



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**ADIPONECTINA E SEUS RECEPTORES NO OVÁRIO CAPRINO: EXPRESSÃO E
PAPEL SOBRE A MATURAÇÃO DE OÓCITOS**

BRUNA SABINO PINHO DE OLIVEIRA

RECIFE – PE

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**ADIPONECTINA E SEUS RECEPTORES NO OVÁRIO CAPRINO: EXPRESSÃO E
PAPEL SOBRE A MATURAÇÃO DE OÓCITOS**

BRUNA SABINO PINHO DE OLIVEIRA

Dissertação submetida à Coordenação do curso de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro

RECIFE – PE

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

O48a Oliveira, Bruna Sabino Pinho de
Adiponectina e seus receptores no ovário caprino: expressão e papel sobre a maturação de oócitos / Bruna Sabino Pinho de Oliveira. – 2017.
64 f. : il.

Orientador: Gustavo Ferrer Carneiro.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, Recife, BR-PE, 2017.
Inclui referências.

1. Folículo 2. Ovário 3. Caprinos 3. Tecido adiposo 4. Expressão Gênica I. Carneiro, Gustavo Ferrer, orient. II. Título

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**ADIPONECTINA E SEUS RECEPTORES NO OVÁRIO CAPRINO: EXPRESSÃO E
PAPEL SOBRE A MATURAÇÃO DE OÓCITOS**

BRUNA SABINO PINHO DE OLIVEIRA
Dissertação aprovada em 22 de fevereiro de 2017

Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro (UFRPE-UAG)
Orientador

Prof^a. Dr^a. Aurea Wischral (DMV-UFRPE)
Membro Titular

Prof. Dr. Anísio Francisco Soares (DMFA-UFRPE)
Membro Titular

Prof. Dr. Claudio Coutinho Bartolomeu (DMV-UFRPE)
Membro Titular

DEDICATÓRIA

*À minha querida avó, Maria de Lourdes
Wanderley de Oliveira (in memoriam), dedico.*

“A possibilidade de realizarmos um sonho é o que torna a vida interessante. ”

Paulo Coelho

“O otimista é um tolo. O pessimista, um chato. Bom mesmo é ser um realista esperançoso. ”

Ariano Suassuna

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao pessoal do ANDROLAB (aos que são hoje e aos que foram um dia) por todos esses anos de aprendizado e companheirismo, fico muito feliz de ter feito parte dessa equipe.

Agradeço à jovem equipe das Cabritas: André, Joana, Elizabete e Marina.

Agradeço ao meu orientador, professor Gustavo, por ter aceitado ser meu orientador e pelo suporte sempre que necessário.

Agradeço à equipe do FAMA, professora Áurea e professor Manoel pela disponibilização do laboratório e principalmente Diogo (muuuito obrigada!), Suzana e Sandra pela ajuda e compreensão.

Agradeço ao pessoal da patologia, especialmente à Sandra pela paciência e ajuda.

Agradeço ao Dr. Pedro Leopoldo pela grande ajuda com os dados estatísticos.

Agradeço à Ana e ao professor Pedro Lorenzo, da Universidad Complutense de Madrid, pela disponibilidade, atenção e ensinamentos, mesmo me recebendo com pouco tempo de aviso.

Agradeço ao pessoal do LANAGRO pelo suporte.

Agradeço à Ugu e Rogério, por não esquecerem da gente e estarem lá todas as madrugadas sofridas de segunda-feira.

Agradeço à Joana e Alcir, que acompanham sempre os alunos da Reprodução e estão sempre dispostos a ajudar.

Agradeço a todos os funcionários da UFRPE, que sempre facilitaram o trabalho dos estudantes com simpatia e bom humor, especialmente Dona Sônia.

Porém, quero agradecer especialmente à André Mariano, que sempre teve influência significativamente positiva no meu desenvolvimento acadêmico, e arrisco dizer que sempre terá. Obrigada por ser um exemplo. Se eu consegui chegar até aqui foi graças a você, que acreditou em mim e me apoiou mesmo com todas as dificuldades, e eu serei eternamente grata por isso. Muito obrigada por tudo!

Quero também agradecer em especial à melhor PIBIC (depois de mim, claro kkk brincadeira) que o laboratório já teve! Joana, obrigada por todos os esforços e todos os dias de sofrimento que você esteve lá comigo, e claro, todos os dias que a gente se divertiu fazendo o que a gente gosta! Continue sempre assim, porque eu sei que você vai longe. Pode contar comigo com o que precisar!

Agradeço à minha família, meu filhote Yuri, minha mãe, meu pai, minha irmã e meu marido Pablo pelo apoio sempre.

Agradeço aos meus amigos pelo incentivo, companheirismo e pelas horas de descontração tão necessárias em alguns momentos.

Agradeço a Deus, sempre.

Muito obrigada a todos!

APOIO FINANCEIRO

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

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

	Página
Figura 1 - Desenvolvimento folicular em caprinos	17
Figura 2 - Estrutura da adiponectina e suas formas pós-tradução	26
Figura 3 - Vias de sinalização da adiponectina através ativação dos receptores AdipoR1 e AdipoR2	27
Artigo - Expressão de adiponectina e seus receptores (AdipoR1 e AdipoR2) no ovário caprino e efeito sobre a maturação nuclear de oócitos in vitro	
Figura 1 - Níveis relativos de RNAm	53
Figura 2 - Localização de adiponectina, AdipoR1 e AdipoR2 em ovários caprinos por imunohistoquímica	54
Figura 3 - Taxa de maturação nuclear	55
Figura 4 - Estágios da maturação nuclear	56
Tabela 1. Sequências de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a realização da qPCR	47

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

CCRL2 - Receptor semelhante à chemocina tipo 2

CMKLR1 – Receptor semelhante à chemocina tipo 1

GRP1 – Receptor acoplado à proteína-G tipo 1

kDa – Quilo Dalton

RARRES2 - Respondedor do receptor do ácido retinóico 2

RNA – Ácido ribonucleico

RNA_m – RNA mensageiro

SUMÁRIO

	Página
DEDICATÓRIA	iv
AGRADECIMENTOS	vi
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	viii
ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Foliculogênese e Oogênese	15
2.1.1 Oogênese	15
2.1.2 Desenvolvimento folicular	16
2.2 Tecido Adiposo e Reprodução	21
2.2.1 Tecido adiposo como órgão endócrino	21
2.2.2 Adipocinas que afetam a reprodução	23
2.3 Adiponectina	25
2.3.1 Estrutura e expressão da adiponectina	25
2.3.2 Receptores de adiponectina	26
2.3.3 Adiponectina e o sistema reprodutivo	26
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
4 ARTIGO	41
4.1 Expressão de adiponectina e seus receptores (AdipoR1 e AdipoR2) no ovário caprino e efeito sobre a maturação nuclear de oócitos in vitro	41
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	64

RESUMO

A adiponectina é uma adipocina majoritariamente secretada por adipócitos que está envolvida na regulação da função reprodutiva de machos e fêmeas. Seus níveis de circulação têm correlação inversa com a quantidade de tecido adiposo corporal e seus efeitos biológicos são mediados principalmente através de dois receptores, AdipoR1 e AdipoR2. O objetivo deste estudo foi verificar a presença do sistema adiponectina (Adiponectina, e seus receptores, AdipoR1 e AdipoR2) em ovário caprinos através de qPCR e imunohistoquímica. Além disso, avaliar o efeito da adição de adiponectina recombinante humana (5 e 10 µg/mL) sobre a maturação de oócitos caprinos *in vitro*. Nós demonstramos que o RNAm e proteína para o sistema adiponectina estão presentes no ovário caprino. A expressão gênica e proteica dos receptores AdipoR1 e AdipoR2 foi detectada nas células foliculares (oócito, *cumulus*, granulosa e teca) de pequenos e grandes folículos antrais, enquanto que RNAm de adiponectina não foi detectada em oócitos de pequenos e grandes folículos e em células do *cumulus* de grandes folículos antrais. Finalmente, a adição de adiponectina, nas concentrações testadas, durante a maturação *in vitro* afetou a porcentagem de oócitos em metafase II. Em conclusão, neste estudo, demonstramos a expressão da adiponectina e seus receptores AdipoR1 e AdipoR2 em folículos ovarianos de caprinos. Além disso, demonstrou-se que a adiponectina rh aumenta a progressão da maturação nuclear de oócitos caprinos *in vitro*.

