia-se a foliculogênese, que envolve o processo de formação dos folículos primordiais e o desenvolvimento desses folículos (folículos primários, secundários e até terciários), porém ainda sem a capacidade de ovular (DRUMMOND, 2006). Esses folículos permanecem em estágios pré-ovulatórios, com oócitos estacionados no primeiro bloqueio meiótico, em que permanecerão até a puberdade do animal (GORDON, 2003). Após o início da puberdade, alguns dos folículos continuam a se desenvolver e os oócitos iniciam o processo de retomada da meiose, para então poderem ser ovulados (NAGY et al., 2003).

No desenvolvimento dos folículos várias alterações ocorrem tornando o ambiente mais adequado para a ovulação. Os folículos primordiais são constituídos por uma única

camada de células pavimentosas que se posicionam em volta do oócito primário. No desenvolvimento desses folículos suas células tornam-se cuboides (células da granulosa) e ocorre um aumento no diâmetro do oócito, constituindo o folículo primário. A partir daí inicia-se a formação da zona pelúcida e das junções comunicantes entre células da granulosa e oócito, sendo essa comunicação indispensável para o desenvolvimento do oócito e posterior desenvolvimento embrionário (EPPIG; WIGGLESWORTH; PENDOLA, 2002; RUSSE, 1983). Com a multiplicação das células da granulosa através da mitose, forma-se o folículo secundário (HURK; ZHAO, 2004). Em seguida, as células da granulosa começam a se diferenciar em células do cumulus (CC) e células da granulosa murais (CG) e ocorre a formação de uma cavidade cheia de fluido, o antro, quando então o folículo é denominado antral ou terciário (RUSSE, 1983). A comunicação entre as células do cumulus e oócito é indispensável para a capacitação do gameta feminino, sendo assim é necessário que ela ocorra de maneira adequada (KRISHER, 2003). Quando isso não ocorre, as funções do oócito podem ser alteradas prejudicando o desenvolvimento embrionário posterior (DUMESIC et al., 2015). Neste período da foliculogênese o oócito atinge o seu tamanho necessário e então começa a diminuir seu ritmo de crescimento, parando sua atividade de síntese de RNA (HYTTEL et al., 1997).

A partir da formação do antro o oócito já possui capacidade para retomar a meiose (EPPIG; BRIEN, 1996), porém ainda é necessário que as células da granulosa se multipliquem e o antro aumente a ponto desses folículos se tornarem pré-ovulatórios. Após o pico de LH liberado pela hipófise, esses oócitos irão retomar a meiose e serão ovulados em metáfase II (BINELLI; MURPHY, 2010).

1.3 MATURAÇÃO E COMPETÊNCIA OOCITÁRIA

A maturação oocitária é o período em que o oócito irá adquirir competência necessária para fertilização e posterior desenvolvimento embrionário, com isso, o processo de maturação se torna uma etapa bastante importante da PIV de embriões. Como já mencionado, o processo de foliculogênese e oogênese começam ainda na fase fetal. Ao nascimento o oócito está no primeiro bloqueio meiótico (diplóteno da prófase I), onde permanecerá até a puberdade. Após o pico de LH, é desencadeada uma série de

reações que darão início ao processo de maturação com a retomada da meiose (DUMONT et al., 2005). Dentre essas reações, as proteínas mais importantes nesse processo são as do complexo MPF (fator promotor da maturação) que são reguladas por adenosina monofosfato cíclico (AMPc), presentes em altos níveis dentro do oócito (CONTI et al., 1998). O processo de maturação oocitária envolve a maturação nuclear, molecular e citoplasmática que devem ocorrer em sincronia (GORDON, 2003).

A maturação citoplasmática envolve modificações na distribuição e organização de organelas, além de alterações e reorganização da dinâmica de filamentos do citoesqueleto (FERREIRA et al., 2009). A maturação nuclear consiste na progressão do ciclo meiótico, desde vesícula germinativa (prófase da meiose I) até o segundo bloqueio meiótico em metáfase II, com condensação dos cromossomos e rompimento da vesícula germinativa (JONES, 2004). Ao término da primeira divisão meiótica, o citoplasma é dividido assimetricamente, gerando uma célula pequena chamada de primeiro corpúsculo polar e outra maior, denominada oócito secundário (MAYES; SIRARD, 2001). Além da maturação nuclear e citoplasmática, para a completa maturação do oócito é necessária a maturação molecular, que envolve os padrões de transcrição e acúmulo de RNAm e proteínas produzidos durante o período de crescimento do oócito, e que controlam a maturação citoplasmática e nuclear (FERREIRA et al., 2009; MAYES; SIRARD, 2001).

1.4 METABOLISMO LIPÍDICO CELULAR E OOCITÁRIO

Lipídios são biomoléculas insolúveis em água com grande diversidade química e estrutural que possuem diversas funções. Eles possuem um papel estrutural na constituição de membranas biológicas, como fonte de energia (metabolismo energético) e na sinalização celular (GURR et al., 2002). Oócitos e embriões bovinos são ricos em lipídios que são essenciais durante os processos de maturação e desenvolvimento embrionário. Os fosfolipídios possuem função estrutural e são os principais componentes das membranas biológicas. Em sua maioria, elas são constituídas por fosfatidilcolina (PC) e esfingomielina (SM). Além do papel estrutural, eles possuem também papel na regulação de proteínas, atuando como lipídios bioativos (HANNUN e OBEID, 2008).

Os lipídios intracelulares são armazenados em forma de gotas citoplasmáticas, compostas principalmente por triacilgliceróis (TAGs), que são utilizados como fonte de energia e precursores de ácidos graxos. Embriões bovinos produzidos *in vitro* têm um acúmulo aumentado de gotas lipídicas, principalmente se cultivados em meio enriquecido com soro (FERGUSON e LEESE, 1999; ABE et al., 2002; BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL, 2011). Os TAGs têm como principal função a reserva energética, a qual é essencial durante a maturação *in vitro*, onde ocorre a síntese proteica, retomada da meiose e maturação citoplasmática (FERGUSON e LEESE, 1999; KIM et al., 2001).

As principais ações metabólicas de lipídios podem ser divididas em atividades lipogênicas e ações lipolíticas. As atividades lipogênicas envolvem todos os processos metabólicos que resultam em biossíntese, incorporação e armazenamento de TAGs. As atividades lipolíticas envolvem ações que resultam na hidrólise do TAG armazenado, resultando em ácidos graxos e glicerol. A regulação desses processos ocorre através de nutrientes e sinais aferentes dos sistemas neurais e hormonais, dependendo das necessidades energéticas do indivíduo (AHIMA; FLIER, 2000). A quantidade de lipídios de uma célula depende do balanço entre a síntese de TAG (lipogênese) e a hidrólise (lipólise) (MIYOSHI et al., 2008).

A lipólise celular é mediada por catecolaminas que elevam o nível de adenosina monofosfato cíclico (AMPc), que ativa a proteína cinase dependente de AMPc (PKA) fosforilando proteínas relacionadas à lipólise, como lipase sensível a hormônios (HSL) e perilipinas (PLINs) (LANGIN, 2006). Com a fosforilação da HSL e da PLIN1, ocorre a liberação de um co-ativador, CGI-58 (comparative gene identification-58), que permite que a ATGL (lipase de triacilglicerol do adipócito) inicie a lipólise, além de ativar a HSL para a sequência lipolítica (BICKEL; TANSEY; WELTE, 2009). A hidrólise dos TAGs é o resultado da ativação da HSL por fosforilação dos resíduos de serina, seguido por sua translocação do citoplasma para o interior da gota lipídica (ALI et al., 2005). A entrada do HSL fosforilado para o interior da gota lipídica só é permitida quando as perilipinas, proteínas que revestem a superfície das gotas lipídicas, também são fosforiladas (TANSEY et al., 2003). Alguns estudos indicam que as PLINs podem ser consideradas indicadores do teor de lipídios celulares (LOLICATO et al., 2014). Essas proteínas têm

sido amplamente estudadas em diferentes tipos celulares (BICKEL; TANSEY; WELTE, 2009). Após essa ativação, ocorre a hidrólise dos TAGs em ácidos graxos (AG) não esterificados e glicerol, sendo os AG que são transformados em energia pela β -oxidação na mitocôndria (LAFONTAN; VIGUERIE, 2006).

Figura 1: Esquema hipotético de funcionamento da via GMPc nas células.

Fonte: Própria autoria.

Em adipócitos de humanos, foi observado que o nucleotídeo monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) ativa a proteína cinase dependente de GMPc (PKG), a qual fosforila algumas das mesmas proteínas envolvidas no processo de lipólise (LAFONTAN et al., 2008) (Figura 1). Esse nucleotídeo pode ser sintetizado pela guanilato ciclase solúvel (GCs), que é ativada pelo óxido nítrico (NO), e pelos receptores de guanilato ciclase acoplados à membrana (GCM), também chamados de receptores de peptídeos natriuréticos (NPRs), os quais são ativados pelos peptídeos natriuréticos (NPs) (KUHN, 2003). O sistema NP é formado por peptídeos endógenos com grande homologia entre

as espécies, envolvidos em inúmeras ações (MISONO et al., 2011), entre elas, funções lipolíticas, envolvendo o precursor de NP do tipo A (NPPA) e precursor de NP do tipo B (NPPB) e o do tipo C (NPPC) (ENGELI et al., 2012; LAFONTAN et al., 2008; MORO; LAFONTAN, 2013).

As vias mais comuns da ação do GMPc afetam as proteínas cinases dependentes de GMPc dos tipos 1 e 2 (PKG1 e PKG2), canais iônicos e fosfodiesterases (PDE) reguladoras (LOHMANN et al., 1997). Além da fosforilação da HSL e das PLINs, a PKG pode inibir a fosfodiesterase 3B (PDE3B, PDE específica de degradação do AMPc), portanto, há um aumento nos níveis de AMPc contribuindo potencialmente para a lipólise. Níveis de GMPc são balanceados entre a síntese pela guanilato ciclase (GC) e degradação por PDE específicas para GMPc (PDE5, PDE6 e PDE9) (KASS et al., 2007). Assim, essas duas vias parecem funcionar de forma paralela e com a mesma função em adipócitos humanos.

Em CCOs bovinos já foi relatado que a maioria das enzimas envolvidas no controle dos níveis de GMPc (síntese e degradação) ou relacionada às suas funções são expressas em oócitos e/ou células do cumulus (SCHWARZ et al., 2014). Recentemente a *PLIN2* foi identificada em gotas lipídicas de CCOs de camundongos (YANG et al 2010) e em oócitos de bovinos (AARDEMA et al 2011). Além disso, foi observado que a manipulação farmacológica dos níveis de GMPc, utilizando um inibidor da PDE5 (enzima de degradação do GMPc), provocou uma diminuição no conteúdo lipídico de oócitos bovinos, provavelmente porque altos níveis desse nucleotídeo estimulariam a lipólise nessas células (SCHWARZ et al., 2018). Outro fato que evidencia o envolvimento do GMPc com o metabolismo lipídico de CCOs bovinos é que o soro fetal bovino (SFB) quando suplementado no meio de maturação, pode causar alterações na expressão de componentes da via, ao mesmo tempo em que provoca aumento no teor de lipídios em oócitos (SCHWARZ et al., 2016).

Diante disso, seria possível que a manipulação farmacológica dessa via sinalizadora durante a maturação, através de diferentes estímulos, possa exercer influência sobre o metabolismo lipídico de oócitos, da mesma maneira que exercem em adipócitos. Além disso, os receptores de peptídeos natriuréticos, *NPR1*, *NPR2* e *NPR3*, já foram

identificados em células do cumulus oriundas de CCOs bovinos (CESARO et al., 2015). Os receptores *NPR1* e *NPR2* possuem atividade de guanilato ciclase e quando estimulados aumentam o GMPc (HSUEH et al., 2018), já o *NPR3* não tem essa atividade, mas é responsável pela degradação do ligante (POTTER et al., 2009).

1.5 REFERÊNCIAS

- AARDEMA, H. et al. Oleic acid prevents detrimental effects of saturated fatty acids on bovine oocyte developmental competence. **Biology of reproduction**, v. 85, n. 1, p. 62–69, 2011.
- ABE, H. et al. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. **Mol Reprod Dev**, v. 61 (1), p 57-66, 2002.
- AHIMA, R. S.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Trends Endocrinol Metab**, v. 11, p. 327–332, 2000.
- ALI, Y. BEN et al. Continuous monitoring of cholesterol oleate hydrolysis by hormone-sensitive lipase and other cholesterol esterases. **Journal of lipid research**, v. 46, p. 994–1000, 2005.
- AVELINO, K. B. et al. *In vitro* production of embryos of cows with acquired infertility. **Theriogenology**, v. 57, p. 656, 2002.
- BARCELÓ-FIMBRES, M.; SEIDEL G.E. Cross-validation of techniques for measuring lipid content of bovine and blastocysts. **Theriogenology**, v. 75, p. 434-444, 2011.
- BICKEL, P. E.; TANSEY, J. T.; WELTE, M. A. PAT proteins , an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1791, n. 6, p. 419–440, 2009.
- BINELLI, M.; MURPHY, B. D. Coordinated regulation of follicle development by germ and somatic cells. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, n. 1, p. 1–12, 2010.
- BULGARELLI, D. L. et al. Vitrification of bovine oocyte substantially impairs their reproductive capacity independently of maturation stage. **Fertility and Sterility** v. 98, n. 3, p. 118, 2012.
- CESARO, M. P. DE et al. Natriuretic peptides stimulate oocyte meiotic resumption in bovine. **Animal Reproduction Science**, v. 159, p. 52–59, 2015.
- CONTI, M. et al. Role of cyclic nucleotide phosphodiesterases in resumption of meiosis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 145, p. 9–14, 1998.
- DEGERMAN, E. et al. Phosphorylation and activation of hormone-sensitive adipocyte

- phosphodiesterase type 3B. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 14, n. 1, p. 43–53, 1998.
- DRUMMOND, A. E. The role of steroids in follicular growth. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 4, p. 1–11, 2006.
- DUMESIC, D. A. et al. Oocyte environment : follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. **Fertility and Sterility**, v. 103, n. 2, p. 303–316, 2015.
- DUMONT, J. et al. p90Rsk is not involved in cytosstatic factor arrest in mouse oocytes. **The Journal of Cell Biology**, v. 169, n. 2, p. 227–231, 2005.
- ENGELI, S. et al. Natriuretic peptides enhance the oxidative capacity of human skeletal muscle. **The journal of clinical investigation**, v. 122, n. 12, p. 4675–4679, 2012.
- EPPIG, J. J.; BRIEN, M. J. O. Development *In Vitro* of Mouse Oocytes from Primordial Follicles. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 197–207, 1996.
- EPPIG, J. J.; WIGGLESWORTH, K.; PENDOLA, F. L. The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, v. 99, n. 5, p. 2890–2894, 2002.
- FERGUSON, E.M.; LEESE H.J. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. **J Reprod Ferti**, v. 116, p. 7373-378, 1999.
- FERREIRA, E. M. et al. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes : Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71, p. 836–848, 2009.
- GALLI, C. et al. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, v. 59, p. 599–616, 2003.
- GALLI, C.; LAZZARI, G. Practical aspects IVM-IVF in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 371–379, 1996.
- GORDON, I. Maturing the bovine oocyte. In: PRESS C. U. (Ed.). **Laboratory production of cattle embryos.**, v. cap 4, p. 112–157, 2003.
- GURR, M.I.; HARWOOD, J.L.; FRAYN, K.N. Lipid Biochemistry, 5th edn. (**Blackwell Science: Malden.**), 2002.
- HAFEZ, E. S.; HAFEZ, B. Reprodução Animal. v. 7^a edição, p. Barueri, SP., 2004.
- HANNUN, Y.A.; OBEID, L.M. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9(2), p. 139-150, 2008.
- HOSHI, H. *In vitro* production of bovine embryos and their application for embryo transfer. **Theriogenology**, v. 59, p. 675–685, 2003.
- HSUEH, A. J. W. et al. Intraovarian Control of Early Folliculogenesis. **Endocrine Reviews**, v. 36, p. 1–24, 2018.