Palavras-chave: folículo, ovário, caprinos, tecido adiposo, expressão gênica

ABSTRACT

Adiponectin is a adipokine secreted mainly from adipocytes, involved in the control of male and female reproductive functions. Adiponectin circulating levels presents an inverse correlation with fat body mass and its biological effects are mediated mainly through two receptors AdipoR1 and AdipoR2. The aim of the present study, was to verify the expression of adiponectin system (Adiponectin and its receptors, AdipoR1 and AdipoR2) in goat ovary through qPCR and immunohistochemistry, and further investigate the in vitro effects of recombinant adiponectin (5 µg/mL and 10 µg/mL) on goat oocytes nuclear maturation. We demonstrated that adiponectin system's mRNA and proteins are present in goat ovary. Gene and protein expression of AdipoR1 and AdipoR2 were detected in follicular cells (oocyte, *cumulus*, granulosa and teca) of small and large antral follicles, while Adiponectin mRNA was not detected in small and large follicles oocytes, neither in large follicles *cumulus* cells. Finally, addition of adiponectin in maturation medium, in tested concentrations, affected the number of oocytes that reached metaphase II. In conclusion, in the present study, we demonstrated Adiponectin and its receptors AdipoR1 and AdipoR2 expression in goat ovarian follicles. Furthermore, was demonstrated that rh adiponectin increases nuclear maturation progression in vitro of goat oocyte.

Keywords: follicle, ovary, goat, adipose tissue, gene expression

1 INTRODUÇÃO

O agronegócio é uma forte vertente da economia brasileira, sendo a pecuária uma atividade de destaque nesse cenário, o que se deve à maior capacidade de adaptação à seca, quando comparada à agricultura, sobretudo no semiárido brasileiro (COUTINHO et al., 2013). O rebanho caprino brasileiro é composto de 9.614.722 animais, dos quais mais de 92% se encontra na região nordeste (IBGE, 2015), evidenciando a importância da caprinocultura para a economia desta região (RIET-CORREA et al., 2013).

A demanda do agronegócio tem exigido grandes transformações nos sistemas produtivos, tanto na intensificação quanto na profissionalização da produção, com o advento das inovações tecnológicas, as quais resultam em comprovado benefício à atividade (RODRIGUES, 2006). Na caprinocultura, assim como nos outros segmentos do agronegócio brasileiro, a busca é crescente a favor da aplicação de técnicas de aperfeiçoamento tecnológico que proporcionem melhorias na eficiência da atividade (TEIXEIRA et al., 2013).

Neste contexto, a evolução das biotécnicas da reprodução se traduz na obtenção de maior número de animais de elevada qualidade do que seria possível na reprodução natural (CORTEEL; LEBOEUF; BARIL, 1988; PAULA et al., 2008). O conhecimento sobre desenvolvimento do gameta feminino torna-se imprescindível para a evolução de biotécnicas como fertilização *in vitro*, clonagem e transgenia animal (LIMA; SANTOS, 2010), visto que a utilização de oócitos imaturos é necessária para a realização destas biotécnicas, e ainda hoje o processo como um todo não é bem elucidado (COGNIÉ et al., 2003; LIMA; SANTOS, 2010).

A escassez de conhecimento sobre a aquisição de competência do oócito na maturação é uma grande dificuldade encontrada pelos sistemas de produção *in vitro* (PIV) de embriões e apesar dos esforços pela melhoria, a eficiência desta biotécnica ainda é relativamente baixa (GOTTARDI; MINGOTI, 2009). Assim, para conseguir avanço destas biotécnicas, é necessário, dentre outros fatores, aperfeiçoar a técnica da maturação *in vitro* (MIV) dos oócitos, para que estes sejam capazes de suportar as fases subsequentes.

Sabe-se que o tecido adiposo possui múltiplas funções (REVERCHON et al., 2014a), e que é reconhecido atualmente como um importante órgão endócrino, influenciando a regulação de diversos processos fisiológicos (TRAYHURN, 2005), inclusive, a reprodução (DUPONT et al., 2012). Algumas adipocinas, citocinas

35 produzidas majoritariamente pelos adipócitos, tem sido apontadas como responsáveis por
36 regular funções gonadais e o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, dentre elas a
37 adiponectina (REVERCHON et al., 2014a).

38 A adiponectina, uma proteína de 244 aminoácidos e peso molecular de 30 kDa
39 (KIEZUN et al., 2014), é uma das mais importantes adipocinas, e atua em diferentes
40 níveis controlando a fertilidade masculina e feminina (TABANDEH et al., 2010). Esta
41 adipocina atua através da ligação a receptores de membrana específicos, AdipoR1 e
42 AdipoR2 (YAMAUCHI et al., 2014). A importância da adiponectina na função
43 reprodutiva da fêmea de diversas espécies tem sido estudada (PALIN; BORDIGNON;
44 MURPHY, 2012; REVERCHON et al., 2014a), entretanto, na literatura não foram
45 encontrados dados relativos à ação dessa adipocina no trato reprodutivo da fêmea caprina.

46 Em atenção à carência de dados, objetivou-se estudar a presença da adiponectina
47 e seus receptores nos diferentes tipos celulares de folículos caprinos e, subsequentemente,
48 a influência da adição da adiponectina no meio de maturação de oócitos caprinos.

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64 2 REVISÃO DE LITERATURA

65

66 2.1 Foliculogênese e Oogênese

67

68 A quantidade e a qualidade dos gametas femininos produzidos, nos mamíferos,
69 depende diretamente de dois processos intimamente ligados entre si: a foliculogênese e a
70 oogênese (MONNIAUX et al., 2009). Estes dois processos são longos e complexos, tendo
71 início ainda na vida fetal do indivíduo (SCARAMUZZI et al., 2011). O folículo, produto
72 da foliculogênese, tem o papel importante de garantir um ambiente propício para o
73 crescimento e a aquisição da competência do oócito.

74 O oócito, produto da oogênese, por sua vez, tem também papel na promoção e
75 regulação do desenvolvimento folicular (GILCHRIST; RITTER; ARMSTRONG, 2004;
76 SCARAMUZZI et al., 2011). Assim, a foliculogênese e a oogênese, são processos
77 diferentes, que resultam em produtos diferentes, mas que são fisiologicamente
78 dependentes um do outro (MONNIAUX et al., 2009).

79

80 2.1.1 Oogênese

81

82 O processo que resulta na formação do gameta feminino, a oogênese, tem início
83 quando as células germinativas primordiais migram do saco vitelínico e colonizam as
84 criptas gonadais no período fetal (HAFEZ; HAFEZ, 2004; MONNIAUX et al., 2009).
85 Durante essa migração as células germinativas primordiais continuam a se multiplicar por
86 divisão mitótica, assim, quando chegam às gônadas em formação, estas células são
87 diploides e mitoticamente ativas e que se diferenciam em oogônias (AERTS; BOLS,
88 2010).

89 As oogônias, então, procedendo à transição para oócitos primários, interrompem
90 a multiplicação mitótica e iniciam a primeira divisão meiótica, que é bloqueada na prófase
91 I (ou estado de vesícula germinativa; GV), estado esse que permanece até a puberdade
92 (ADAMS et al., 2008). Ao mesmo tempo, cada oócito primário é envolvido por uma
93 camada de células somáticas, pré-granulosa, formando folículos primordiais (EDSON;
94 NAGARAJA; MATZUK, 2009; MONNIAUX et al., 2009; SCARAMUZZI et al., 2011).
95 Nos mamíferos, a totalidade de folículos primordiais formados nessa fase será a reserva
96 limitada de gametas que estarão disponíveis durante toda a vida reprodutiva do indivíduo
97 (EDSON; NAGARAJA; MATZUK, 2009).