HURK, R. VAN DER; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1717–1751, 2004.

HYTTEL, P. et al. Oocyte growth capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 23–32, 1997.

JONES, K. T. Turning it on and off : M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. **Molecular Human Reproduction**, v. 10, n. 1, p. 1–5, 2004.

KASS, D. A. et al. Phosphodiesterase regulation of nitric oxide signaling. **Cardiovascular Research**, v. 75, n. 2, p. 303–314, 2007.

KIM, J.Y. et al. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and in vitro matures bovine oocytes. **Reproduction**, v. 122, p. 131-138, 2001.

KRISHER, R. L. The effect of oocyte quality on development. **Journal Animal Science**, v. 82, p. E14–E23, 2003.

KUHN, M. Structure, Regulation, and Function of Mammalian Membrane Guanylyl Cyclase Receptors, With a Focus on Guanylyl Cyclase-A. **Circulation Research**, v. 93, n. 8, p. 700–709, 2003.

KUNDU, C.N. et al. Development of a simple sperm cryopreservation model using a chemically defined medium and goat cauda epididymal spermatozoa. **Cryobiology**; v.40, p. 117-125, 2000.

LAFONTAN, M. et al. Control of lipolysis by natriuretic peptides and cyclic GMP. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 19, n. 4, p. 130–137, 2008.

LAFONTAN, M.; VIGUERIE, N. Role of adipokines in the control of energy metabolism: focus on adiponectin. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 6, n. 6, p. 580–585, 2006.

LANGIN, D. Control of fatty acid and glycerol release in adipose tissue lipolysis. **Comptes Rendus - Biologies**, v. 329, p. 598–607, 2006.

LOHMANN, S. M. et al. Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 22, n. 8, p. 307–312, 1997.

LOLICATO, F. et al. The Cumulus Cell Layer Protects the Bovine Maturing Oocyte Against Fatty Acid-Induced Lipotoxicity. **Biology of Reproduction**, v. 92, n. 1, p. 1–16, 2014.

MASSIP, A. Cryopreservation of bovine oocytes: current status and recent developments. **Reprod Nutr Dev**, v. 43, p. 325-330, 2003.

MAYES, M. A.; SIRARD, M. A. THE INFLUENCE OF CUMULUS-OOCYTE COMPLEX MORPHOLOGY AND MEIOTIC INHIBITORS ON THE KINETICS OF NUCLEAR MATURATION IN CATTLE. **Theriogenology**, v. 55, n. 418, p. 911–922, 2001.

MISONO, K. S. et al. Structure, signaling mechanism and regulation of the natriuretic peptide receptor guanylate cyclase. **FEBS Journal**, v. 278, p. 1818–1829, 2011.

MIYOSHI, H. et al. Adipose Triglyceride lipase regulates basal lipolysis and lipid droplet size in adipocytes. **J Cell Biochem.**, v. 105, p. 1430–1436, 2008.

MORO, C.; LAFONTAN, M. Natriuretic peptides and cGMP signaling control of energy homeostasis. **American journal of physiology heart and circulatory physiology**, v. 304, p. H358–H368, 2013.

NAGAI, T. The improvement of *in vitro* maturation systems for bovine and porcine oocytes. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1291–1301, 2001.

NAGY, A. et al. **Manipulating the Mouse Embryo : A Laboratory Manual**. [s.l: s.n.]. v. Third Edit

POTTER, L. R. et al. Natriuretic Peptides : Their Structures , Receptors , Physiologic Functions and Therapeutic Applications. **Handbook of experimental pharmacology**, v. 191, p. 341–366, 2009.

RIZOS, D. et al. Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v. 62, p. 320–327, 2002.

RODRIGUES, C. F. M.; GARCIA, J. M. Fecundação *in vitro* em bovinos: aplicação comercial. **Arq. Fac. Vet. UFRGS Supl.**, v. 28, p. 186–187, 2000.

RUMPF, R. Avanços metodológicos na produção *in vitro* de embriões. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 229–233, 2007.

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

SANGILD, P. T. et al. Blood Chemistry , Nutrient Metabolism , and Organ Weights in Fetal and Newborn Calves Derived from *In Vitro*-Produced Bovine Embryos. **Biology of reproduction**, v. 62, p. 1495–1504, 2000.

SCHEFER, L. et al. Influência da via GMPc no conteúdo lipídico de oócitos bovinos maturados *in vitro*. **Anais da XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões**, p. 334, 2016.

SCHWARZ, K. R. L. et al. Effect of nitric oxide on the cyclic guanosine monophosphate (cGMP) pathway during meiosis resumption in bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 81, p. 556–564, 2014.

SCHWARZ, K. R. L. et al. Effects of fetal calf serum on cGMP pathway and oocyte lipid metabolism *in vitro*. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, p. 1593–1601, 2016.

SCHWARZ, K. R. L. et al. The role of cGMP as a mediator of lipolysis in bovine oocytes and its effects on embryo development and cryopreservation. **PLoS ONE**, v. 13, n. 1, 2018.

TANSEY, J. T. et al. Functional studies on native and mutated forms of perilipins: A role in protein kinase α -mediated lipolysis of triacylglycerols in Chinese hamster ovary cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 10, p. 8401–8406, 2003.

THOMPSON, J. G. *In vitro* culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos — a decade of achievement. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 263–275, 2000.

VIANA, J.H.M. Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals: Is it a turning point? In 2017 *in vitro*-produced than *in vivo*-derived embryos were transferred worldwide. *Embryo Transfer News*, v. 36(4), p. 8-25, 2018.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reprod Fertil Dev**, v. 7, p. 871-891, 1995.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim Reprod Sci**, v. 60-61, p. 481-492, 2000.

YANG, X. et al. Identification of perilipin-2 as a lipid droplet protein regulated in oocytes during maturation, **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22 (8), p. 1262-1271, 2010.

YOUNG, L. E.; SINCLAIR, K. D.; WILMUT, L. Large offspring syndrome in cattle and sheep. **Rev. Reprod.**, v. 3, p. 155–163, 1998.

Artigo 1

2. Artigo 1

Efeitos da manipulação farmacológica de enzimas de síntese de GMPc no conteúdo lipídico de complexos cumulus-oócitos bovinos maturados *in vitro*.

Schefer, L.^A; Fernandes, H.^A; Castro, F. C.^A; Carrijo, S. S.^A; Paschoal, D. M.^A; Leal, C. L. V.^A;

^A Departamento de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, Pirassununga SP, Brasil.

RESUMO

O monofosfato cíclico de guanosina (GMPc via PKG), sintetizado a partir da ativação das guanilato ciclases (GCm e GCs), é um segundo mensageiro que tem se mostrado importante para o metabolismo lipídico de CCOs bovinos. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da manipulação farmacológica de ativação das GC através do uso do peptídeo natriurético tipo B (NPPB - GCm) e da Protoporfirina IX (GCs). No primeiro experimento, foram avaliados os efeitos do uso de diferentes concentrações de NPPB (10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} M) no conteúdo lipídico de oócitos maturados *in vitro* por 24h por coloração de Nile Red (NR). Além disso, foi avaliada a abundância relativa de transcritos dos receptores de NPs (*NPR1* e *NPR3*) nas células do cumulus através de PCR em tempo real. Duas concentrações influenciaram o conteúdo lipídico dos oócitos, apresentando uma redução lipídica nos tratamentos com 10^{-7} M ($0,26 \text{ IF}/\mu\text{m}^2 \pm 0,01$) e 10^{-8} M ($0,29 \text{ IF}/\mu\text{m}^2 \pm 0,02$) de NPPB quando comparados ao controle ($0,41 \text{ IF}/\mu\text{m}^2 \pm 0,07$). A abundância relativa de transcritos dos receptores de NPs não foi afetada pelo NPPB em nenhuma de suas concentrações ($P < 0.05$). No segundo experimento, comparamos o NPPB (10^{-7} M) e a Protoporfirina IX (10^{-5} M). CCOs maturados na presença dos estimuladores de síntese de GMPc por 9 e 24h foram avaliados quanto ao conteúdo

lipídico nos oócitos através da marcação lipídica por NR e nas células do cumulus por Bodipy (BP). Além disso, foram avaliados os níveis intracelulares do GMPc nos oócitos e células do cumulus após 9h de maturação na presença dos fármacos e as taxas de maturação nuclear no final da MIV (24h). Quando comparados os dois estimuladores de síntese do GMPc durante 9h e 24h de MIV, houve uma diminuição ($P<0.05$) do conteúdo lipídico dos oócitos tratados com NPPB ($3,05 \text{ IF}/\mu\text{m}^2 \pm 0,04$) em relação ao controle ($3,29 \text{ IF}/\mu\text{m}^2 \pm 0,05$) não tratado às 9h, que se manteve ao final das 24h ($P<0.05$). No grupo Protoporfirina IX, houve um aumento no conteúdo lipídico dos oócitos nas primeiras 9h ($3,80 \text{ IF}/\mu\text{m}^2 \pm 0,05$) ($P>0.05$), que ao final da MIV ($3,34 \text{ IF}/\mu\text{m}^2 \pm 0,07$) (24h) se igualou ao controle ($P>0.05$). Nas células do cumulus, houve diminuição do conteúdo lipídico ($P<0.05$) apenas no grupo tratado com NPPB ($0,008 \mu\text{m}^2 \pm 0,001$) no final das 24h de MIV comparando ao controle ($0,019 \mu\text{m}^2 \pm 0,002$). Os níveis intracelulares de GMPc não foram alterados nas 9 primeiras horas de MIV. Para determinar a participação da PKG no metabolismo lipídico, no terceiro experimento, CCOs foram maturados na presença do NPPB associado ou não ao KT5823, inibidor da PKG. Em seguida, foi avaliado o conteúdo lipídico dos oócitos (NR) e células do cumulus (BP), as taxas de maturação nuclear e a abundância dos transcritos da *PLIN2*. O uso do inibidor da PKG, o KT5823, aumentou o conteúdo lipídico dos oócitos em comparação com NPPB ($P<0,05$) e não teve efeito em células do cumulus ($P>0.05$). A expressão da *PLIN2*, gene indicador do acúmulo de lipídios, não foi afetada ($P>0.05$). Em conclusão, o estímulo a enzimas de síntese de GMPc pode gerar alterações no conteúdo lipídico de CCOs bovinos maturados *in vitro*, mas o efeito depende de qual enzima foi estimulada e a PKG parece ter participação no processo em oócitos

Palavras-chave: Peptídeos Natriuréticos, Protoporfirina IX, Nile Red, Bodipy, maturação *in vitro*.

2.1 INTRODUÇÃO

Apesar dos avanços na produção embrionária *in vitro* (PIV), ainda existem algumas limitações que devem ser investigadas, como a dificuldade na criopreservação embrionária (RUMPF, 2007). Essa dificuldade ocorre devido à qualidade inferior do embrião em comparação com as produzidas *in vivo*, resultando em menor criotolerância.

O maior acúmulo lipídico nos embriões, dentre outros fatores, tem sido sugerido como uma das causas da dificuldade de criopreservar essas estruturas (RIZOS et al., 2002). ;ABE et al., 2002). Os TAGs têm como principal função a reserva energética, a qual é essencial durante a maturação *in vitro*, onde ocorre a síntese proteica, retomada da meiose e maturação citoplasmática (FERGUSON e LEESE, 1999; KIM et al., 2001).

A maioria dos oócitos de mamíferos são ricos em lipídios, os quais são essenciais durante os processos de maturação e desenvolvimento embrionário. Foi relatado, que 12% do total seco de massa sem um embrião de camundongo (3,83ng por oócito) corresponde ao teor de lipídio nessa estrutura (LOEWENSTEIN e COHEN, 1964). Além disso, em suínos, os TAGs também representam os principais constituintes dos oócitos (HOMA et al., 1986).

A quantidade de lipídios em uma célula é balanceada através dos processos de síntese (lipogênese) e hidrólise (lipólise) dos lipídios (MIYOSHI et al., 2008). A lipólise celular é mediada por catecolaminas que controlam o nível de adenosina monofosfato cíclico (AMPc), que ativa a proteína cinase dependente de AMPc (PKA), que por sua vez fosforila as proteínas relacionadas à lipólise, como a enzima lipase sensível ao hormônio (HSL) (LANGIN, 2006). Após essa ativação ocorre a hidrólise lipídica em ácidos graxos não esterificados (AG) e glicerol, sendo os AG transformados em energia por β -oxidação mitocondrial (LAFONTAN; VIGUERIE, 2006). Em adipócitos humanos, observou-se que a elevação dos níveis do monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), por meio de estímulos gerados por peptídeos natriuréticos (NPs), ativa a proteína quinase dependente de GMPc (PKG), a qual também fosforila lipase importante no processo (LAFONTAN et al., 2008). O GMPc pode ser sintetizado pela guanilato ciclase solúvel (GCs) e pelas guanilato ciclasas da membrana (GCm), também denominadas receptores de peptídeos natriuréticos (NPRs) (KUHN, 2003). Os níveis de GMPc são balanceados entre a síntese por guanilato ciclase (GC) e a degradação pelas fosfodiesterase (PDEs).