98 Durante a foliculogênese, o oócito cresce, sofre modificações estruturais e
99 armazena RNA e proteínas necessárias para se tornar competente para retomar e
100 completar a maturação, suportar a fertilização e o subseqüente desenvolvimento
101 embrionário (KRISHER, 2004; MERMILLOD et al., 2008). A retomada da meiose só
102 ocorre na puberdade, pois é neste período que se iniciam os ciclos estrais que levarão à
103 ovulação (HAFEZ; HAFEZ, 2004; SILVA-SANTOS et al., 2013). Com o advento do
104 pico do Hormônio Luteinizante (LH), que inicia a cascata de processos da ovulação, o
105 oócito maturo e meioticamente competente irá retomar a meiose, quando irá reduzir seu
106 DNA diploide para um haploide (BRUNET; MARO, 2005; HEIKINHEIMO; GIBBONS,
107 1998; SIRARD, 2001).

108 A retomada da meiose é caracterizada pela quebra da vesícula germinativa
109 (GVBD – do inglês Germinal Vesicle BreakDown), que se inicia logo após o pico de LH,
110 induzindo a uma rápida fosforilação da conexina 43 (GJA1) e fechando as junções gap,
111 impedindo a passagem do adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc) responsável pelo
112 bloqueio em GV, na primeira divisão meiótica (CHEN et al., 2006; NORRIS et al., 2009;
113 VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Com isto, ocorre dissolução da membrana nuclear,
114 condensação da cromatina, formação do primeiro fuso meiótico, expulsão do primeiro
115 corpúsculo polar, que possui metade dos cromossomos, tornando o oócito uma célula
116 haploide, e em seguida uma nova interrupção na metáfase da segunda divisão meiótica,
117 que só irá se completar, se o oócito for fertilizado ou sofrer ativação partenogênica,
118 levando à formação do segundo corpúsculo polar (BRUNET; MARO, 2005;
119 MONNIAUX et al., 2009; SIRARD, 2001).

120

121 *2.1.2 Desenvolvimento folicular*

122

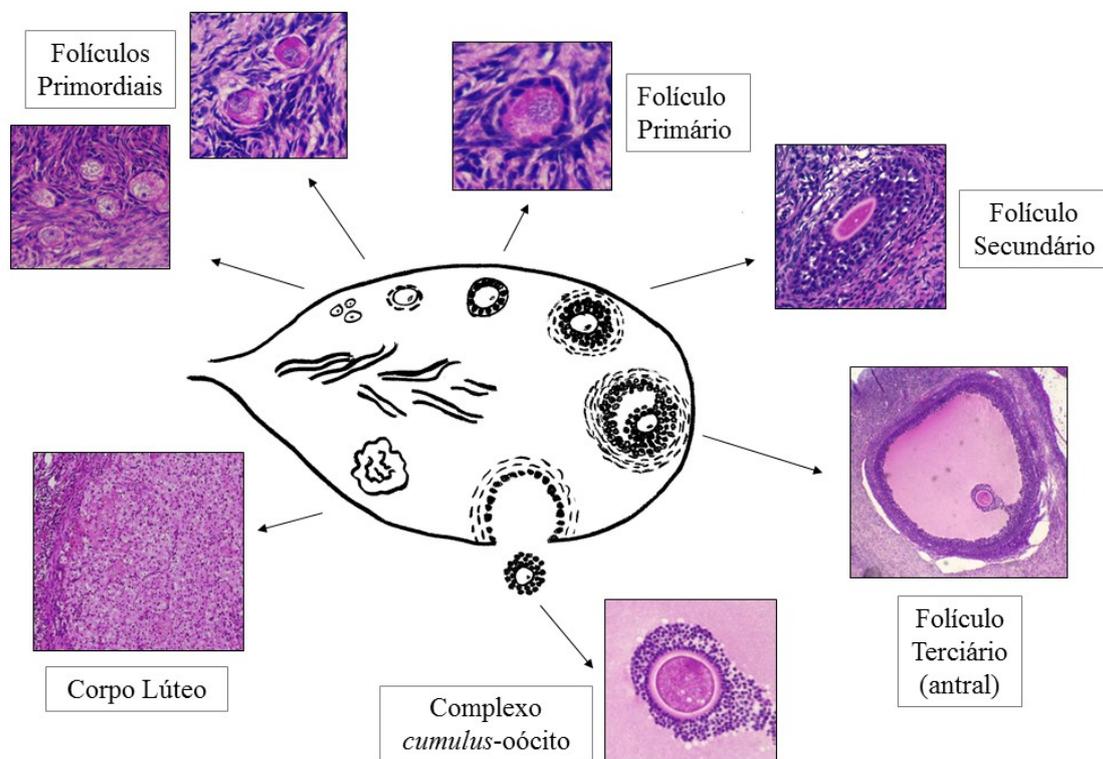
123 Com a formação dos folículos primordiais, tem início o segundo processo ligado
124 à produção dos gametas femininos, a foliculogênese, que se inicia e termina durante o
125 processo da oogênese, sendo um processo um pouco mais curto (MARTINS et al., 2008).
126 A foliculogênese é o processo contínuo que tem por fim a ovulação, mas que resulta na
127 atresia de mais de 99% dos outros folículos em crescimento que não chegam à esta fase
128 (MONNIAUX et al., 2009).

129 O desenvolvimento folicular pode ser classicamente dividido em dois períodos
130 sucessivos do ponto de vista funcional: a foliculogênese basal e a foliculogênese terminal
131 (MONNIAUX et al., 2009). A foliculogênese basal se desenvolve normalmente na

132 ausência de FSH, sendo controlada por fatores de crescimento de origem oocitária e
133 somática, enquanto a foliculogênese terminal é estritamente dependente do FSH, e para a
134 fase final do desenvolvimento do folículo pré-ovulatório, do LH (HAFEZ; HAFEZ, 2004;
135 MONNIAUX et al., 2009). Além do FSH, a insulina e o IGF-1 são de grande importância,
136 pois sensibilizam os folículos ao FSH (MAZERBOURG et al., 2003).

137 Os folículos, de acordo como seu desenvolvimento, podem ser classificados em
138 (Figura 1) primordiais, primários, secundários (ou pré-antrais) e terciários (ou antrais),
139 que ainda podem ser divididos em folículos antrais pequenos e folículos antrais grandes
140 (MONNIAUX et al., 2009; SCARAMUZZI et al., 2011).

141



142

143 **Figura1.** Desenvolvimento folicular em caprinos. Fonte: Arquivo pessoal.

144

145 Os folículos primordiais são caracterizados pelo oócito primário envolvido por
146 uma camada de células somáticas, a pré-granulosa (EDSON; NAGARAJA; MATZUK,
147 2009). O desenvolvimento dos folículos primordiais começa com um aumento do volume
148 do oócito e do número de células da granulosa, que passam por uma diferenciação e
149 adquirem uma forma cuboide, tornando-se folículos primários (SCARAMUZZI et al.,
150 2011). A evolução para folículo secundário é identificada pela presença de mais de uma

151 camada de células da granulosa, pelo aparecimento da zona pelúcida e pela síntese dos
152 grânulos corticais no citoplasma (BEZERRA et al., 1998; EPPIG, 2001; FAIR, 2010;
153 MONNIAUX et al., 2009). O folículo apresenta também o aparecimento de células
154 alongadas ligadas à membrana basal, identificadas como células da teca interna, que
155 exprimem, desde sua formação, fatores de crescimento, receptores de LH, enzimas e
156 fatores chave da esteroidogênese, permitindo a síntese de progestágenos (BRAW-TAL;
157 YOSSEFI, 1997; MONNIAUX et al., 2009; SCARAMUZZI et al., 2011).

158 Nessa fase, os folículos já estão responsivos às gonadotrofinas, porém são
159 independentes das mesmas, e a comunicação direta entre o oócito e as células da
160 granulosa é estabelecida através das junções *gap*, que são canais de membrana que
161 permitem a passagem de nutrientes, pequenos metabólitos, íons inorgânicos e segundos
162 mensageiros entre as células (BARNETT et al., 2006; FAIR, 2003, 2010; MONNIAUX
163 et al., 2009). Essa comunicação bidirecional entre o oócito e as células somáticas
164 foliculares se torna mais aparente com o desenvolvimento folicular e embora o oócito
165 dependa destas células para o seu crescimento e desenvolvimento, a taxa de
166 desenvolvimento do folículo também depende criticamente do oócito (AERTS; BOLS,
167 2010; EDSON; NAGARAJA; MATZUK, 2009).