Em complexos cumulus-oócito (CCOs) bovinos, foi relatado que a maioria das enzimas envolvidas no controle dos níveis de GMPc (síntese e degradação) ou relacionadas às suas funções são expressas em oócitos e/ou células cumulus. A expressão dos NPRs (receptores de peptídeos natriuréticos), responsáveis pela síntese

do GMPc, foram identificadas em oócitos e células do cumulus (CESARO et al., 2015). Além disso, outra enzima relacionada à síntese de GMPc, a GUCY (uma GCm), também foi identificada em oócitos e células do cumulus (SCHWARZ et al., 2014). Enzimas de degradação de ambos os nucleotídeos cíclicos, GMPc (PDE5) e AMPc (PDE3), foram identificadas nos oócitos, porém apenas a PDE5 foi relatada em células do cumulus (SCHWARZ et al., 2014).

Também observou-se que a manipulação farmacológica dos níveis de GMPc, utilizando um inibidor de PDE5 (enzima de degradação do GMPc), causou uma diminuição no conteúdo lipídico nos oócitos bovinos, provavelmente porque altos níveis desse nucleotídeo estimulariam a lipólise nessas células (SCHWARZ et al., 2018). Além disso, o soro fetal bovino usualmente utilizado no cultivo *in vitro*, tem sido relacionado ao aumento do conteúdo lipídico e a alterações na expressão de componentes da via do GMPc (SCHWARZ et al., 2016). Assim, há evidências do envolvimento da via GMPc/PKG no metabolismo lipídico de CCOs bovinos.

Este estudo teve como objetivo investigar a influência dessa via no metabolismo lipídico de CCOs bovinos e, considerando que o GMPc pode ser sintetizado por diferentes enzimas, foram comparados diferentes estímulos farmacológicos (GCs – Protoporfirina IX e GCm – NPPB) para avaliar diferentes parâmetros relativos à lipólise, como conteúdo lipídico, expressão de transcritos relacionados ao metabolismo lipídico, além da quantificação dos níveis intracelulares desse nucleotídeo nos oócitos e células do cumulus. Também avaliamos se os efeitos da estimulação de síntese do GMPc se dão através da PKG, utilizando um inibidor específico dessa enzima.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Morfofisiologia Molecular e do Desenvolvimento no Departamento de Medicina Veterinária da Faculdade de

Zootecnia e Engenharia de Alimentos (USP). Todos os reagentes utilizados neste projeto foram adquiridos da Sigma (St. Louis, Missouri - EUA), quando não, são especificados no texto.

2.2.1 Delineamento Experimental

Esse estudo foi dividido em três experimentos. O objetivo do primeiro experimento foi investigar o efeito de diferentes concentrações de NPPB ao longo da maturação *in vitro* sobre o conteúdo lipídico de oócitos e assim determinar uma melhor concentração de uso para induzir a lipólise. Para isso foram testadas três concentrações da droga: 10^{-8} , 10^{-7} e 10^{-6} M (CESARO et al., 2015). Os oócitos foram analisados ao final da maturação (24h) quanto ao conteúdo lipídico por coloração com Nile Red (Intensidade de Fluorescência). A maturação nuclear foi avaliada por coloração com Hoechst 33342. O grupo controle foi maturado sem a droga. As células do cumulus foram separadamente analisadas por PCR quanto à abundância relativa de transcritos para o *NPR1* (enzima de síntese do GMPc estimulada por NPPB), *NPR3* (outro receptor de NPPB que realiza o *clearance* de NPs) e *PDE3B* (enzima inibida pelo GMPc; ARMANI et al., 2011). No experimento 2, comparou-se a via GMPc/PKG estimulada pelo NPPB (estimulador de GCm; *NPR1*) e pela Protoporfirina IX (estimuladora de GCs) sobre diferentes parâmetros. Os CCOs foram maturados *in vitro* com NPPB (concentração de 10^{-7} M definida no experimento anterior) e Protoporfirina IX (10^{-5} M, SCHEFER, et al., 2016). O controle foi sem nenhum tratamento. Primeiramente, realizou-se a avaliação do teor de lipídios às 9 h, visto que parece haver acúmulo lipídico em oócitos que se dá até as 9 h de MIV (Del COLLADO et al, 2017) e posteriormente, também ao final da maturação (24 h), em duas etapas independentes. Uma avaliação adicional foi realizada em CCOs maturados por 9h nos mesmos tratamentos e submetidos à mensuração de níveis intracelulares de GMPc em oócitos e células do cumulus através de kit específico. Na última etapa desse experimento foi avaliada a expressão gênica da *PDE3B* e da *PLIN2* nas células do cumulus de CCOs MIV por 9h e 24h. Por fim, no terceiro experimento o melhor estimulador para reduzir o conteúdo lipídico dos oócitos foi selecionado e combinado a um inibidor da PKG (10^{-5} M KT5823 – SCHWARZ et al., 2018) por 24h na MIV a fim de avaliar o efeito da via GMPc/PKG no conteúdo lipídico dos oócitos e células

do cumulus. Na primeira etapa, foi avaliado o conteúdo lipídico de oócitos e células do cumulus maturados *in vitro* durante 24 horas na presença do estimulador selecionado no experimento anterior (NPPB), associado ou não ao inibidor da PKG (KT5823). Após a MIV, os oócitos foram submetidos à marcação lipídica por Nile Red (NR) e as células do cumulus à marcação lipídica por Bodipy 493/503 (BP). A taxa de maturação foi avaliada para confirmar que o tratamento não interfere na MIV. Na segunda etapa, foram repetidos os mesmos tratamentos e avaliada a expressão dos transcritos para *PLIN2*.

2.2.2 Coleta de Ovários

Para a obtenção dos oócitos, ovários bovinos foram coletados em abatedouros em Santa Gertrudes – SP, Ipuã - SP e São João da Boa Vista - SP. Os ovários foram coletados e acondicionados em recipiente térmico (36°C) com solução salina (0,9%) para transporte até o laboratório.

2.2.3 Aspiração Folicular e Seleção de CCOs

Folículos entre 3 e 8mm de diâmetro foram aspirados com seringa (10ml) e agulha (1,20 x 40 mm). O líquido folicular obtido foi depositado em tubos cônicos estéreis e mantidos em banho-seco à 37°C até sedimentação dos CCOs. Após a sedimentação, os CCOs foram transferidos para meio tamponado (TCM199/Hepes) e selecionados. Apenas CCOs com citoplasma homogêneo e circundados por mais de três camadas compactas de células do cumulus foram utilizados nos experimentos (HAJARIAN et al., 2016).

2.2.4 Maturação *In vitro*

Para a maturação *in vitro* (MIV), CCOs foram cultivados em gotas de 100µl de meio de maturação (20–25 CCOs por gota) sob óleo mineral em placa de 35 mm. O meio base para maturação foi TCM199 com 26mM de NaHCO₃, 0,2 mM de piruvato de sódio e 10 µg/ml de gentamicina. Além disso, foi acrescido 0,5 µg/ml de hormônio folículo estimulante (FSH) e 10% de soro fetal bovino (SFB).

2.2.5 Determinação do teor de lipídios e da taxa de maturação nuclear em oócitos

Para avaliações de teor de lipídios e maturação nuclear, CCOs foram transferidos para gotas de 150µl de PBS livre de cálcio e magnésio com 0,1% de PVA (PBS+PVA) e pipetados por diversas vezes para isolamento das células do cumulus (CC) sem lisá-las. Os oócitos parcialmente desnudos foram recuperados e transferidos para um microtubo de 1,5 ml contendo 100µl de PBS+PVA e vortexados por 5 minutos, para completa remoção das células do cumulus. Após o desnudamento, os oócitos (OO) foram recuperados em 1ml de PBS e lavados por 3x em PBS+PVA. Pools de 25 OO foram fixados em 4% de paraformaldeído (PFD) por 20 minutos e permeabilizados em 0,5% de Triton X-100 por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foram corados com 10µg/ml de Hoechst 33342 (Invitrogen – H1399) por 15 minutos protegidos da luz e corados com 1µg/ml de Nile Red (N3013) em PBS+PVA por 30 minutos protegidos da luz e em temperatura ambiente. Após esse período, foram transferidos para lâminas de vidro (± 10 OO/lâmina) contendo 13µl de Pro Long Gold (Invitrogen - P36930) e coberta cuidadosamente com uma lamínula. As lâminas foram avaliadas em microscópio de epifluorescência (Nikon Eclipse). A maturação nuclear foi avaliada por Hoescht 33342 no TS100/Filtro AT-DAPI com emissão 445-450nm e excitação 475-490nm em aumento de 20x e 100ms de exposição. O conteúdo lipídico corado por Nile Red foi avaliado no TS100/Filtro G2A com emissão 590nm e excitação 516-560nm em aumento de 20x e 200ms de exposição. Por fim, as fotos obtidas, tiveram suas intensidades de fluorescência do Nile Red mensuradas pelo programa ImageJ (NIH; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). O teor de lipídeos dos oócitos é apresentado pela média da intensidade de fluorescência (FU et al., 2011).

2.2.6 Determinação do conteúdo lipídico em células do cumulus por Bodipy

Após o período de MIV, os CCOs foram transferidos para gotas de 50µl de PBS livre de cálcio e magnésio com 0,1% de PVA (PBS+PVA). Com cuidado, os CCOs foram fixados em 4% de paraformaldeído (PFD) por 20 minutos e permeabilizados em solução de saponina 0,1% por 1 hora. Em seguida, os CCOs foram corados com 20µg/ml de

Bodipy 493/503 (ThermoFisher – D3922) por 1 hora em temperatura ambiente e protegido da luz. Após esse período, os CCOs foram transferidos para lâminas de vidro (± 10 CCO/lâmina) contendo 13 μ l de Pro Long Gold e coberta cuidadosamente com uma lamínula. Os CCOs foram analisados utilizando o microscópio confocal LSM 710 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany; Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP) em aumento de 63x sob óleo e excitados com o laser Argônio 488. Seleccionada a seção de maior diâmetro, foi capturada uma imagem que em seguida foi analisada no ImageJ. Cada imagem foi aberta no software e foram seleccionadas 4 áreas aleatórias de 1cm² nas células do cumulus. Através da ferramenta “nucleus counter” foi definida a área das gotas lipídicas dentro das áreas seleccionadas. O valor utilizado foi o da área da gota lipídica/área avaliada das células do cumulus (1cm²).

2.2.7 Determinação da abundância relativa de transcritos por PCR em tempo real

Durante o desnudamento dos oócitos (item 2.2.5), o volume restante na placa contendo as CC foi recuperado e transferido para um microtubo de 0,6 ml, para ser centrifugado por 10 minutos a 1.000 G. Após esse período o sobrenadante foi descartado e ao pellet acrescentado 1,5 μ l de RNase OUT (1 μ l da enzima + 39 μ l de PBS+PVA). O tubo foi rapidamente mergulhado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C. Quando os oócitos foram utilizados para avaliação da expressão gênica eles também foram armazenados seguindo o mesmo protocolo das células do cumulus. Todas as amostras de CC coletadas após a MIV foram submetidas à extração total de RNA de acordo com o protocolo Trizol® (Invitrogen™). Após a extração, as amostras de RNA total foram quantificadas por espectrofotometria usando o NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific) para verificar a integridade avaliando a razão 260/280 (entre 1,8 e 2,0). Para procedimentos de digestão de DNA e transcrição reversa, as amostras de CC tiveram seus volumes ajustados para conter 1.000 ng de RNA por amostra. Todas as amostras foram submetidas ao processo de digestão do DNA utilizando a enzima DNase I - Amplification Grade® (Invitrogen). Para transcrição reversa (RT) e síntese de DNA complementar (cDNA), foi utilizado o kit "High Capacity cDNA Reverse Transcription" (Applied

Biosystems Carlsbad, CA-EUA). A quantificação relativa dos genes transcritos foi realizada por qPCR em tempo real, usando o sistema de detecção SybrGreen® com o reagente Power SybrGreen® PCR Master Mix (Applied Biosystems™), no equipamento da Applied Biosystems (7500 Fast Real-Time PCR System). As reações de qPCR foram executadas em 12 µL contendo 0,25 mM de cada primer, 1X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 2,5 µL de H₂O e 2,0 µL de modelo (cDNA diluído 8 vezes). As condições de ciclagem para amplificação foram: 95°C por 10 min, seguidas de 45 ciclos a 95°C por 15 s, 57°C por 20 s e 60° C por 40 s. Cada amostra foi analisada em duplicata para cada um dos genes. Como controle negativo para a reação, água ultrapura livre de DNase e RNase foi usada no lugar do cDNA. Os valores de expressão do gene alvo foram normalizados pela média geométrica dos transcritos de mRNA de um gene endógeno (*GAPDH*). As diferenças nas frequências dos transcritos foram calculadas pelo método comparativo 2- $\Delta\Delta C_t$ (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Uma linha de "limiar" foi fixada no ponto médio da amplificação exponencial para cada gene. Os primers para os genes alvo em estudo (Tabela 1) foram desenhados com base nas sequências bovinas disponíveis no navegador de genoma da Universidade da Califórnia Santa Cruz (UCSC) (<http://genome.ucsc.edu>) usando o software Primer3 (Primer3web, versão 4.0.0: <http://primer3.ut.ee>).

Tabela 1: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados para quantificação relativa dos genes selecionados.

Genes Alvo	Sequência (5' - 3')	Tamanho do Fragmento (PB)	Número Acesso
<i>NPR1</i> (<i>NP receptor 1</i>)	5' AATTATGGCTCCCTACTAACCACAGA 3' 5' TCCGGTTCACACGTTTCACA 3'	100	ENSBTAT 000000081 84
<i>NPR3</i> (<i>NP receptor 3</i>)	5' TTTGAAGCTAAGCAAGCGTACTCA 3' 5' CAGAACTTTTCACCTCCATGGAA 3'	100	NM 174127.2
<i>PDE3B</i> (<i>phosphodiesterase 3B</i>)	5' TGCCAAGCCCATACTCAGTG 3' 5' ACAGCTCCTGCCTCATGAAC 3'	101	XM_01701 9420.1
<i>PLIN2</i> (<i>perilipin 2</i>)	5' ATGAATCCCACTGTGCTGAG 3' 5' CCCGATCTTGAATGTTCTGTG 3'	135	NM_17441 7. 2
Gene Endógeno			
<i>GAPDH</i> (<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>)	5' CCACTCCCAACGTGTCTGTT 3' 5' GCTTCACCACTTCTTGATCTCATC 3'	84	NM_00103 4034.2

Fonte: Própria autoria.

2.2.8 Mensuração dos níveis intracelulares de GMPc

Os níveis de GMPc foram medidos pelo método de imunoensaio enzimático em oócitos e células do cumulus isoladamente. Pools de 50 CCOs foram selecionados tomando muito cuidado, de forma a selecionar CCOs de tamanhos semelhantes (BILODEAU e HAMM, 2007). Após a MIV, os oócitos foram desnudos e transferidos para

200 µL de HCl 0,1 N por 20 min para lisar as células. As células do cumulus recuperadas no processo de desnudamento, foram centrifugadas a 1000g por 10 min, em seguida, o sobrenadante foi descartado, e adicionado ao pellet, 200 µL de HCl 0,1 N por 20 min. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 12.000g por 5 min. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e armazenado a -20°C até ser analisado por imunoensaio de acordo com as instruções do kit (Direct Cyclic GMP EIA 1 Enzo Life Sciences, Ann Arbor, MI, EUA).