168 As células da granulosa do folículo secundário se multiplicam, dobrando sete a
169 oito vezes sua população antes de passar para a próxima fase do desenvolvimento, onde
170 há formação de um antro entre as células da granulosa, no interior do folículo – terciário
171 ou antral (MONNIAUX et al., 2009; SCARAMUZZI et al., 2011). A estruturação do
172 antro se inicia com a formação de vários pequenos espaços preenchidos com fluido
173 durante a foliculogênese, que eventualmente se juntam para formar uma cavidade única
174 (EDSON; NAGARAJA; MATZUK, 2009).

175 Com o advento da formação do antro no folículo terciário, as células da granulosa
176 se dividem em dois grupos anatômica e funcionalmente diferentes: as células do *cumulus*
177 e as células murais da granulosa. As células do *cumulus*, altamente especializadas, estão
178 física e metabolicamente ligadas ao oócito, formando o complexo *cumulus*-oócito (COC),
179 essencial para a promoção do seu crescimento e desenvolvimento da competência; e as
180 células murais da granulosa, que estão na parede do folículo formando um epitélio
181 estratificado delimitado pela lâmina basal, e são cruciais para a esteroidogênese e para a
182 ovulação (EDSON; NAGARAJA; MATZUK, 2009; EPPIG, 2001; GILCHRIST;
183 RITTER; ARMSTRONG, 2004). Este processo de diferenciação é conduzido pelo
184 próprio oócito, e o resultado é a formação de um microambiente que é extremamente

185 importante para a aquisição final da competência para desenvolvimento do mesmo
186 (SCARAMUZZI et al., 2011).

187 O folículo terciário apresenta, então, em sua estrutura, a teca externa, a teca
188 interna, esta última separada das células da granulosa pela lâmina basal, um oócito
189 envolto nas células do *cumulus* e uma cavidade antral formada pelo acúmulo de fluidos
190 de secreção produzidos pelas células foliculares (MONNIAUX et al., 2009).

191 A granulosa e a teca de folículos maduros são altamente diferenciadas e contém
192 várias características funcionais específicas. A granulosa apresenta não só os receptores
193 de LH e do Hormônio Folículo Estimulante (FSH), mas também outros receptores
194 importantes para o desenvolvimento como o do Fator de Crescimento Semelhante a
195 Insulina I (IGF-I), e sítios de ligação para o Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
196 (GnRH) (HIRSHFIELD, 1991; VAN DEN HURK; ZHAO, 2005).

197 O desenvolvimento de folículos pré-antrais em folículos antrais é marcada por
198 uma mudança na regulação da foliculogênese, que antes era principalmente intra-ovariana
199 e se torna principalmente extra-ovariana, com o início do funcionamento do eixo
200 hipotálamo-hipófise-gonadal (EDSON; NAGARAJA; MATZUK, 2009). Embora os
201 folículos pré-antrais sejam responsivos ao FSH durante a foliculogênese, nesse momento
202 o FSH se torna essencial, não só por seu papel em prevenir a apoptose de células da
203 granulosa e a atresia folicular, mas também na proliferação das células da granulosa, na
204 produção de estradiol e na expressão de receptores de LH (CHUN et al., 1996; KUMAR
205 et al., 1997; RICHARDS, 1994).

206 O desenvolvimento do folículo antral é completamente dependente das
207 gonadotrofinas, nos ruminantes, e os folículos em crescimento expressam enzimas
208 esteroidogênicas, receptores de gonadotrofina e fatores regulatórios locais e seus
209 receptores (DRIANCOURT, 2001; FAIR, 2010; SÁNCHEZ; SMITZ, 2012).

210 Para o oócito, esse período de transição também representa uma mudança crítica,
211 pois antes da formação do antro os oócitos são incapazes de progredir da fase de diplóteno
212 da primeira meiose em que ele se encontra (SÁNCHEZ; SMITZ, 2012). Esses oócitos
213 são considerados meioticamente incompetentes por não terem moléculas regulatórias
214 suficientes para leva-lo à progressão meiótica (DE VANTÉRY et al., 1997; KIM;
215 SEONG; LEE, 2008). No entanto, a maioria dos oócitos de folículos antrais são
216 meioticamente competentes e, se removidos dos folículos e cultivados em meio de
217 suporte, retomarão a meiose (EPPIG, 2001).

218 Durante o período final do desenvolvimento do folículo antral, o oócito não
219 apresenta mais grandes mudanças no seu diâmetro, porém o seu volume, ou massa, ainda
220 apresenta um aumento significativo (EPPIG, 2001), e o folículo apresenta um aumento
221 no seu tamanho, devido ao aumento do volume de fluido folicular na cavidade antral, até
222 o estado pré-ovulatório, porém a maioria dos folículos jamais chega nesse estado
223 (MONNIAUX et al., 2009).

224 As células da granulosa progressivamente diminuem a sua capacidade de
225 proliferação e se diferenciam em células estrogênicas permitindo a síntese de estradiol a
226 partir dos andrógenos de origem tecal (MONNIAUX et al., 2009). Diminuem também o
227 número de receptores de FSH, enquanto os receptores de LH aumentam drasticamente,
228 se tornando extremamente sensíveis ao LH. Tal sensibilidade possibilita a resposta ao
229 pico de LH iniciando a cascata de eventos da ovulação, que provoca a retomada da meiose
230 do oócito, a expansão do *cumulus*, a ruptura do folículo e, por fim, a diferenciação das
231 células restantes da granulosa e da teca para criar o corpo lúteo (EDSON; NAGARAJA;
232 MATZUK, 2009; MONNIAUX et al., 2009).

233 Durante a puberdade, se inicia o processo de ciclo estral, que nos caprinos,
234 ocorrerá em duas a seis ondas foliculares, e a última delas selecionará o folículo que irá
235 ovular (EVANS, 2003). Uma onda folicular é caracterizada por uma sequência de três
236 eventos dependentes de gonadotrofinas: recrutamento, seleção e dominância folicular
237 (HUNTER, 2003). Assim, apenas folículos da fase terminal da foliculogênese, que são
238 dependentes de FSH, poderão ser recrutados (DRIANCOURT, 2001).

239 Durante a fase folicular, o FSH estimula o crescimento e, nos caprinos, um grupo
240 de folículos antrais de 2-3 mm de diâmetro é recrutado e iniciam seu crescimento
241 terminal. Deste grupo apenas dois ou três folículos alcançam 4 mm de diâmetro e são
242 selecionados para continuar no processo e entrar na fase de dominância. Neste momento
243 o LH vai atuar e sobre essa influência eles atingirão 6-9 mm de diâmetro, no estágio pré-
244 ovulatório, enquanto os folículos subordinados entrarão em atresia (FATET; PELLICER-
245 RUBIO; LEBOEUF, 2011). O pico de LH, então, induz a ovulação, que libera o oócito
246 pronto para a fertilização, e a subsequente luteínização das células foliculares formando
247 o corpo lúteo, que dá início à fase luteal do ciclo (SCARAMUZZI et al., 1993).

248 Além de todos os fatores endócrinos, diversos fatores ambientais, como
249 temperatura e alimentação, podem influenciar na eficiência reprodutiva (WEBB;
250 ARMSTRONG, 1998). Mudanças crônicas ou agudas na dieta e composição corporal,
251 podem provocar efeitos na fertilidade e, especificamente, na função ovariana dos

252 mamíferos (ADAMIAK et al., 2005). Animais sob stress metabólico investem energia
253 primeiro para sobrevivência e depois para a reprodução, assim o eixo reprodutivo tem a
254 capacidade de responder a mudanças no status calórico (HILL; ELMQUIST; ELIAS,
255 2008), e o tecido adiposo tem se mostrado um órgão importante na sinalização desse
256 status (TRAYHURN, 2005).

257

258 **2.2 Tecido Adiposo e Reprodução**

259

260 *2.2.1 Tecido adiposo como um órgão endócrino*

261

262 O tecido adiposo é composto primariamente por adipócitos, pré-adipócitos,
263 macrófagos, células endoteliais, fibroblastos e leucócitos e pode ser classificado em dois
264 subtipos: Tecido Adiposo Branco (TAB) e Tecido Adiposo Marrom (TAM) (LUO; LIU,
265 2016).