2.2.9 Análise Estatística

Os dados, referentes a pelo menos três a cinco replicatas de cada experimento, foram testados quanto à hipótese de distribuição normal e transformados para arcoseno (taxa de maturação) quando esses critérios não foram cumpridos. Em seguida, submetidos à análise estatística realizada através do software JMP 7.0 from SAS (SAS Institute), por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey. Todas as médias são apresentadas com seu erro padrão ($\pm$ EP) com 5% de nível de significância.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Efeito de diferentes concentrações de NPPB sobre a taxa de maturação, o teor de lipídios e expressão de *NPR1*, *NPR3* e da *PDE3B* em CCOs bovinos MIV.

2.3.1.1 Conteúdo lipídico dos oócitos

De acordo com os resultados apresentados na Figura 2 - A, a ativação da GCm através do NPPB resultou em oócitos com menor conteúdo lipídico, apresentando uma diminuição significativa nos oócitos maturados com a concentração de 10^{-7} M ($0,26 \text{ IF}/\mu\text{m}^2 \pm 0,01$) e 10^{-8} M ($0,29 \text{ IF}/\mu\text{m}^2 \pm 0,02$) quando comparados ao controle ($0,41 \text{ IF}/\mu\text{m}^2 \pm 0,07$, $P > 0,05$). A concentração de 10^{-6} M ($0,33 \text{ IF}/\mu\text{m}^2 \pm 0,01$ – $P > 0,05$) não foi capaz de reduzir o conteúdo lipídico em relação ao controle ($P > 0,05$). Para os experimentos seguintes, selecionamos a concentração de 10^{-7} M de NPPB para ser utilizada.

Figura 2: Estimativa do conteúdo lipídico * de oócitos bovinos oriundos de CCOs maturados *in vitro* por 24h na presença de diferentes concentrações de NPPB e corados por NR. Controle maturado sem a

presença da droga. A - Resultados referentes a 4 repetições. B – Imagem obtida através de microscopia de epifluorescência após marcação lipídica por NR.

*Colunas com letras diferentes apresentam diferença significativa ($P < 0,05$). Fonte: Própria autoria.

2.3.1.2 Maturação nuclear

Analisando os resultados observamos que a maturação nuclear (MII) não foi influenciada por nenhuma das concentrações de NPPB, variando de 82 a 87% MII para todos os grupos ($P > 0,05$). Conforme descrito na Tabela 2, o controle apresentou taxa de oócitos em metáfase II de 87% e os grupos NPPB 10^{-8} (82%), 10^{-7} (84,4%) e 10^{-6} M (83,4%) não diferiram do controle e nem entre si ($P > 0,05$), de forma que o NPPB não interferiu com a progressão da meiose oocitária nas concentrações testadas.

Tabela 2: Taxa de maturação nuclear* de oócitos submetidos à maturação *in vitro* por 24 horas na presença de diferentes concentrações de NPPB (estimulador de síntese de GMPC).

Tratamento	Oócitos (n)	Taxa de Maturação %MII $\pm$ EP
Controle	146	87,0 $\pm$ 1,2
NPPB 10^{-8}	117	82,0 $\pm$ 1,6
NPPB 10^{-7}	134	84,4 $\pm$ 0,9
NPPB 10^{-6}	127	83,6 $\pm$ 3,6

* Não houve diferença significativa ($P < 0,05$). Todas as médias estão apresentadas com seu erro padrão ($\pm$ EP) com 5% de nível de significância. Fonte: Própria autoria.

2.3.1.3 Expressão gênica nas células do cumulus

As CC dos CCOs maturados *in vitro* com as diferentes concentrações de NPPB foram avaliadas em relação à abundância de transcritos para os receptores de peptídeo natriurético (*NPR1* e *NPR3*) e da *PDE3B* e observou-se que a estimulação da GCm através do uso do NPPB não afetou a expressão de nenhum desses transcritos. De acordo com os resultados obtidos vimos então que o NPPB não afeta a expressão de seu receptor (*NPR1* – Figura 3 - A), nem do responsável pela sua degradação (*NPR3* – Figura 3 - B) ou do transcrito para a enzima que é inibida pelo GMPc (*PDE3B*)

Figura 3: Abundância relativa de transcritos para os dos receptores de peptídeo natriurético (*NPR1* - A e *NPR3* - B) e para *PDE3B* (C) em células do cumulus oriundas de CCOs maturados *in vitro* por 24h na presença de diferentes concentrações de NPPB. Resultados referentes a 5 repetições.

Fonte: Própria autoria.

A expressão da isoforma *PDE3B* em CC bovina ainda não havia sido relatada (Figura 3 – C). Esses resultados nos mostram que o NPPB não afeta a abundância dos transcritos de nenhum dos genes avaliados nas CC quando maturadas por 24 horas.

2.3.2 Efeito de diferentes estimuladores de síntese de GMPc sobre o teor de lipídios de oócitos e células do cumulus maturados *in vitro*.

2.3.2.1 Conteúdo lipídico de oócitos e células do cumulus em MIV por 9h e 24h

Nos oócitos maturados por 9 h na presença dos estimuladores de GMPc, o NPPB e a Protoporfirina IX, foram observados efeitos distintos em relação ao conteúdo lipídico mensurado. Os resultados (Tabela 3) mostraram que o NPPB novamente reduziu o conteúdo lipídicos dos oócitos ($3,09 \text{ IF}/\mu\text{m}^2$) quando comparado ao controle ($3,28 \text{ IF}/\mu\text{m}^2$, $P < 0,05$). Já a Protoporfirina IX aumentou o conteúdo lipídico no período de 9h ($3,80 \text{ IF}/\mu\text{m}^2$, $P < 0,05$). Esses resultados sugerem que diferentes formas de estimular a síntese de GMPc (GCm ou GCs) pode apresentar diferenças nos resultados dessa estimulação sobre o teor lipídico.

Tabela 3: Conteúdo lipídico (intensidade de fluorescência*) de oócitos bovinos oriundos de CCOs maturados *in vitro* por 9h na presença de diferentes estimuladores de GMPc e corados por NR.

Tratamento	Oócitos (n)	Conteúdo Lipídico $\text{IF}/\mu\text{m}^2 \pm \text{EP}$
Controle	127	$3,28 \pm 0,05^a$
NPPB 10^{-7} M	138	$3,09 \pm 0,04^b$
Proto 10^{-5} M	126	$3,80 \pm 0,05^c$

* Médias com letras diferentes apresentam diferença significativa ($P < 0,05$). Todas as médias estão apresentadas com seu erro padrão ($\text{IF}/\mu\text{m}^2 \pm \text{EP}$) com 5% de nível de significância. Fonte: Própria autoria.

Nas células do cumulus (Tabela 4), o conteúdo lipídico permaneceu semelhante ao controle ($0,018 \pm 0,003 \mu\text{m}^2$, $P > 0,05$) quando comparamos os grupos tratados com o NPPB ($0,019 \pm 0,003 \mu\text{m}^2$) e com a Protoporfirina IX ($0,016 \pm 0,001 \mu\text{m}^2$).

Tabela 4: Conteúdo lipídico de células do cumulus oriundas de CCOs bovinos maturados *in vitro* por 9h na presença de diferentes estimuladores de GMPc e corados por BP.

Tratamento	Oócitos (n)	Conteúdo Lipídico $\mu\text{m}^2 \pm \text{EP}$
Controle	56	0,018 $\pm$ 0,003
NPPB 10^{-7} M	56	0,019 $\pm$ 0,003
Proto 10^{-5} M	54	0,039 $\pm$ 0,018

*Todas as médias estão apresentadas com seu erro padrão ($\mu\text{m}^2 \pm \text{EP}$) com 5% de nível de significância. Fonte: Própria autoria.

Quando observamos os oócitos maturados por 24 h na presença dos estimuladores de GMPc, o NPPB foi o único grupo que apresentou diferença em relação ao controle (Tabela 5). Os resultados mostraram que o NPPB (3,01 IF/ μm^2) continuou mantendo o conteúdo lipídico dos oócitos (Figura 4) reduzido ao final da MIV em comparação ao controle (3,31 IF/ μm^2 , $P < 0,05$), porém, a Protoporfirina IX (3,34 IF/ μm^2) apesar de aumentar a quantidade de lipídio nas primeiras 9 h, se igualou ao controle (3,31 IF/ μm^2 , $P > 0,05$) ao final das 24h de maturação. Esses resultados sugerem que a síntese do GMPc, dependendo de como é estimulada, pode ocorrer de forma variável ao longo da maturação.

Tabela 5: Conteúdo lipídico (intensidade de fluorescência*) de oócitos bovinos oriundos de CCOs maturados *in vitro* por 24h na presença de diferentes estimuladores de GMPc e corados por NR.

Tratamento	Oócitos (n)	Conteúdo Lipídico IF/ $\mu\text{m}^2 \pm \text{EP}$
Controle	118	3,31 $\pm$ 0,06 ^a
NPPB 10^{-7} M	130	3,01 $\pm$ 0,07 ^b
Proto 10^{-5} M	134	3,34 $\pm$ 0,07 ^a

* Médias com letras diferentes apresentam diferença significativa ($P < 0,05$). Todas as médias estão apresentadas com seu erro padrão (IF/ $\mu\text{m}^2 \pm \text{EP}$) com 5% de nível de significância. Fonte: Própria autoria.

Figura 4: Comparação da estimativa do conteúdo lipídico* de oócitos oriundos de CCOs bovinos maturados *in vitro* por 9h e 24h na presença de diferentes estimuladores de síntese de GMPc. Controle maturado sem a presença da droga.

*Resultados referentes a 4 repetições. Fonte: Própria autoria.

Nas células do cumulus (Tabela 6) o conteúdo lipídico também foi reduzido no grupo tratado com NPPB ($0,008 \pm 0,001 \mu\text{m}^2$) por 24h quando comparamos ao controle ($0,018 \pm 0,002 \mu\text{m}^2$) e com a Protoporfirina IX ($0,02 \pm 0,006 \mu\text{m}^2$). Assim, é possível observar que ao final da maturação o oócito e as células do cumulus estão respondendo de forma semelhante ao estímulo de síntese de GMPc.

Tabela 6: Conteúdo lipídico* de células do cumulus oriundas de CCOs bovinos maturados *in vitro* por 24h na presença de diferentes estimuladores de GMPc e corados por BP.

Tratamento	Oócitos (n)	Conteúdo Lipídico $\mu\text{m}^2 \pm \text{EP}$
Controle	56	$0,019 \pm 0,002$
NPPB 10^{-7} M	56	$0,008 \pm 0,001$
Proto 10^{-5} M	54	$0,021 \pm 0,006$

*Todas as médias estão apresentadas com seu erro padrão ($\mu\text{m}^2 \pm \text{EP}$) com 5% de nível de significância. Fonte: Própria autoria.

2.3.2.2 Níveis intracelulares de GMPc nos oócitos e células do cumulus MIV por 9h

A quantificação dos níveis de GMPc presentes nos oócitos e células do cumulus após 9h de maturação *in vitro* na presença ou não dos estimuladores de síntese do nucleotídeo mostrou não haver efeito dos tratamentos variando de 0,007 a 0,008 fmol para oócito e 0,05 a 0,11 fmol para pools de células do cumulus. ($P>0.05$). Apesar de não haver diferença significativa nos oócitos (Figura 5 – A) e células do cumulus (Figura 5 – B), as células parecem responder de forma diferente à estimulação da síntese de GMPc. Nas células do cumulus, os grupos tratados mostram maior nível de GMPc, porém esse aumento não é significativo, possivelmente pela alta variabilidade dos dados.

Figura 5: Níveis intracelulares de GMPc* em oócitos e células do cumulus maturados *in vitro* por 9h na presença ou não (controle) dos estimuladores de síntese do nucleotídeo, NPPB e Protoporfirina IX.

*Resultados referentes a 5 repetições de oócitos e 4 repetições de células do cumulus. Fonte: Própria autoria.

2.3.2.4 Maturação nuclear

Os dois estimuladores de síntese de GMPc, o NPPB e a Protoporfirina IX, não influenciaram nas taxas de maturação oocitária quando adicionados o meio de maturação *in vitro* (Tabela 2). Os dados confirmam que a maturação final (24h) é afetada pela suplementação desses estimuladores de enzimas de síntese de GMPc (Tabela 7).

Tabela 7: Taxa de maturação nuclear* de oócitos submetidos à maturação *in vitro* por 24 horas na presença de diferentes estimuladores de síntese de GMPc.

Tratamento	Oócitos (n)	Taxa de Maturação %MII $\pm$ EP
Controle	106	85,2 $\pm$ 2,8
NPPB 10 ⁻⁷ M	103	78,0 $\pm$ 1,9
Protoporfirina 10 ⁻⁵ M	101	86,0 $\pm$ 2,7

* Médias com letras diferentes apresentam diferença significativa ($P < 0,05$). Todas as médias estão apresentadas com seu erro padrão ($\% \pm EP$) com 5% de nível de significância. Fonte: Própria autoria.

2.3.2.5 Expressão gênica nas células do cumulus

As CC dos CCOs maturados *in vitro* por 9h e 24h na presença dos estimuladores de síntese de GMPc foram avaliadas em relação à abundância de transcritos da *PLIN2* e da *PDE3B* e observou-se que a estimulação da GCs através do uso da Protoporfirina IX diminui ($P < 0,05$) a expressão da *PLIN2* nas primeiras 9h (Figura 6 – A) de maturação em comparação ao controle, enquanto a estimulação das GCm através do NPPB não afetou a abundância dos transcritos nas primeiras 9 horas ($P > 0,05$). Após a MIV completa, de 24h, o grupo tratado com a Protoporfirina IX apresentou aumento ($P < 0,05$) na expressão da *PLIN2* (Figura 6 – B) em relação ao controle e ao NPPB, que novamente se mativeram iguais ($P > 0,05$). A expressão da *PDE3B* não foi afetada por nenhum dos tratamentos em nenhum dos dois períodos avaliados ($P > 0,05$, Figura 6 – C e D), porém, novamente foi possível detectar sua expressão nas células do cumulus, o que ainda não havia sido relatado em nenhum estudo anterior.

Figura 6: Abundância relativa de transcritos* da *PLIN2* (A e B) e da *PDE3B* (C e D) em células do cumulus de CCOs bovinos maturados *in vitro* por 9h e 24h na presença dos estimuladores de síntese de GMPc.