266 O TAM é encontrado na maioria dos mamíferos, sendo o suíno uma exceção
267 (TRAYHURN; TEMPLE; VAN AERDE, 1989). Este subtipo é especializado em
268 produção de calor e, por isso, as diversas gotículas lipídicas contidas nos adipócitos
269 marrons são utilizadas como combustível para a termogênese (GORALSKI et al., 2007;
270 KIEFER, 2016; TRAYHURN, 2005). Quando ativado, o TAM queima lipídios e glucose,
271 fazendo com que a energia se dissipe e produza calor (CHEN; PAN; PFEIFER, 2016;
272 LUO; LIU, 2016).

273 O TAB é reconhecidamente o maior depósito de combustível a longo termo do
274 organismo (TRAYHURN; BEATTIE, 2001). Essa energia é armazenada na forma de
275 triacilgliceróis, em gota lipídica única, nos adipócitos brancos, que tem grande capacidade
276 de armazenamento de energia, além de proteger órgãos como o músculo e o fígado da
277 lipotoxicidade (KIEFER, 2016). Assim, sempre que é necessário um aporte energético,
278 são liberados ácidos graxos do TAB, através da lipólise (CHEN; PAN; PFEIFER, 2016;
279 LUO; LIU, 2016). Entretanto, com a identificação da leptina, constatou-se que armazenar
280 energia não era a única função do TAB, tornando o tecido adiposo um importante órgão
281 endócrino e secretor, por liberar diversos hormônios chamados adipocinas (CONDE et
282 al., 2011; TRAYHURN; BEATTIE, 2001).

283 As adipocinas são citoquinas produzidas em grande parte pelos adipócitos brancos
284 ou pela fração vascular estromal, e estão envolvidos na diferenciação dos adipócitos,
285 metabolismo energético, resistência à insulina, inflamação, imunidade e angiogênese

286 (REVERCHON et al., 2014a). Além da leptina, muitas outras adipocinas são secretadas
287 pelos adipócitos brancos, como a angiotensina, a adiposina, interleucina-6 (IL6), proteína
288 estimuladora de acilação (ASP), adiponectina, proteína de ligação ao retinol, fator de
289 necrose tumoral alfa (TNF α), resistina, chemerin, visfatina, inibidor do ativador do
290 plasminogênio 1 (PAI1), entre outros (PARIMISSETTY et al., 2016; TRAYHURN;
291 BEATTIE, 2001). Algumas dessas adipocinas, além de secretadas pelos adipócitos
292 brancos, também são secretadas pelos adipócitos marrom, como a leptina e a adiponectina
293 (TRAYHURN, 2005).

294 A lista de adipocinas é crescente e já são conhecidas mais de 50 moléculas, que
295 são bastante diversas em relação à estrutura proteica e função fisiológica, podendo estar
296 envolvidas em diferentes fases da regulação sistêmica do metabolismo e inflamação
297 (LUO; LIU, 2016; TRAYHURN, 2005).

298 Atualmente o tecido adiposo vem sendo apontado como um importante fator no
299 processo que relaciona o estado nutricional com a regulação da função reprodutiva,
300 através de várias adipocinas que atuam em diferentes etapas no controle da fertilidade do
301 macho e da fêmea (CAMPOS et al., 2008; PALIN; BORDIGNON; MURPHY, 2012).

302 Níveis normais de adipocinas são fundamentais para manter a integridade do eixo
303 hipotalâmico-hipofisário-gonadal, processos ovulatórios regulares, implantações
304 embrionárias com sucesso e gestações fisiológicas e alterações nesses níveis, ou nos seus
305 mecanismos de ação, têm sido associadas com problemas de fertilidade e doenças da
306 gestação, e também com obesidade, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares
307 (TERSIGNI et al., 2011). Por isso, muitos grupos de pesquisa têm se dedicado a tentar
308 entender quais são e de que forma agem estas adipocinas.

309

310 *2.2.2 Adipocinas que afetam a reprodução*

311

312 Dentre as adipocinas que afetam a reprodução, a leptina é a mais estudada, porém
313 outras têm sido alvo de estudos mais recentemente, sendo elas: adiponectina, resistina,
314 visfatina, e chemerin (DUPONT et al., 2015).

315 A leptina foi a primeira adipocina identificada, em 1994, sendo considerada o elo
316 entre a gordura e a reprodução, promovendo o tecido adiposo à órgão endócrino (CONDE
317 et al., 2011; DUPONT et al., 2012). A leptina é um hormônio peptídico de 16kDa
318 secretado majoritariamente pelo tecido adiposo branco, porém também é produzida ou
319 está presente em outros órgãos como placenta, estômago, glândula mamária, folículos

320 ovarianos, músculo, intestino e tecido adiposo marrom (LUO; LIU, 2016; TRAYHURN;
321 BEATTIE, 2001).

322 Esta adipocina possui diversas funções, influenciando na regulação do peso
323 corporal, no gasto de energia, no sistema reprodutor e no sistema imune. No sistema
324 reprodutor está relacionada com a regulação da função ovariana, maturação oocitária,
325 desenvolvimento embrionário, implantação e placentação (LUO; LIU, 2016; PÉREZ-
326 PÉREZ et al., 2015).

327 Pesquisas demonstraram um papel da leptina na fisiologia normal da reprodução
328 através de interações complexas em vários níveis do eixo hipotalâmico-hipofisário-
329 gonadal, sendo efeitos estimulantes no hipotálamo e na hipófise, estimulando a secreção
330 de GnRH no hipotálamo e a de LH e FSH na hipófise e inibitório nas gônadas, inibindo
331 a esteroidogênese induzida pela insulina nas células da teca e da granulosa. Assim, a
332 leptina supostamente serviria como um sinal que liga o status metabólico com o eixo
333 reprodutivo (CERVERO et al., 2006; CHEN et al., 2013; PÉREZ-PÉREZ et al., 2015;
334 TERSIGNI et al., 2011). Os níveis de leptina no plasma são correlacionados
335 positivamente com a massa total de gordura corporal e são regulados pela alimentação e
336 privação de alimentos (CONDE et al., 2011). Expressões de RNAm para leptina e seu
337 receptor foram identificadas nas células foliculares de caprinos, sugerindo uma ação
338 reguladora da função e/ou diferenciação destas células (BATISTA et al., 2013).

339 A resistina é uma pequena proteína, com 12kDa, rica em cisteínas, que consiste
340 em homodímeros conectados por pontes dissulfeto (GALIC; OAKHILL; STEINBERG,
341 2010). Em vacas, foi observado que os níveis de RNAm para resistina foram maiores em
342 adipócitos maduros do que na fração vascular estromal, sugerindo que a resistina é
343 produzida por adipócitos maduro, semelhante ao encontrado em camundongos e diferindo
344 do identificado em humanos, onde são predominantemente produzidos por células
345 mononucleares do sangue, macrófagos e células da medula óssea (REVERCHON et al.,
346 2014a, 2014b).

347 Estudos tem encontrado evidências da relação entre a resistina e a função
348 reprodutiva. A resistina, de forma dose-dependente, aumentou a secreção basal e a
349 estimulada pela Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG) *in vitro* de testosterona em
350 tecidos testiculares em ratos e sugere-se que a expressão do gene de resistina seja regulado
351 pelos pulsos de LH e FSH (MARDYŁA, 2012; NOGUEIRAS et al., 2004)

352 Em 2011, Maillard et al., identificaram a presença de resistina em células
353 ovarianas de bovinos e de camundongos, especificamente mostrando que em células da

354 granulosa a expressão de resistina é espécie-dependente. Observaram também que, nessas
355 células, a resistina recombinante pode modular a esteroidogênese e a proliferação em
356 estado basal ou em resposta ao IGF-1 *in vitro*, sugerindo que a resistina possa ser um sinal
357 metabólico envolvido em funções reprodutivas (MAILLARD et al., 2011). Os níveis de
358 resistina circulante aumentam com a acumulação de gordura e reduz a sensibilidade à
359 insulina, implicando em uma resistência à insulina induzida pela obesidade e diabetes
360 tipo II, observadas em roedores (CAMPOS et al., 2008).