*Resultados referentes a 6 replicatas. **Fonte: Própria autoria.**

2.3.3 Ação do GMPc pela via PKG em CCOs maturados durante 24h na presença de estimulador de síntese de GMPc (NPPB) associado ou não a inibidor da PKG.

2.3.3.1 Conteúdo lipídico de oócitos e células do cumulus em MIV por 24h

A fim de avaliar a participação da PKG na lipólise oocitária, adicionamos um inibidor dessa enzima ao meio de maturação, associando-o ou não ao estimulador de síntese de GMPc através das GCm, o NPPB. Quando observamos o conteúdo lipídicos dos oócitos (Tabela 8) em relação ao controle (3,82 IF/ μm^2), redução no grupo tratado com o NPPB (3,39 IF/ μm^2) não foi significativa ($P > 0,05$), como tínhamos observando nos experimentos anteriores; talvez essa diferença não tenha sido significativa pelo “n” avaliado neste experimento. Quando comparamos os grupos tratados com KT5823,

associado ou não ao NPPB, não houve efeito no conteúdo lipídico dos oócitos em relação ao controle ($P>0,05$), porém quando os comparamos com o grupo tratado apenas com o NPPB, notamos um aumento ($P<0,05$) tanto no grupo tratado com o NPPB + KT5823 ($4,34 \text{ IF}/\mu\text{m}^2$), quanto no grupo tratado apenas com o KT5823 ($4,25 \text{ IF}/\mu\text{m}^2$).

Tabela 8: Conteúdo lipídico (intensidade de fluorescência*) de oócitos bovinos oriundos de CCOs maturados *in vitro* por 24h na presença do estimulador de síntese de GMPc, o NPPB associado ou não ao inibidor da PKG, KT5823, corados por NR.

Tratamento	Oócitos (n)	Conteúdo Lipídico $\text{IF}/\mu\text{m}^2 \pm \text{EP}$
Controle	69	$3,82 \pm 2,0^{\text{ab}}$
NPPB 10^{-7}	71	$3,39 \pm 1,9^{\text{a}}$
KT5823 10^{-5}	64	$4,25 \pm 2,2^{\text{b}}$
NPPB + KT	67	$4,34 \pm 1,8^{\text{b}}$

* Médias com letras diferentes apresentam diferença significativa ($P<0,05$). Todas as médias estão apresentadas com seu erro padrão ($\text{IF}/\mu\text{m}^2 \pm \text{EP}$) com 5% de nível de significância. Fonte: Própria autoria.

Nas células do cumulus (Tabela 9) o conteúdo lipídico também não foi alterado pela manipulação farmacológica da síntese de GMPc e nem pela inibição da PKG. A redução lipídica no grupo tratado com NPPB, vista no experimento anterior, não foi identificada neste experimento quando comparado ao controle ($0,0031 \pm 0,0002 \mu\text{m}^2$ para os dois tratamentos). Além disso, os grupos suplementados com KT5823 associado ou não ao NPPB, também apresentaram valores próximos de intensidade de fluorescência ($0,0034 \pm 0,0002 \mu\text{m}^2$ e $0,0041 \pm 0,0003 \mu\text{m}^2$ respectivamente).

Tabela 9: Conteúdo lipídico de células do cumulus oriundas de CCOs bovinos maturados *in vitro* por 24h na presença de NPPB associado ou não ao KT5823 e corados por BP.

Tratamento	Oócitos (n)	Conteúdo Lipídico $\mu\text{m}^2 \pm \text{EP}$
Controle	56	$0,0031 \pm 0,0002$
NPPB 10^{-7} M	52	$0,0031 \pm 0,0002$
KT5823 10^{-5} M	54	$0,0034 \pm 0,0002$
NPPB + KT	58	$0,0041 \pm 0,0003$

*Todas as médias estão apresentadas com seu erro padrão ($\mu\text{m}^2 \pm \text{EP}$) com 5% de nível de significância. Fonte: Própria autoria.

2.3.3.2 Maturação nuclear

A tabela 10 mostra as taxas de maturação dos grupos tratados não só com o estimulador de GMPc, o NPPB, mas também os grupos tratados agora com KT5823, inibidor da PKG. Os resultados mostram que nenhum dos tratamentos influenciou negativamente a maturação oocitária quando comparado ao controle, de forma que esses tratamentos podem ser usados durante a MIV para estudar metabolismo lipídico sem prejuízos à maturação nuclear.

Tabela 10: Taxa de maturação nuclear* de oócitos submetidos à maturação *in vitro* por 24 horas na presença de diferentes estimuladores de síntese de GMPc.

Tratamento	Oócitos (n)	Taxa de Maturação %MII $\pm$ EP
Controle	82	84,5 $\pm$ 1,4 ^{ab}
NPPB 10 ⁻⁷	80	79,9 $\pm$ 0,8 ^{ab}
KT5823 10 ⁻⁵	81	80,5 $\pm$ 0,3 ^a
NPPB + KT	79	92,0 $\pm$ 1,2 ^b

* Todas as médias estão apresentadas com seu erro padrão (% $\pm$ EP) com 5% de nível de significância. Fonte: Própria autoria.

2.3.3.3 Expressão gênica nas células do cumulus

As CC dos CCOs maturados *in vitro* por 24h na presença do estimulador de síntese de GMPc associado ou não ao inibidor da PKG (KT5823), foram avaliadas em relação à abundância de transcritos da *PLIN2* e observou-se que nenhum dos tratamentos foi capaz de alterar a expressão desses transcritos ($P > 0,05$). Apesar do gráfico (Figura 7) apresentar uma tendência de aumento da expressão da *PLIN2*, há muita variação nos dados não sendo possível detectar diferença significativa entre os grupos.

Figura 7: Abundância relativa de transcritos da PLIN 2 em células do cumulus de CCOs bovinos maturados *in vitro* por 24h na presença do NPPB associado ou não ao inibidor da PKG, KT5823.

*Resultados referentes a 4 repetições. Fonte: Própria autoria.

2.4. DISCUSSÃO

Diante dos resultados obtidos é possível sugerir o envolvimento da via GMPc/PKG no metabolismo lipídico de CCOs bovinos, pois quando utilizamos estimuladores farmacológicos de diferentes enzimas de síntese desse nucleotídeo tivemos alterações significativas no conteúdo lipídico de oócitos e células do cumulus e sem efeitos adversos sobre a maturação nuclear.

Uma grande preocupação quando se manipula uma via metabólica da célula, são os efeitos que essa manipulação possa ter sobre outros processos celulares. O GMPc, quando sintetizado através do estímulo à Gcm ou GCs, resulta em ativação da PKG, que pode inibir a *PDE3B*, enzima de degradação específica do AMPc, fazendo com que os níveis desse nucleotídeo se mantenham elevados contribuindo para a lipólise (LOHMANN et al., 1997). Apesar de contribuir para a lipólise, altos níveis de AMPc podem afetar a maturação oocitária, pois para a retomada da meiose é necessária uma redução desses níveis (CONTI et al., 1998). O estímulo à síntese de GMPc através do uso dos peptídeos natriuréticos pode gerar efeito sobre a maturação oocitária, como foi observado com o uso do NPPC em camundongos (NORRIS et al., 2010; ZHANG et al., 2010) e bovinos (FRANCIOSI et al., 2014). No entanto, a estimulação da Gcm através

do NPPB, que estimula com mais afinidade o *NPR1*, não causou efeito na maturação nuclear dos oócitos, confirmando o que já havia sido mostrado em estudo comparando os efeitos de diferentes NPs na maturação de oócitos bovinos (CESARO et al., 2015).

A síntese de GMPc pode também ser estimulada através da ativação das GCs (LAFONTAN et al., 2008), através do uso da Protoporfirina IX (BILODEAU-GOESEEL, 2007). Estudo anterior observou que, apesar desse estimulador causar um atraso na retomada da meiose, ele não interfere na maturação final (SCHWARZ et al., 2014), corroborando o que observamos neste estudo, onde as taxas de maturação nuclear se mantiveram normais. Além do estímulo à síntese de GMPc, também manipulamos a via através de um inibidor da PKG (KT5823), o qual também não gerou efeitos sobre a maturação nuclear. O KT5823, não afetou a retomada da meiose em estudos anteriores a respeito da estimulação da via GMPc através do óxido nítrico (BILODEAU-GOESSELS, 2007), e embora não se tenha avaliado a maturação final, o presente estudo mostra que essa droga não prejudica a progressão completa da meiose. Assim, ficou demonstrado que esses agentes podem ser usados para estudos de metabolismo lipídico em CCOs, sem prejuízos à maturação nuclear do oócito. No entanto, não se pode descartar a possibilidade de efeitos sobre outros aspectos da maturação oocitária que devem ser considerados em estudos futuros.

Além da maturação oocitária, a manipulação da via GMPc/PKG, pode afetar a expressão de transcritos relacionados ao metabolismo lipídico. Em CCOs bovinos, já foi relatado que a maioria das enzimas relacionadas ao controle de GMPc estão expressas em oócitos e/ou células do cumulus (SCHWARZ et al., 2014). Avaliamos a expressão do receptor de peptídeos natriuréticos *NPR1* e *NPR3*. O *NPR1* é responsável pela síntese de GMPc, fazendo com que o nível do nucleotídeo se eleve na célula (HSUEH et al., 2018), já o *NPR3* é responsável pela degradação do ligante (POTTER et al., 2009). Estudos anteriores já mostravam a presença dos receptores *NPR1*, *NPR2* e *NPR3* em células do cumulus bovinas (CESARO et al., 2015), porém a variação da expressão desses receptores quando utilizado o NPPB não havia sido estudada. A expressão desses transcritos não foi alterada pelo uso do NPPB, de forma que seu uso não interfere com a expressão do seu receptor. Não há estudos que demonstrem o efeito dos NPs

sobre a expressão de seus receptores. Além dos NPRs avaliamos também a expressão da *PDE3B* nas células do cumulus. A *PDE3B* é responsável pela degradação de AMPc e é inibida pelo GMPc, sendo parte da sinalização de lipólise (ARMANI et al., 2011). O transcrito dessa enzima também não teve sua expressão afetada pelo tratamento e mostra que um dos alvos da via GMPc/PKG que pode afetar a lipólise está presente nas CC. A expressão da isoforma *PDE3B* em CC bovina ainda não havia sido relatada.

Outro transcrito avaliado foi a *PLIN2*, identificada em gotas lipídicas de CCOs de camundongos (YANG et. al, 2010) e em oócitos de bovinos (AARDEMA et al., 2011). A *PLIN2* é uma proteína pertencente à família das perilipinas, bastante estudadas em diferentes tipos celulares (BICKEL; TANSEY; WELTE, 2009). Ela é responsável pela translocação da HSL fosforilada para o interior da gota lipídica (ALI et al., 2005). A *PLIN2* foi considerada como um indicador do teor de lipídio celular em células do cumulus bovinas, onde quanto maior sua expressão, maior a quantidade de lipídios (LOLICATO et al., 2014). O estímulo à síntese de GMPc através do NPPB não afetou a expressão da *PLIN2* nas células do cumulus. Outro fator que poderia afetar a expressão da *PLIN2* foi a inibição da PKG através do uso do KT5823, porém seu uso também não afetou a expressão dessa perilipina.

Em relação ao conteúdo lipídico, diferentemente de resultados obtidos em estudo anterior (SCHEFER et al., 2016), neste, a Protoporfirina IX não foi capaz induzir menor conteúdo lipídico nos oócitos ao final na MIV (24h) e nem nas células do cumulus. Nas primeiras 9h de MIV houve apenas um aumento transitório do conteúdo lipídico somente nos oócitos. De toda forma, os presentes resultados indicam que a estimulação de GCm com Protoporfirina IX não é eficiente para redução do conteúdo lipídico de CCOs bovinos. Como o NPPB foi capaz de induzir redução de conteúdo lipídico em oócitos e células do cumulus, o tipo de enzima estimulada parece levar a resultados diferentes. Estudo com neurônios, mostrou que o GMPc pode atuar de forma distinta de acordo com sua síntese, que pode ocorrer em compartimentos específicos da célula (SHIDARA et al., 2017). A interferência do GMPc na estimulação da lipólise por NPs já foi estabelecida em adipócitos (LAFONTAN et al., 2008), e diante de nossos resultados parece ter sido mimetizada nos oócitos e células do cumulus que tiveram o conteúdo lipídico reduzido

com NPPB. Sabe-se que NPPB tem maior afinidade pelo receptor *NPR1*, identificado nas células do cumulus, porém não identificado em oócitos (CESARO et al, 2015). Assim, é possível que o NPPB atue através das células do cumulus, que estão em comunicação com o oócito nas primeiras horas da maturação (Del COLLADO et al, 2017). Nos resultados observados, vimos que nas primeiras 9h, o conteúdo lipídico dos oócitos já eram reduzidos quando comparados ao controle e se mantiveram até o fim da MIV (24h). Nas células do cumulus, essa diminuição foi identificada apenas após as 24h de MIV. A razão para esse observação é desconhecida, mas poderia se especular que o GMPc gerado nas células do cumulus aos serem estimuladas com NPPB, fluiria ao oócito através das junções comunicantes entre o oócito e a células do cumulus enquanto ainda há comunicação entre as células durante as primeiras horas de MIV (Del COLLADO et al., 2014). Após o fechamento da junções comunicantes após as 9 h de MIV com o encerramento da comunicação, os NPS agiriam apenas nas células do cumulus.

Como o NPPB manteve o conteúdo lipídico menor em relação ao controle, sugerimos que a síntese de GMPc quando estimulada pelos receptores de peptídeo natriurético (nessa caso especialmente por *NPR1*) é funcional para a redução do conteúdo lipídico dos oócitos durante a MIV, indicando a participação da via GMPc no metabolismo lipídico de CCOs bovinos. No entanto, quando avaliamos os níveis intracelulares de GMPc, estes não foram alterados quando quantificados nem mesmo quando estimulados com NPPB. Talvez as concentrações das drogas utilizadas não tenham sido suficientes para uma elevação dos níveis de GMPc. No entanto, foi constatado um efeito biológico com na redução lipídica no CCOs tratados com o NPPB, de forma que a variabilidade nos resultados de quantificação de GMPc talvez não tenham permitido detectar um efeito significativo. Além disso, a inibição da PKG com KT5823 associado ou não ao estimulador de GCm (NPPB), levou um aumento no teor de lipídios nos oócitos em comparação com aqueles tratados apenas com NPPB, indicando que a PKG também tem participação, mesmo que talvez parcial, no controle do metabolismo lipídico. Essas observações mostram que a manipulação da via GMPc/PKG tem potencial de uso para estudos em oócitos e possivelmente embriões, visando obter células com menor acúmulo lipídico e, possivelmente, melhor tolerância para a criopreservação. Mais

estudos são ainda necessários para melhor esclarecer a função dessa via no metabolismo lipídico de CCOs e embriões e também a sua provável interação com a via AMPc/PKA. .

2.5. CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem o envolvimento da via GMPc/PKG no metabolismo lipídico de oócitos e células do cumulus, participando, ao menos em parte, do controle do conteúdo lipídico celular. A expressão de transcritos para *PLIN2* não se constitui em um bom marcador de metabolismo lipídico que indique favorecimento ao acúmulo lipídico intracelular. Os transcritos de receptores de NPPB (*NPR1* e *NPR3*) e nem a enzima inibida por GMPc (*PDE3B*) são influenciadas por NPPB, não havendo um feedback negativo desse tratamento em nível transcricional em células do cumulus. A expressão de *PDE3B* nas células do cumulus é sugestiva de que o GMPc pode inibir essa enzima e provocar elevação de AMPc, permitindo uma interação das vias GMPc/PKG e AMPc/PKA nessas células. O uso de NPPB e de KT5823 não interfere na maturação nuclear podendo ser utilizados para estudos de metabolismo lipídico em oócitos e células do cumulus bovinas, ao menos em relação a esse parâmetro.

2.6 REFERÊNCIAS

- AARDEMA, H. et al. Oleic acid prevents detrimental effects of saturated fatty acids on bovine oocyte developmental competence. **Biology of reproduction**, v. 85, n. 1, p. 62–69, 2011.
- ABE, H. et al. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. **Mol Reprod Dev**, v. 61 (1), p 57-66, 2002.
- ALI, Y. BEN et al. Continuous monitoring of cholesterol oleate hydrolysis by hormone-sensitive lipase and other cholesterol esterases. **Journal of lipid research**, v. 46, p. 994–1000, 2005.
- ARMANI, A. et al. Phosphodiesterase type 5 (PDE5) in the adipocyte : a novel player in fat metabolism ? **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 22, n. 10, p. 404–411, 2011.

BICKEL, P. E.; TANSEY, J. T.; WELTE, M. A. PAT proteins , an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1791, n. 6, p. 419–440, 2009.

BILODEAU-GOESEEL S. Effects of manipulating the nitric oxide/cyclic GMP pathway on bovine oocyte meiotic resumption *in vitro*. **Theriogenology**, v. 68 (5), pag 693-701, 2007.

BILODEAU, M.L.; HAMM, H.E. Regulation of Protease-Activated Receptor (PAR) 1 and PAR4 Signaling in Human Platelets by Compartmentalized Cyclic Nucleotide Actions. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 322 (2), p. 778-788, 2007.

BULGARELLI, D. L. et al. Vitricification of bovine oocyte substantially impairs their reproductive capacity independently of maturation stage. **Fertility and Sterility** v. 98, n. 3, p. 118, 2012.

CESARO, M. P. DE et al. Natriuretic peptides stimulate oocyte meiotic resumption in bovine. **Animal Reproduction Science**, v. 159, p. 52–59, 2015.

CONTI, M. et al. Role of cyclic nucleotide phosphodiesterases in resumption of meiosis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 145, p. 9–14, 1998.

DEL COLLADO, M. et al. Efeitos da redução ou substituição do soro fetal bovino por outros compostos na maturação *in vitro* de oócitos bovinos. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 34(7), p. 689-694, 2014.

DEL COLLADO, M. et al. Fatty Acid Binding Protein 3 And Transzonal Projections Are Involved In Lipid Accumulation During *In Vitro* Maturation Of Bovine Oocytes. **Sci Rep.**, v. 7 (1), p. 2645, 2017.

FRANCIOSI, F. et al. Natriuretic Peptide Precursor C Delays Meiotic Resumption and Sustains Gap Junction-Mediated Communication in Bovine Cumulus-Enclosed Oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 91(3), p. 1-9, 2014.

HAJARIAN, H. et al. The presence of corpus luteum may have a negative impact on *in vitro* developmental competency of bovine oocytes. **Reproductive Biology**, v. 16, n. 1, p. 47–52, 2016.

HSUEH, A. J. W. et al. Intraovarian Control of Early Folliculogenesis. **Endocrine Reviews**, v. 36, p. 1–24, 2018.

KUHN, M. Structure, Regulation, and Function of Mammalian Membrane Guanylyl Cyclase Receptors, With a Focus on Guanylyl Cyclase-A. **Circulation Research**, v. 93, n. 8, p. 700–709, 2003.

KUNDU, C.N. et al. Development of a simple sperm cryopreservation model using a chemically defined medium and goat cauda epididymal spermatozoa. **Cryobiology**; v.40, p. 117-125, 2000.

LAFONTAN, M. et al. Control of lipolysis by natriuretic peptides and cyclic GMP. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 19, n. 4, p. 130–137, 2008.

LAFONTAN, M.; VIGUERIE, N. Role of adipokines in the control of energy metabolism: focus on adiponectin. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 6, n. 6, p. 580–585, 2006.

LANGIN, D. Control of fatty acid and glycerol release in adipose tissue lipolysis. **Comptes Rendus - Biologies**, v. 329, p. 598–607, 2006.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LOEWENSTEIN, J.E.; COHEN, A.I. Dry Mass, lipid content and protein os the intact and zona-free mouse ovum. *J Embryol Exp Morphol*, v. 12, p. 113-121, 1964.

LOHMANN, S. M. et al. Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 22, n. 8, p. 307–312, 1997.

LOLICATO, F. et al. The Cumulus Cell Layer Protects the Bovine Maturing Oocyte Against Fatty Acid-Induced Lipotoxicity. **Biology of Reproduction**, v. 92, n. 1, p. 1–16, 2014.

MASSIP, A. Cryopreservation of bovine oocytes: current status and recent developments. **Reprod Nutr Dev**, v. 43, p. 325-330, 2003.

MIYOSHI, H. et al. Adipose Triglyceride lipase regulates basal lipolysis and lipid droplet size in adipocytes. **J Cell Biochem.**, v. 105, p. 1430–1436, 2008.

NORRIS, R. P. et al. Epidermal growth factor receptor kinase activity is required for gap junction closure and for part of the decrease in ovarian follicle cGMP in response to LH. **Reproduction**, v. 140, p. 655–662, 2010.

POTTER, L. R. et al. Natriuretic Peptides : Their Structures , Receptors , Physiologic Functions and Therapeutic Applications. **Handbook of experimental pharmacology**, v. 191, p. 341–366, 2009.

RIZOS, D. et al. Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v. 62, p. 320–327, 2002.

RUMPF, R. Avanços metodológicos na produção *in vitro* de embriões. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 229–233, 2007.

SCHEFER, L. et al. Influência da via GMPc no conteúdo lipídico de oócitos bovinos maturados *in vitro*. **Anais da XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões**, p. 334, 2016.

SCHEFER, et. al. Influência do GMPc e suas vias de sinalização no perfil lipídico de

oócitos e embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Dados em preparação para publicação**, 2020

SCHWARZ, K. R. L. et al. Effect of nitric oxide on the cyclic guanosine monophosphate (cGMP) pathway during meiosis resumption in bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 81, p. 556–564, 2014.

SCHWARZ, K. R. L. et al. Effects of fetal calf serum on cGMP pathway and oocyte lipid metabolism *in vitro*. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, p. 1593–1601, 2016.

SCHWARZ, K. R. L. et al. The role of cGMP as a mediator of lipolysis in bovine oocytes and its effects on embryo development and cryopreservation. **PLoS ONE**, v. 13, n. 1, 2018.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reprod Fertil Dev**, v. 7, p. 871-891, 1995.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim Reprod Sci**, v. 60-61, p. 481-492, 2000.

YANG, X. et al. Identification of perilipin-2 as a lipid droplet protein regulated in oocytes during maturation, **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22 (8), p. 1262-1271, 2010.

ZHANG, M. et al. Granulosa Cell Ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. **Science**, v. 330, p. 366–369, 2010

Artigo 2

3. Artigo 2

Perfil lipídico de oócitos e embriões bovinos produzidos *in vitro* sob influência da manipulação farmacológica da síntese de GMPc através de espectrometria de massa MRM.

**Schefer, L.^A ; Naves, L.^B ; Ferreira, C.^C ; Da Silva, E. P.^B ; Sobreira, T. J.^C ;
Marchioretto P. V.^B ; Pasqual, B. M.^D ; Correa Jr, E. E.^D ; Leal, C. L. V.^A ; Rubessa, M.^B ;
Wheeler, M. B.^{B,E}.**

^A Departamento de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, Pirassununga SP, Brasil.

^B Department of Animal Sciences, University of Illinois, Urbana, IL, USA.

^C Bindley Bioscience Center, Purdue University, West Lafayette IN, USA.

^D Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

^E Department of Bioengineering, University of Illinois, Urbana, IL, USA.

RESUMO

Os lipídios exercem importante papel na regulação de propriedades físicas e funcionais das membranas biológicas, auxiliando nas interações intercelulares, proliferação e transporte celular, assim como também participam dos processos de sinalização intercelular. Alterações da composição lipídica nos oócitos e embriões produzidos *in vitro* são sugeridas como causas da dificuldade de criopreservação dessas células. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar o perfil lipídico de oócitos e embriões bovinos sob influência da estimulação de síntese de GMPc (nucleotídeo que pode estar envolvido com a lipólise oocitária) durante a maturação *in vitro* (MIV) por estimuladores específicos de GCs (Protoporfirina IX) e GCm (NPPB: peptídeo natriurético tipo B). Pools de CCOs foram maturados em meio base TCM199 suplementado com 15% de soro fetal

bovino (SFB) e 10^{-6} M NPPB ou 10^{-5} de Protoporfirina IX. Após 22h, parte dos oócitos foi coletada e lavada em metanol: água (v / v) 1: 3 e as amostras congeladas a -80° C, e a outra parte foi utilizada para fertilização *in vitro* com sêmen congelado. Os embriões foram cultivados em meio SOFaa suplementado com mio-inositol 2,7 mM/mL, piruvato 0,2 mM/mL, 2,0% BS, 5 mM BSA, 100 µg/mL sulfato de estreptomicina e 100 UI/mL de penicilina. Após 7 dias (D7), os blastocistos foram coletados, lavados em metanol: água (v / v) 1: 3 e congelados a -80° C. As amostras foram submetidas à extração lipídica e depois diluídas e analisadas por espectrometria de massa e o método MRM (por extenso). Os dados de quatro repetições/grupo foram normalizados e submetidos ao teste t e análise PCA pelo Metaboanalyst 4.0 com nível de significância de 5%. Para os oócitos, em relação aos 164 lipídios analisados, os resultados mostraram que o perfil lipídico não foi afetado quando utilizamos os estimuladores da síntese de GMPc, Protoporfirina IX e NPPB, mantendo o perfil das classes lipídicas similares aos controles. Nos embriões, o grupo tratado com a Protoporfirina IX não desenvolveu embriões. As taxas de clivagem e blastocisto para os grupos controle e NPPB foram avaliados não havendo diferenças (média de 61% de clivagem e 23% de blastocistos); $P > 0,05$). O perfil lipídico dos embriões não foi alterado quando comparado entre os grupos controle e NPPB. Em conclusão, estimuladores de síntese do GMPc durante a MIV não afetam a composição lipídica dos oócitos e dos embriões resultantes, mas dependendo do tipo de enzima estimulada podem prejudicar (Protoporfirina IX - GCs) ou não (NPPB - GCm) o desenvolvimento embrionário posterior..

Palavras-chave: Peptídeos Natriuréticos, Protoporfirina IX, espectrometria de massa, perfil lipídico.

3.1 INTRODUÇÃO

Os lipídios são importantes biomoléculas que possuem um papel estrutural na constituição de membranas biológicas, como fonte de energia (metabolismo energético) e na sinalização celular. Essas biomoléculas estão presentes nos oócitos e embriões bovinos e têm sido apontadas como um dos fatores que afetam a criopreservação dessas estruturas, devido ao maior acúmulo lipídico citoplasmático que ocorre na produção *in*

vitro (RIZOS et al., 2002). A membrana celular é constituída principalmente por fosfolípidios e alterações na sua composição podem ser sugeridas como o motivo de danos causados durante o processo de criopreservação (KUNDU et al., 2000; WATSON, 1995; WATSON, 2000). Esses danos fazem com que parte das células preservadas percam sua viabilidade e sua capacidade reprodutiva (MASSIP, 2003; BULGARELLI et al. 2012. Fosfatidilcolinas (PC) e esfingomielinas (SM) constituem mais de 50% da membrana e exercem diversos papéis na estrutura, regulação de proteínas, atuando como lípidios estruturais e bioativos (HANNUN e OBEID, 2008).

Estudos a respeito do metabolismo lipídico de CCOs bovinos são escassos e por isso a importância de investigar os mecanismos envolvidos nas principais ações metabólicas. O metabolismo de lípidios inclui atividades lipogênicas (síntese, captação e acúmulo de lípidios) e ações lipolíticas (REF). As atividades lipolíticas envolvem ações que resultam na hidrólise dos TAG, que são os lípidios mais abundantes na natureza, resultando em ácidos graxos e glicerol. Os TAGs têm como principal função a reserva energética, a qual é essencial durante a maturação *in vitro*, onde ocorre a síntese proteica, retomada da meiose e maturação citoplasmática (FERGUSON e LEESE, 1999; KIM et al., 2001). O acúmulo desses lípidios no citoplasma dos oócitos e embriões também é apontado como um dos fatores que prejudicam a criopreservação (ABE et al., 2002). Além disso, esse acúmulo pode ocorrer pela suplementação do soro fetal bovino (SFB) durante o processo de PIV, pois embriões cultivados em meios sem SFB possuem maior criotolerância (ABE et al., 2002).

A hidrólise dos TAGs em ácidos graxos e glicerol ocorre classicamente através da síntese de adenosina monofosfato cíclico (AMPc), que ativando a proteína cinase dependente de AMPc (PKA), esta fosforila as proteínas relacionadas à lipólise, como a enzima lipase sensível ao hormônio (HSL) (LANGIN, 2006). Em adipócitos humanos, observou-se que o monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), produzido por meio de estímulos às guanilato ciclases de membrana (GCm) gerados por peptídeos natriuréticos (NPs), ativa a proteína cinase dependente de GMPc (PKG), que fosforila a mesma lipase importante no processo lipolítico (LAFONTAN et al., 2008). Essa via tem sido investigada em CCOs bovinos e a maioria das enzimas envolvidas no controle dos níveis

intracelulares desse nucleotídeo (GMPc), seus alvos ou relacionadas ao metabolismo lipídico, são expressas em oócitos e células do cumulus (SCHWARZ et al., 2014). A estimulação de síntese da GMPc através das guanilato ciclases (GCs), foi capaz de reduzir o conteúdo lipídico de oócitos MIV (SCHEFER, et al. 2016). Além disso, outro estudo mostrou que a manipulação da síntese de GMPc por GCm pela suplementação de peptídeo natriurético tipo B (NPPB) durante a maturação *in vitro* resultou em oócitos com menor conteúdo lipídico que também foi reduzido nas células do cumulus (SCHEFER, et al 2020, dados ainda não publicados). Além disso, já havia sido observado que a manipulação dos níveis de GMPc através de um inibidor da sua enzima de degradação (PDE5), também causou uma diminuição do conteúdo lipídico nos oócitos bovinos (SCHWARZ et al., 2018).