361 A visfatina é uma adipocina de 52kDa, secretada preferencialmente pelo tecido
362 adiposo visceral. Os níveis circulantes dessa adipocina aumentam com o acúmulo de
363 gordura (CAMPOS et al., 2008). A visfatina apresenta efeitos semelhantes à insulina,
364 estimulando a absorção de glicose nos adipócitos e células musculares, e suprime a
365 liberação de glicose pelos hepatócitos (REVERCHON et al., 2014a).

366 A concentração de visfatina no fluido folicular de mulheres submetidas ao
367 processo de fertilização *in vitro* foi positivamente correlacionada com o número de
368 folículos recuperados, sugerindo uma atuação da visfatina na função ovariana e um
369 aumento considerável na expressão de visfatina em células tratadas com hCG por 24h,
370 foi identificado através de análise com PCR-Transcriptase Reversa sugerindo um papel
371 da visfatina no final do desenvolvimento folicular ou na ovulação (DUPONT et al., 2012;
372 SHEN et al., 2010).

373 A chemerin, também conhecida como RARRES2 (*retinoic acid responder protein*
374 *2*) ou TIG2 (*tazarotene induced gene 2 protein*), é uma adipocina (GORALSKI et al.,
375 2007) secretada como uma pró-proteína inativa de peso molecular de 18kDa e passa por
376 uma clivagem na porção C-terminal da proteína para gerar a chemerin ativa que pesa
377 16kDa (DUPONT et al., 2012; REVERCHON et al., 2014a). Estudos identificaram alta
378 expressão de chemerin em tecido adiposo branco, mas também em macrófagos,
379 plasmócitos, células dendríticas e células NK (natural killer cells) de camundongos e
380 humanos (GORALSKI et al., 2007; REVERCHON et al., 2014c).

381 A chemerin e seu receptor CMKLR1 estão presentes em células foliculares
382 ovarianas (principalmente nas células da granulosa e nas células da teca) e fluido folicular
383 humano, sendo seu nível significativamente mais alto do que no plasma. O mesmo estudo
384 mostrou que a chemerin recombinante de humano reduziu a esteroidogênese induzida por
385 IGF-1 e a proliferação celular através de uma diminuição da ativação das vias de
386 sinalização do IGF-1 em células da granulosa primárias (REVERCHON et al., 2012).

387 Em bovinos, foi identificada a presença da chemerin e seus três receptores
388 CMKLR1, GRP1 e CCRL2 no ovário. Nas células da granulosa primária a chemerin
389 reduziu a esteroidogênese, a síntese de colesterol no estado basal e em resposta ao IGF-1
390 ou FSH, e a adição de chemerin recombinante humana no meio de maturação de oócitos
391 bovinos impediu a retomada da meiose, deixando a maioria dos oócitos no estágio de
392 vesícula germinativa (REVERCHON et al., 2014c).

393

394 **2.3 Adiponectina**

395

396 *2.3.1 Estrutura e expressão da adiponectina*

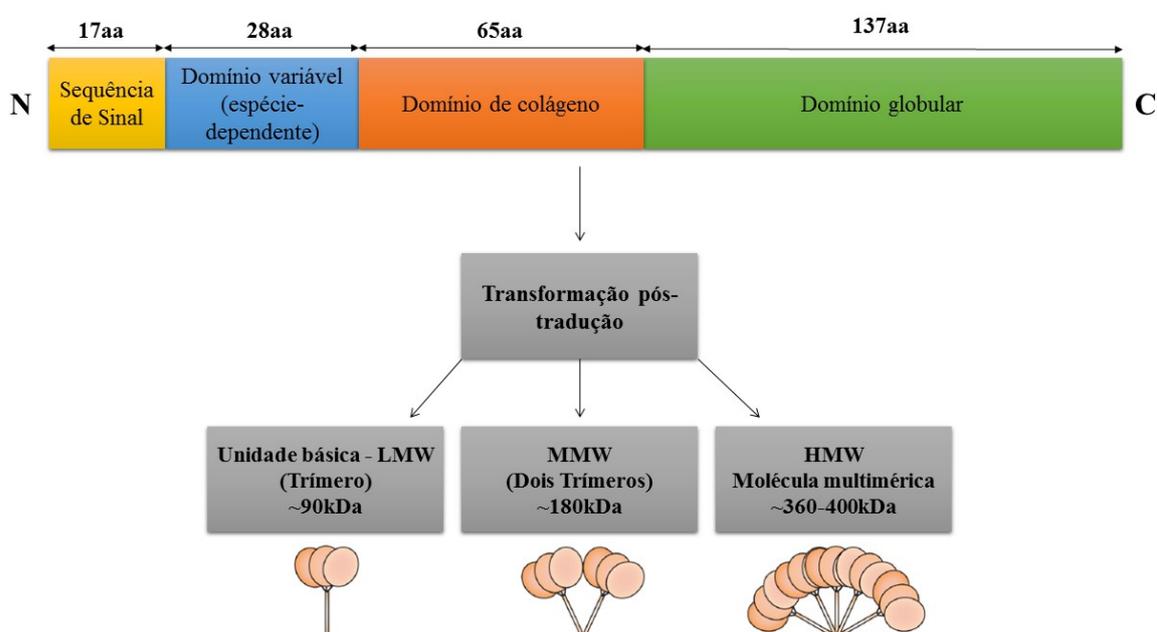
397

398 A adiponectina, também conhecida como Acpr30, adipoQ, apM1 ou GPB 28, é
399 uma proteína de peso molecular igual a 30kDa, formada por 244 aminoácidos
400 (REVERCHON et al., 2014a), codificada pelo gene APM1 no cromossomo 3q27
401 (ANGELIDIS et al., 2013). É formada por uma sequência de sinal no terminal-N, uma
402 sequência varável espécie-dependente, um domínio de colágeno e um domínio globular
403 no terminal-C (GOLDSTEIN; SCALIA; MA, 2009). Assim como as proteínas de
404 domínio de colágeno, a adiponectina possui uma forma básica de trímero (CAMPOS et
405 al., 2008), chamada de complexo de baixo peso molecular (LMW- *low molecular weight*),
406 uma combinação de dois trímeros, formando hexâmeros, são referidos como MMW
407 (*middle molecular weight*) e complexos multiméricos que são identificados como HMW
408 (*high molecular weight*), quando são formados por mais de dois trímeros (Figura 2;
409 ANGELIDIS et al., 2013; REVERCHON et al., 2014a; SANTOS et al., 2012). Existe
410 ainda uma outra forma de adiponectina, a adiponectina globular que é produzida por
411 clivagem proteolítica (ANGELIDIS et al., 2013; YAMAUCHI et al., 2014).

412 A adiponectina é a proteína mais abundantemente secretada pelo tecido adiposo
413 branco (KAWWASS; SUMMER; KALLEN, 2015) e, embora seja principalmente
414 sintetizada pelos adipócitos, agora admite-se que ela também é expressa, no nível de
415 RNAm e/ou proteína, no fígado, células epiteliais, osteoblastos, miócitos e nas células da
416 hipófise (PARIMISSETTY et al., 2016).

417 O nível circulante de adiponectina em humanos é relativamente alto, chegando a
418 0,01% da proteína total do plasma (DUPONT et al., 2012; SANTOS et al., 2012),
419 entretanto a concentração desta adipocina difere da maioria quando correlacionada com
420 o acúmulo de gordura, sendo sua expressão de RNAm e concentração no plasma

421 negativamente associadas com a adiposidade (ANGELIDIS et al., 2013; DUPONT et al.,
 422 2012). A concentração de adiponectina apresenta, também, um dimorfismo sexual, onde
 423 os níveis circulantes em fêmeas é mais alto do que nos machos (PAJVANI et al., 2003).
 424



425
 426 **Figura 2.** Estrutura da adiponectina e suas formas pós-tradução. Adaptado de Goldstein
 427 et al., 2009.