Assim, neste trabalho, objetivamos avaliar o perfil lipídico de oócitos e embriões bovinos produzidos *in vitro*, a fim de verificar se a manipulação de uma via que pode estar envolvida o processo de lipólise oocitária, pode afetar a composição lipídica dessas estruturas.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido no Laboratory of Reproductive Biology & Tissue Engineering (UIUC) – EUA, na fazenda Chessie Creek, em Walterboro, Carolina do Sul – EUA e as análises por espectrometria de massa foram realizadas no Bindley Center, Purdue University, Indiana – EUA. Todos os reagentes utilizados foram adquiridos da Sigma (St. Louis, Missouri - EUA), quando não, estão especificados no texto.

3.2.1 Delineamento Experimental

O estudo foi dividido em dois experimentos com o objetivo de avaliar o perfil lipídico de oócitos e blastocistos produzidos *in vitro* sob efeito de estimuladores de diferentes enzimas de síntese do GMPc. No primeiro experimento, CCOs provenientes de aspiração *in vivo* (OPU) foram maturados por 24h em meio MIV (TCM199) suplementado ou não com estimuladores de síntese de GMPc (NPPB e Protoporfirina). Ao fim da maturação, oócitos desnudos foram submetidos a protocolo de extração e análise do perfil lipídico por espectrometria de massa. No segundo experimento, blastocistos

provenientes de CCOs maturados *in vitro* nas mesmas condições do experimento anterior, fertilizados e cultivados por 7 dias em meio CIV (SOFaa). Durante o cultivo foram coletados dados de taxas de clivagem e blastocisto e ao fim do D7 os blastocistos foram submetidos a extração de lipídios e análise do perfil lipídico por espectrometria de massa.

3.2.2 Coleta de CCOs

Os CCOs foram coletados por aspiração folicular *in vivo* (OPU). Durante a aspiração, todo o conteúdo aspirado foi depositado em um tubo de 50 ml e em seguida filtrado através de um filtro de coleta de embriões. Após a filtração, os CCOs presos no filtro foram recuperados e selecionados em uma placa de cultura em lupa. Oócitos desnudos e degenerados foram descartados.

3.2.3 Maturação *in vitro*

Para a maturação *in vitro* (MIV), os CCOs foram lavados e cultivados em meio de maturação (TCM199) com SFB a 15%, 0,5 µg/mL de FSH, 5 µg/mL de LH, 0,8 mM de L-glutamina e 50 g/mL gentamicina. Para os experimentos, drogas específicas para induzir a síntese de cGMP [Protoporfirina IX (10^{-5} M - Enzo Life Sciences, Código: 89150-956) ou Peptídeo Natriurético tipo B (10^{-7} M - GenScript, Código: 133448-20-1) foram suplementados ao meio MIV. Grupos de até 40 CCOs foram distribuídos aleatoriamente em tubos de cultivo (WTA, Código: 21315) contendo 300 µL de meio de maturação e incubados a 38°C e 5% de CO₂ em ar e umidade máxima por 22 - 24h.

3.2.4 Fertilização *in vitro* e cultivo de embriões

Para a produção de embriões *in vitro*, os CCOs maturados foram transferidos para gotas de 50 µL (20 CCOs por gota) do meio de fertilização, o Tyrode's–albumin–lactate–pyruvate (TALP, PARRISH et al., 1988), coberto com óleo mineral. O meio TALP foi suplementado com 6 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), 5,3 UI/mL de heparina, 30 µM de penicilamina, 15 µM de hipotaurina e 1 µM de adrenalina. O sêmen foi processado em Bovipure (BP-100, Nidacon - Suécia) com gradiente de 45% e 90%. O sêmen foi descongelado por 30 segundos a 37°C, colocado no topo do gradiente e centrifugado por 5 minutos a 10.300 rpm. Após a remoção do sobrenadante, 1 ml de

meio TALP foi adicionado ao sedimento e o sêmen foi centrifugado por mais 5 minutos a 1.000 rpm. Os espermatozoides foram adicionados à gota de fertilização a uma concentração de 2×10^6 espermatozoides/ml. Os CCOs e espermatozoides foram incubados a 37°C em uma atmosfera contendo 5% de CO₂ e 6% de O₂ (câmara incubadora) por 22 h. Após esse período, os zigotos foram pipetados repetidamente com cuidado e transferidos para gotas de 100 µL de meio de cultivo sob óleo mineral (20 zigotos por gota) e cultivados nas mesmas condições da fertilização *in vitro*. O meio de cultivo foi fluido oviduto sintético com aminoácidos (SOFaa, HOLM et al., 1999) suplementado com mio-inositol 2,7 mM/mL, piruvato 0,2 mM/mL, 2,0% BS, 5 mM BSA, 100 µg/mL sulfato de estreptomicina e 100 UI/mL de penicilina. Após 96 h de cultivo (D4), a clivagem foi verificada e os embriões não clivados foram descartados. Os embriões restantes foram cultivados até o dia sete (D7). As taxas de desenvolvimento de clivagem e blastocisto foram determinadas no D4 e D7 da cultura, respectivamente.

3.2.5 Análises do perfil lipídico por Multiple Reaction Monitoring – Mass Spectrometry (MRM-MS)

Preparação da amostra

Após a MIV e CIV, nos experimentos 1 e 2 respectivamente, as amostras de oócitos e embriões foram armazenadas em microtubos contendo 10 µL de uma solução aquosa de metanol a 25% a -80° C até o dia da análise. A extração lipídica foi realizada de acordo com De Lima et al. (2018) (protocolo de Bligh e Dyer modificado, 1959). Inicialmente, 40 µL de água ultrapura foram adicionados ao microtubo contendo os oócitos ou embriões e a mistura foi suavemente misturada para promover a lise celular. Em seguida, foram adicionados 50 µL de clorofórmio e 90 µL de metanol, misturados por pipetagem por 15 segundos (solução monofásica) e as amostras foram incubadas por 15 min a 4°C. Em seguida, foram adicionados outros 50 µL de clorofórmio e 50 µL de água ultrapura. As amostras foram então centrifugadas a 800 × g por 5 min para melhorar a separação de fase polar da não polar (solução bifásica). Em seguida, 80 µL da fase não polar (clorofórmio) e 80 µL da fase polar (metanol: água) foram combinados em um novo microtubo. Este procedimento destina-se a deixar a proteína precipitada (entre as camadas orgânica e não orgânica) para trás. As fases orgânica e aquosa combinadas

foram secas em uma centrífuga evaporadora a vácuo e armazenadas a -80° C até a análise por MRM-MS.

No dia da análise, 25 µl de solvente (ACN + MeOH + NH₄Ac 300mM) contendo um padrão para lipídios (EquiSPLASH™ LIPIDOMIX® Quantitative Mass Spec Internal Standard – 330731 Avanti®) foi adicionado ao tubo congelado. Os tubos foram mantidos por 10 minutos. Após esse período, o volume foi homogeneizado com pipeta e transferido para tubos específicos para espectrometria de massa.

Análise do Perfil Lipídico por MRM-MS

Os tubos contendo as amostras foram colocados no espectrômetro de massa (EM) Agilent 6410 QQQ (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). Oito microlitros por amostra/método foram injetados na fonte ESI de um espectrômetro de massa usando um micro amostrador automático (G1377A). A janela de seleção do íon precursor foi de 0,7 Th. A bomba capilar conectada ao amostrador automático operava com um fluxo de 20 µL/min e uma pressão de 150 bar. A voltagem capilar no instrumento foi de 3,5 a 5 kV e o fluxo de gás foi de 5,1 L/min a 300° C. Dois métodos de MRM descritos anteriormente (DE LIMA et al. 2018) foram utilizados para adquirir os perfis lipídicos. Cada método de ensaio inclui diferentes tipos de lipídios a serem identificados. Após a atribuição, apenas os valores de m/z que eram claramente distintos do nível de ruído nos espectros foram incluídos na análise de componentes principais (PCA).

3.2.6 Análise Estatística

Os dados brutos do EM foram processados usando um script interno e as listas contendo transições MRM e os respectivos valores de intensidade de íons foram exportados para o Microsoft Excel. A intensidade absoluta de íons de todas as transições monitoradas foi comparada com amostras em branco. As intensidades iônicas de todos os MRMs foram recuperadas, normalizadas e submetidas à análise estatística. A análise dos dados usando abundância relativa de íons foi realizada usando o Metaboanalyst 4.0 (<http://www.metaboanalyst.ca>) para estatísticas uni variadas e multivariadas pelo PCA. Os dados de quatro repetições / experimento foram testados quanto à distribuição normal e homogeneidade de variância e submetidos à análise de variância (ANOVA) no 7.0 JMP

Software from SAS (SAS Institute). Os dados referentes às taxas de clivagem e blastocisto também foram submetidos à ANOVA. Diferenças com probabilidades de $p < 0,05$ foram consideradas significativas.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Efeitos da estimulação de síntese de GMPc durante a MIV no perfil lipídico em oócitos bovinos por EM.

No primeiro experimento foi proposto avaliar o efeito de diferentes intensificadores da síntese de GMPc no perfil lipídico de oócitos de CCOs bovinos maturados *in vitro*. Quatro repetições por grupo de oócitos foram submetidas a análise. Os resultados de 164 lipídios analisados (2 métodos – De Lima et al., 2018) mostraram que o perfil lipídico não foi afetado quando utilizamos os estimuladores de síntese de GMPc, Protoporfirina IX (GCs) e NPPB (GCm), mantendo o perfil lipídico semelhante entre os grupos controle e os tratamentos (Figuras 8, 9 e 10).

Figura 8: Lipídios identificados na análise por espectrometria de massa e selecionados por gráfico ANOVA com valor de p limiar 0,05. Foram utilizados dois métodos expostos, respectivamente, nos gráficos 1 e 2 desta figura*.

*A mesma cor mostra que não há diferença significativa. Fonte: Própria autoria.

Figura 9: Gráficos de pontuação em pares entre os PCs selecionados para oócitos (Controle, Protoporfirina IX e NPPB). A variação explicada de cada PC é mostrada na célula diagonal correspondente. Foram utilizados dois métodos expostos, respectivamente, nos gráficos 1 e 2 desta figura.

Fonte: Própria autoria.

Figura 10: Gráfico de escores entre os PCs selecionados para oócitos (Controle, Protoporfirina IX e NPPB). As variações explicadas são mostradas entre colchetes. Foram utilizados dois métodos expostos, respectivamente, nos gráficos 1 e 2 desta figura.

Fonte: Própria autoria.

Além disso, vimos que os valores quantitativos (Tabela 11) das principais classes lipídicas, esfingomiélin (SM), triglicerídeos (TAG) e fosfolípidios (PC, PS, PE, PG, PI) não são alterados significativamente nos grupos tratados.

Tabela 11: Valores de intensidade absoluta de lipídios identificados pelos métodos de MRM – MS.

Classes Lipídicas	Controle ng/oócito	10⁻⁷ M NPPB ng/oócito	10⁻⁵ M Protoporfirina IX ng/oócito
SM	0.89	0.86	1.12
PC	5.63	5.66	6.90
TAG	7.34	6.48	7.89
PS	209.0	244.0	207.4
PE	3.05	3.0	2.35
PG	3.40	3.34	3.29
PI	3.47	3.52	3.51

Fonte: Própria autoria.

3.3.2 Efeitos da estimulação de síntese de GMPc durante a MIV no perfil lipídico embrionário por EM.

Em relação ao desenvolvimento embrionário após fertilização *in vitro* e CIV de oócitos maturados com Protoporfirina IX e NPPB, o grupo controle e o NPPB apresentaram taxas de clivagem e blastocisto semelhantes ($P > 0,05$), que estavam dentro da faixa normal para produção *in vitro* em bovinos (Tabela 12). Por outro lado, para o grupo Protoporfirina IX, não ocorreu desenvolvimento de clivagem ou blastocisto (Tabela 2), apesar de haver espermatozoides vivos no dia da transferência para o cultivo (D2).

Tabela 12: Taxas de clivagem e blastocisto da produção de embriões *in vitro*. As taxas de clivagem e blastocisto foram calculadas a partir no número de CCOs sujeitos à maturação *in vitro*.

Grupo	Oócitos (n)	% clivagem	% blastocistos
Controle	80	61	24
10^{-5} Protoporfirina IX	81	0	0
10^{-7} NPPB	88	61	22

Fonte: Própria autoria.

Quando analisamos o perfil lipídico dos embriões gerados a partir oócitos maturados *in vitro* na presença dos estimuladores de síntese de GMPc, para os grupos controle e NPPB, identificamos 164 lipídios analisados que mostraram que o perfil lipídico não foi afetado nos embriões resultantes, mantendo um perfil lipídico semelhante no controle e tratamento (Figuras 11 e 12). Como mencionado acima, o grupo tratado com Protoporfirina IX não foi capaz de clivar e ter desenvolvimento embrionário após a fertilização *in vitro*, portanto, não podendo ser analisado.

Figura 11: Gráficos de pontuação em pares entre os PCs selecionados para oócitos (Controle e NPPB). A variação explicada de cada PC é mostrada na célula diagonal correspondente. Foram utilizados dois métodos expostos respectivamente nos gráficos 1 e 2 desta figura.

Fonte: Própria autoria.

Figura 12: Gráfico de escores entre os PCs selecionados para oócitos (Controle e NPPB). As variações explicadas são mostradas entre colchetes. Foram utilizados dois métodos expostos respectivamente nos gráficos 1 e 2 desta figura.

Fonte: Própria autoria.

Quando analisamos os valores quantitativos (Figura 13), observamos uma diminuição, mas não significativa, nas classes lipídicas de esfingomiélin (SM), fosfatidilcolina (PC) e triacilglicerol (TAG).

Figura 13: Gráficos comparativos dos valores de intensidade absoluta entre os grupos estudados para as classes lipídicas SM, PC e TAG.

Os valores para cada classe de controle e NPPB, respectivamente, foram 0,70 e 0,64 ng / blastocisto para MS, 6,45 e 6,07 ng / blastocisto para PC e 11,82 e 10,51 ng / blastocisto para TAG ($P < 0,05$).

3.4 DISCUSSÃO

No presente estudo, os resultados mostraram que a manipulação farmacológica da via de GMPc não interfere no perfil lipídico dos oócitos e a quantidade desses lipídios por classe não é afetada pela síntese de GMPc quando estimulada pela Protoporfirina IX (GCs) e NPPB (GCM). Os embriões resultantes dos oócitos tratados também não têm alteração de perfil lipídico, mas o desenvolvimento embrionário pode ser prejudicado a depender do tipo de estímulo utilizado durante a MIV.