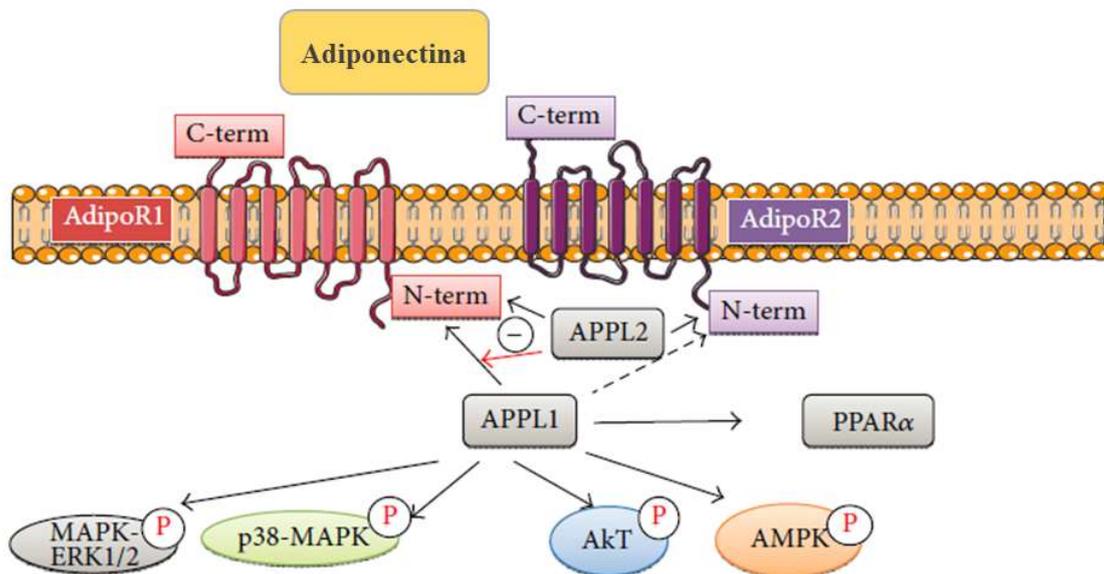
428 2.3.2 Receptores de adiponectina

430
 431 A atuação da adiponectina se dá através de dois receptores de membrana
 432 específicos, AdipoR1 e AdipoR2 (Figura 3; YAMAUCHI et al., 2003). Os receptores são
 433 formados por sete domínios transmembrana, porém, com o terminal-N no meio
 434 intracelular e o terminal-C no meio extracelular, caracterizando uma orientação oposta à
 435 clássica dos receptores acoplados às proteínas G (GPCR; DE MOURA; PINTO VIDAL,
 436 2011; KADOWAKI et al., 2006). T-cadherin, uma proteína de membrana ancorada por
 437 glicosilfosfatidilinositol (GPI), foi identificada como receptor para as formas hexaméricas
 438 (MMW) e multiméricas (HMW) de adiponectina, mas não para as formas triméricas
 439 (LMW) e globular (HUG et al., 2004).

440 Em camundongos, a expressão de AdipoR1 é mais abundante no tecido muscular
 441 esquelético e se liga primariamente com a adiponectina em sua forma globular, enquanto

442 AdipoR2 é expresso predominantemente no fígado e se liga com mais afinidade com as
443 formas completas (YAMAUCHI et al., 2003).

444



445

446 **Figura 3.** Vias de sinalização da adiponectina através da ativação dos receptores AdipoR1
447 e AdipoR2. Adaptado de Reverchon et al., 2014a.

448

449 Os efeitos celulares provocados pela adiponectina são mediados por diferentes vias de
450 sinalização envolvendo proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK),
451 receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa (PPAR α), proteínas-quinase
452 ativadas por mitógeno (MAPK-P38 e MAPK-ERK1/2) e proteína quinase B (Akt;
453 ANGELIDIS et al., 2013; REVERCHON et al., 2014a).

454

455 A atuação da adiponectina através do AdipoR1 promove um influxo de cálcio para
456 ativar a proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina (CaMK) e a AMPK que
457 exercem propriedades de sensibilização à insulina regulando positivamente a oxidação de
458 ácidos graxos, aumentando a absorção de glicose e diminuindo a glicogênese, atuando
459 assim no nível da glicose basal (YAMAUCHI et al., 2014). A atuação através do
459 AdipoR2, por sua vez, acarreta um aumento na produção de ligantes de PPAR α (DEEPA;
460 DONG, 2009; YAMAUCHI et al., 2014). A AMPK é a via mais comum pela qual a
461 adiponectina age nos tecidos alvo, atuando como um regulador chave do balanço
462 energético (SANTOS et al., 2012).

463

464 A sinalização dos receptores pode ser também modulada através da interação com
465 proteínas de adaptação APPL1 e APPL2, e essa interação tem sido apontada como o

465 mecanismo pelo qual a adiponectina sintetiza a ação e a sinalização da insulina. Neste
466 caso, a APPL2 atua como um regulador negativo da sinalização da adiponectina, visto
467 que ela se liga ao APPL1 diminuindo a interação entre este e a adiponectina (MAO et al.,
468 2006; WANG et al., 2009; XIN et al., 2011).

469

470 *2.3.3 Adiponectina e o sistema reprodutivo*

471

472 Os primeiros indícios de que a adiponectina teria uma função no sistema
473 reprodutivo foram a identificação dos receptores específicos para adiponectina, AdipoR1
474 e AdipoR2, em tecidos de diversos órgãos envolvidos na reprodução, e a observação do
475 dimorfismo sexual apresentado pela concentração de adiponectina circulante (PALIN;
476 BORDIGNON; MURPHY, 2012).

477 Estudos tem apontado a adiponectina como um sensor energético capaz de regular
478 a função gonadal masculina e feminina, por ser produzida localmente em órgãos
479 reprodutivos ou através de vias endócrinas, há indicações da sua influência na fertilidade
480 masculina e feminina (DUPONT et al., 2015).

481 É importante notar que, uma vez que a insulina e o IGF-1 tem um papel central na
482 regulação gonadotrófica e ovariana (MONNIAUX et al., 2009), a importância da
483 adiponectina na reprodução é, por um lado, consistente com o seu papel em outros tecidos,
484 que é a sensibilização à insulina (SANTOS et al., 2012).

485 A presença dos receptores AdipoR1 e AdipoR2 no sistema nervoso central e na
486 hipófise sugere que esta adipocina esteja envolvida no mecanismo de sinalização entre o
487 tecido adiposo e o cérebro para regular funções reprodutivas, e há evidências que sugerem
488 que a adiponectina regule essas funções através da modulação da secreção dos hormônios
489 gonadotróficos (PALIN; BORDIGNON; MURPHY, 2012).

490 Nos machos, a expressão de adiponectina e de seus receptores foi identificada em
491 células espermáticas de ovinos, sendo os níveis de transcrição significativamente maiores
492 em células de alta motilidade do que em células de baixa motilidade (KADIVAR et al.,
493 2016). As expressões de adiponectina, e seus receptores AdipoR1 e AdipoR2 também
494 foram observadas em testículos de galo, onde as expressões de ambos os receptores foram
495 maiores em galos adultos do que em galos pré-púberes, sugerindo uma associação com a
496 maturação sexual (OCÓN-GROVE et al., 2008); e foram observadas também as
497 expressões em testículos de camundongos (CAMINOS et al., 2008). Em ovinos,
498 transcritos da adiponectina, AdipoR1 e AdipoR2 foram detectados em diversos órgãos do

499 trato reprodutor masculino, como testículo, epidídimo, glândula vesicular e glândula
500 bulbouretral, enquanto apenas a adiponectina não foi identificada no ducto deferente
501 (RAHMANIFAR; TABANDEH, 2012).

502 Nas fêmeas, também há evidências da presença da adiponectina em diversos
503 órgãos do trato reprodutor. Adiponectina, AdipoR1 e AdipoR2 foram expressos no útero
504 de várias espécies como coelho (SCHMIDT et al., 2008), porco (LORD et al., 2005),
505 humanos (TAKEMURA et al., 2006) e roedores (KIM et al., 2011). Em suínos a
506 adiponectina e seus receptores foram identificados no endométrio e no miométrio,
507 apresentando maior expressão durante a fase folicular (SMOLINSKA et al., 2014). Em
508 humanos foram identificados no epitélio endometrial e no epitélio glandular, e para ambos
509 os receptores a expressão foi mais alta durante a fase secretora, ou progestacional do ciclo
510 menstrual (TAKEMURA et al., 2006).