Os lipídios são importantes fontes de energia para o oócito e embrião, mas o excesso de energia pode levar a uma alteração no metabolismo lipídico, levando ao acúmulo de lipídios nos oócitos e embriões, o que tem sido relacionado ao comprometimento do potencial de desenvolvimento (ABE et al. 2002). Apesar da importância de entender o metabolismo lipídico para melhorar a qualidade de oócitos e embriões, existem poucos estudos mostrando as vias de sinalização do metabolismo lipídico e as consequências da manipulação farmacológica dessa via no conteúdo lipídico de oócitos ou embriões.

Em relação à Protoporfirina IX, não foram detectados efeitos no conteúdo ou no perfil lipídico nos oócitos maturados, embora tenhamos observado anteriormente uma diminuição de conteúdo lipídico usando a coloração Nile Red (SCHEFER et al., 2016). A lipólise foi afetada positivamente quando a síntese de GMPc foi estimulada pela Protoporfirina IX e esse efeito foi revertido com a inibição da PKG, sugerindo uma importância da atividade da PKG no processo (SCHEFER et al., 2016).

Dado o efeito dos NPs nos adipócitos, esperávamos que o NPPB levasse a uma redução no conteúdo lipídico dos oócitos bovinos. Entretanto, a interferência do GMPc na estimulação da lipólise por NPs estabelecida em adipócitos (LAFONTAN et al., 2008), não foi observada nos oócitos. No presente estudo, o conteúdo lipídico e o perfil lipídico de oócitos maturados na presença de NPPB não foram alterados. Em um estudo anterior (SCHEFER et al., 2020, dados ainda não publicados) em oócitos bovinos maturados com NPPB, encontramos uma diminuição no conteúdo lipídico, embora usando também coloração com Nile Red como mencionado acima com a Protoporfirina IX.

De qualquer maneira, resultados obtidos em estudos anteriores, onde a manipulação farmacológica dessa via levou a alterações nos níveis de GMPc e também a uma redução no conteúdo lipídico, mas usando diferentes agentes para aumentar os níveis de GMPc (sildenafil para inibição da PDE5, SCHWARZ et al, 2018), sugerem que a via precisa ser mais estudada, estimulando e inibindo seus principais componentes para identificar qual mecanismo pode estar influenciando o conteúdo lipídico dos oócitos.

A alteração das condições básicas de maturação pode afetar significativamente a competência oocitária, refletindo na produção de clivagens e no desenvolvimento embrionário após a fertilização *in vitro* (ROSE e BAVISTER, 1992). Sabe-se que níveis elevados de AMPc estão envolvidos na manutenção de oócitos em vesícula germinativa (VG) e sua redução é necessária para a retomada da meiose (CONTI et al., 1998). Também foi relatado que o GMPc tem um efeito semelhante em roedores, onde níveis elevados mantêm oócitos no primeiro bloqueio meiótico da VG por inibição de PDE3A, mantendo, assim, também um AMPc elevado, impedindo a retomada da meiose. Em SCHEFER et al. (2020 – dados ainda não publicados), observamos que o NPPB não interfere com a progressão meiótica, mas seu efeito posterior no desenvolvimento

embrionário não foi anteriormente investigado, sendo este o primeiro estudo nesse sentido. Nossos resultados mostraram que o desenvolvimento embrionário ocorreu em proporções normais e não diferiram do grupo controle não tratado. Assim, o uso de NPPB é possível para estudos do metabolismo lipídico sem causar alterações na maturação nuclear e nem no subsequente desenvolvimento embrionário.

Um resultado diferente, no entanto, foi observado para a Protoporfirina IX. A falta de desenvolvimento nesse grupo pode ser devida aos efeitos negativos da droga na maturação de oócitos. Um estudo anterior mostrou que, embora a Protoporfirina IX possa causar um atraso na retomada da meiose (SCHWARZ et al. 2014), ela não interfere na maturação final dos oócitos (SCHWARZ et al. 2014). Em outro estudo, os oócitos maturados com este tratamento apresentaram taxas de maturação normais em comparação aos controles (SCHEFER et al. 2016; SCHEFER et al., 2020 – dados ainda não publicados.). Embora pareça que a maturação nuclear não seja afetada adversamente pela Protoporfirina IX nas concentrações utilizadas, os efeitos na maturação citoplasmática são desconhecidos. Não há estudos mostrando os efeitos da Protoporfirina IX no desenvolvimento embrionário subsequente. Portanto, é possível que no presente estudo tenhamos observado efeitos negativos do tratamento no oócito, o que prejudicou seu desenvolvimento subsequente. Sob as condições testadas, esse tratamento seria inadequado para estudos de metabolismo lipídico em oócitos.

Quando observamos o perfil lipídico dos embriões que se desenvolveram, dos grupos controle e NPPB, não foi possível detectar diferenças. Mesmo sem apresentar diferenças nos lipídios, as taxas de produção foram consideradas normais, permitindo ainda o uso desse estimulador de GCm no estudo da via GMPc/PKG no metabolismo lipídico a PIV. Dados os resultados observados nas condições estudadas, não podemos afirmar o envolvimento da via com o metabolismo lipídico que implique em efeitos sobre o perfil de lipídios em oócitos e dos embriões resultantes dos oócitos tratados, mas podemos inferir que a manipulação da via não está influenciando negativamente a produção *in vitro*. Estudos adicionais devem ser conduzidos para obter mais conhecimento relativo ao envolvimento dessa via com o metabolismo lipídico dos CCOs bovinos e, futuramente, em embriões bovinos.

3.5 CONCLUSÃO

O estudo demonstra que a manipulação farmacológica de um nucleotídeo que pode estar envolvido ao metabolismo lipídico de CCOs e embriões bovinos, não altera o perfil lipídico dessas estruturas. Embora estudos anteriores indiquem a redução lipídica a partir do uso do NPPB na maturação *in vitro*, a composição desses lipídios não é afetada por essa suplementação. Além disso, a composição lipídica dos embriões provenientes desses CCOs, também não tem seu perfil lipídico alterado. A manipulação de uma via metabólica pode gerar grandes alterações na célula, não apenas no conteúdo e perfil lipídico. O uso da Protoporfirina IX, afetou o desenvolvimento embrionário subsequente de oócitos maturados na sua presença, sugerindo que esse estimulador pode afetar a maturação citoplasmática e molecular.

3.6 REFERÊNCIAS

- AARDEMA, H. et al. Oleic Acid Prevents Detrimental Effects of Saturated Fatty Acids on Bovine Oocyte Developmental Competence. **Biology of Reproduction**, v. 85, p 62-69, 2011.
- ABE, H. et al. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. **Mol Reprod Dev**, v. 61 (1), p 57-66, 2002.
- BILODEAU-GOESEELS, S. Effects of manipulating the nitric oxide/cyclic GMP pathway on bovine oocyte meiotic resumption *in vitro*. **Theriogenology**, v 68, p 693–701, 2007.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911–917, 1959.
- BULGARELLI, D. L. et al. Vitriification of bovine oocyte substantially impairs their reproductive capacity independently of maturation stage. **Fertility and Sterility** v. 98, n. 3, p. 118, 2012.
- CESARO, M. P. DE et al. Natriuretic peptides stimulate oocyte meiotic resumption in bovine. **Animal Reproduction Science**, v. 159, p. 52–59, 2015.
- CONTI, M. et al. Role of cyclic nucleotide phosphodiesterases in resumption of meiosis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 145, p. 9–14, 1998.
- De LIMA C. B. et al. Comprehensive lipid profiling of early stage oocytes and embryos by MRM profiling. **J Mass Spectrom**, v. 53, p 1247-1252, 2018.

- DEGERMAN, E. et al. Phosphorylation and activation of hormone-sensitive adipocyte phosphodiesterase type 3B. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 14, n. 1, p. 43–53, 1998.
- DEL COLLADO, M. et al. Fatty Acid Binding Protein 3 And Transzonal Projections Are Involved In Lipid Accumulation During *In Vitro* Maturation Of Bovine Oocytes. **Scientific Reports**, v. 7, p. 2645, 2017, 2017.
- FERGUSON, E.M.; LEESE H.J. Triglyceride contente of bovine oocytes and early embryos. **J Reprod Ferti**, v. 116, p. 7373-378, 1999.
- HANNUN, Y.A.; OBEID, L.M. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9(2), p. 139-150, 2008.
- HOLM, P. et al. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. **Theriogenology**, v. 52(4), p. 683-700, 1999.
- HSUEH, A.J., KAWAMURA, K., CHENG, Y., FAUSER, B.C. Intraovarian con-trol of early folliculogenesis. **Endocr. Rev.** 36, 1–24, 2015.
- KASS, D. A. et al. Phosphodiesterase regulation of nitric oxide signaling. **Cardiovascular Research**, v. 75, n. 2, p. 303–314, 2007.
- KIM, J.Y. et al. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and in vitro matures bovine oocytes. **Reproduction**, v. 122, p. 131-138, 2001.
- KUHN, M. Structure, Regulation, and Function of Mammalian Membrane Guanylyl Cyclase Receptors, With a Focus on Guanylyl Cyclase-A. **Circulation Research**, v. 93, n. 8, p. 700–709, 2003.
- KUNDU, C.N. et al. Development of a simple sperm cryopreservation model using a chemically defined medium and goat cauda epididymal spermatozoa. **Cryobiology**; v.40, p. 117-125, 2000.
- LAFONTAN, M. et al. Control of lipolysis by natriuretic peptides and cyclic GMP. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 19, n. 4, p. 130–137, 2008.
- LAFONTAN, M.; VIGUERIE, N. Role of adipokines in the control of energy metabolism: focus on adiponectin. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 6, n. 6, p. 580–585, 2006.
- LANGIN, D. Control of fatty acid and glycerol release in adipose tissue lipolysis. **Comptes Rendus - Biologies**, v. 329, n. 8, p. 598–607, 2006.
- LOHMANN, S. M. et al. Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 22, n. 8, p. 307–312, 1997.
- MASSIP, A. Cryopreservation of bovine oocytes: current status and recent developments. **Reprod Nutr Dev**, v. 43, p. 325-330, 2003.
- NORRIS, R. P. et al. Epidermal growth factor receptor kinase activity is required for gap junction closure and for part of the decrease in ovarian follicle cGMP in response to LH. **Reproduction**, v. 140, p. 655–662, 2010.

PARRISH, J. J. et al. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biology of reproduction**, v. 38, p. 1171–1180, 1988.

PHILLIPS, M. C.; JOHSON, W. J.; ROTHBLAT, G. H. Mechanismos and consequences of cellular cholesterol exchange and transfer. **Biochim Biophys, Acta** 906, p. 223-276, 1987.

POTTER, L. R. et al. Natriuretic peptides: Their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications. **Handbook of experimental pharmacology**, v. 191, p. 341-366, 2009.

RIZOS, D. et al. Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v. 62, n. 3, p. 320–327, 2002.

ROSE, T. A. and BAVISTER, B. D. Effect of oocyte maturation medium on *in vitro* development of *in vitro* fertilized bovine embryos. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 31, p. 72–77, 1992.

RUMPF, R. Avanços metodológicos na produção *in vitro* de embriões Methodological advances on *in vitro* embryo production. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 229–233, 2007.

SCHEFER, L. et al. Influência da via GMPc no conteúdo lipídico de oócitos bovinos maturados *in vitro*. In: **XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões**, p. 334-335, 2016.

SCHEFER, L. et al. Efeitos da manipulação de síntese do GMPc e suas vias de sinalização no conteúdo lipídico de complexos cumulus-oócitos bovinos maturados *in vitro*. **Dados em preparação para submissão**, 2020.

SCHWARZ, K. R. L. et al. Effect of nitric oxide on the cyclic guanosine monophosphate (cGMP) pathway during meiosis resumption in bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 81, n. 4, p. 556–564, 2014.

SCHWARZ, K. R. L. et al. Effects of fetal calf serum on cGMP pathway and oocyte lipid metabolism *in vitro*. **Reproduction, Fertility and Development**, 2016.

SCHWARZ, K. R. L. et al. The role of cGMP as a mediator of lipolysis in bovine oocytes and its effects on embryo development and cryopreservation. **PLoS ONE**, v. 13, n. 1, 2018.

VACCARI, S. et al. Cyclic GMP Signaling Is Involved in the Luteinizing Hormone-Dependent Meiotic Maturation of Mouse Oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 81, p. 595–604, 2009.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reprod Fertil Dev**, v. 7, p. 871-891, 1995.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim Reprod Sci**, v. 60-61, p. 481-492, 2000.

WILLNOW, T. E.; HAMMES, A.; EATON, S. Lipoproteins and their receptors in embryonic development: more than cholesterol clearance. **Development**, v. 134, p. 3239-3249, 2007.

YANG, X. et al. Identification of perilipin-2 as a lipid droplet protein regulated in oocytes during maturation. **Reprod Fertil Dev.**, v. 22, p 1262-1271, 2010.

ZHANG, M. et al. Granulosa Cell Ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. **Science**, v. 330, p. 366–369, 2010.

Conclusão

4. Conclusão Geral

Os estudos sugerem que a via GMPc pode estar envolvida ao metabolismo lipídico de CCOs bovinos. Além disso, notamos que dependendo de qual enzima de síntese de GMPc é estimulada, podemos ter diferentes efeitos no conteúdo lipídico de oócitos e células do cumulus. A PKG participa, ao menos em parte, no metabolismo lipídico de oócitos. Apesar da manipulação da via causar redução lipídica, ela não altera a expressão da *PLIN2*, avaliada nas células do cumulus e ainda foi possível detectar expressão da *PDE3B*, que ainda não havia sido descrita, sugerindo que a manipulação da via e a redução lipídica, não afeta a expressão dos transcritos. Também sugerimos que a manipulação da via GMPc, através do estímulo a síntese do nucleotídeo, não altera o perfil lipídico dos oócitos e embriões produzidos na presença de moduladores da via. A manipulação da via através do estímulo a síntese de GMPc pelas GCm não afetou a clivagem e subsequente desenvolvimento embrionário, porém a estimulação através das GCs com a Protoporfirina IX, não possibilitou o desenvolvimento embrionário, sugerindo que apesar de não afetar o a maturação nuclear, ela pode afetar a maturação molecular ou citoplasmática, e como consequência, seu subsequente desenvolvimento embrionário. Assim, o estímulo de diferentes enzimas de síntese de GMPc levam a efeitos distintos sobre o teor de lipídios intracelular, sem afetar o perfil lipídico; diferentes estímulos não afetam a maturação nuclear, mas têm efeitos distintos sobre desenvolvimento embrionário subsequente.