511 No ovário, mais especificamente, a adiponectina foi identificada no fluido
512 folicular humano e suíno, e em diferentes tipos celulares como oócito, corpo lúteo e
513 células da teca em camundongos (CHABROLLE; TOSCA; DUPONT, 2007;
514 REVERCHON et al., 2014a). Já seus receptores específicos foram identificados nas
515 células foliculares (oócito, células do cumulus, células da granulosa e células da teca) de
516 diversas espécies, como bovinos (LAGALY et al., 2008; MAILLARD et al., 2010;
517 TABANDEH et al., 2010), galinhas (CHABROLLE et al., 2007), peixes (NISHIO et al.,
518 2008), humanos (COMIM; HARDY; FRANKS, 2013), suínos (CHAPPAZ et al., 2008)
519 e camundongos (CHABROLLE; TOSCA; DUPONT, 2007). AdipoR1 foi identificado
520 também em células da granulosa de folículos em crescimento de morcegos (SINGH;
521 KRISHNA, 2012).

522 Chabrolle et al. (2007) demonstraram que AdipoR1 e AdipoR2 são regulados pelo
523 tratamento de hCG em ovário de camundongos e a adiponectina aumenta a
524 esteroidogênese induzida por IGF-1 nas células da granulosa. Chappaz et al. (2008)
525 testaram a adição de adiponectina no meio de maturação de oócitos suínos e conseguiram
526 diminuir a frequência de oócitos meioticamente imaturos provenientes de folículos
527 grandes (3-6mm) mas não dos de folículos pequenos (<3mm) e, após teste adicionando
528 adiponectina juntamente com inibidores de MAPK, demonstrou que é através dessa via
529 que ocorre a atuação da mesma.

530 O mesmo estudo demonstrou uma maior taxa de blastocisto em embriões
531 cultivados na presença de adiponectina (CHAPPAZ et al., 2008). Em bovinos,
532 adiponectina, AdipoR1 e AdipoR2 foram identificadas em células foliculares de folículos

533 grandes e pequenos, mais precisamente no oócito, células da granulosa e células da teca,
534 porém a adição de adiponectina no meio de maturação não modificou a maturação e o
535 desenvolvimento embrionário *in vitro* (MAILLARD et al., 2010).

536 Tabandeh et al. (2010) estudaram a expressão da adiponectina e seus receptores
537 nas células foliculares em diferentes fases do desenvolvimento folicular em bovinos.
538 Observou-se que a expressão da adiponectina e seus receptores é mais fraca em células
539 da granulosa e células do cumulus quando comparadas com a expressão nas células da
540 teca, e que a expressão de AdipoR1 foi maior do que a de AdipoR2 nas células da teca e
541 da granulosa em folículos grandes, enquanto um padrão inverso foi observado nos oócitos
542 de folículos grandes. Foi observado também que a expressão da adiponectina nas células
543 da granulosa aumentou juntamente com o aumento do tamanho folicular (TABANDEH
544 et al., 2010).

545

546

547

548

549

550

551

552

553

554

555

556

557

558

559

560

561

562

563

564

565

566

567

568 **3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

569 ADAMIAK, S. J. et al. Impact of Nutrition on Oocyte Quality : Cumulative Effects of
570 Body Composition and Diet Leading to Hyperinsulinemia in Cattle. **Biology of**
571 **Reproduction**, v. 73, n. 5, p. 918–926, 2005.

572 ADAMS, G. P. et al. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle.
573 **Theriogenology**, v. 69, n. 1, p. 72–80, 2008.

574 AERTS, J. M. J.; BOLS, P. E. J. Ovarian follicular dynamics: A review with emphasis
575 on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development.
576 **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 1, p. 171–179, 2010.

577 ANGELIDIS, G. et al. The Emerging Roles of Adiponectin in Female Reproductive
578 System-Associated Disorders and Pregnancy. **Reproductive Sciences**, v. 20, n. 8, p. 872–
579 881, 2013.

580 BARNETT, K. R. et al. Ovarian follicle development and transgenic mouse models.
581 **Human Reproduction Update**, v. 12, n. 5, p. 537–555, 2006.

582 BATISTA, A. M. et al. The expression and localization of leptin and its receptor in goat
583 ovarian follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 141, n. 3–4, p. 142–147, 2013.

584 BEZERRA, M. B. et al. Aspectos quantitativos e qualitativos da foliculogênese pré-natal
585 na espécie caprina. **Ciencia Animal**, v. 8, n. 2, p. 47–56, 1998.

586 BRAW-TAL, R.; YOSSEFI, S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle
587 growth in the bovine ovary. **Journal of reproduction and fertility**, v. 109, n. 1, p. 165–
588 171, 1997.

589 BRUNET, S.; MARO, B. Cytoskeleton and cell cycle control during meiotic maturation
590 of the mouse oocyte: Integrating time and space. **Reproduction**, v. 130, n. 6, p. 801–811,
591 2005.

592 CAMINOS, J. E. et al. Novel expression and direct effects of adiponectin in the rat testis.
593 **Endocrinology**, v. 149, n. 7, p. 3390–3402, 2008.

594 CAMPOS, D. B. et al. The “beneficial” adipokines in reproduction and fertility.

595 **International Journal of Obesity (Lond)**, v. 32, n. 2, p. 223–231, 2008.

596 CERVERO, A. et al. The role of the leptin in reproduction. **Current Opinion in**
597 **Obstetrics & Gynecology**, v. 18, n. 3, p. 297–303, 2006.

598 CHABROLLE, C. et al. Expression of adiponectin and its receptors (AdipoR1 and
599 AdipoR2) in chicken ovary: Potential role in ovarian steroidogenesis. **Domestic Animal**
600 **Endocrinology**, v. 33, n. 4, p. 480–487, 2007.

601 CHABROLLE, C.; TOSCA, L.; DUPONT, J. Regulation of adiponectin and its receptors
602 in rat ovary by human chorionic gonadotrophin treatment and potential involvement of
603 adiponectin in granulosa cell steroidogenesis. **Reproduction**, v. 133, n. 4, p. 719–731,
604 2007.

605 CHAPPAZ, E. et al. Adiponectin enhances in vitro development of swine embryos.
606 **Domestic Animal Endocrinology**, v. 35, p. 198–207, 2008.

607 CHEN, J. et al. AMPK regulation of mouse oocyte meiotic resumption in vitro.
608 **Developmental Biology**, v. 291, n. 2, p. 227–238, 2006.

609 CHEN, X. et al. Adipokines in reproductive function: A link between obesity and
610 polycystic ovary syndrome. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 50, n. 2, 2013.

611 CHEN, Y.; PAN, R.; PFEIFER, A. Fat tissues, the brite and the dark sides. **Pflugers**
612 **Archiv European Journal of Physiology**, v. 468, p. 1–5, 2016.

613 CHUN, S. Y. et al. Hormonal Regulation of Apoptosis in Early Antral Follicles: Follicle-
614 Stimulating Hormone as a Major Survival Factor. **Endocrinology**, v. 137, n. 4, p. 1447–
615 14566, 1996.

616 COGNIÉ, Y. et al. Current status of embryo technologies in sheep and goat.
617 **Theriogenology**, v. 59, n. 1, p. 171–188, 2003.

618 COMIM, F. V.; HARDY, K.; FRANKS, S. Adiponectin and its receptors in the ovary:
619 Further evidence for a link between obesity and hyperandrogenism in polycystic ovary
620 syndrome. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. 1–9, 2013.

621 CONDE, J. et al. Adipokines: Biofactors from white adipose tissue. A complex hub
622 among inflammation, metabolism, and immunity. **BioFactors**, v. 37, n. 6, p. 413–420,

623 2011.

624 CORTEEL, J. M.; LEBOEUF, B.; BARIL, G. Artificial breeding of adult goats and kids
625 induced with hormones to ovulate outside the breeding season. **Small Ruminant**
626 **Research**, v. 1, n. 1, p. 19–35, 1988.

627 COUTINHO, M. J. F. et al. A pecuária como atividade estabilizadora no Semiárido
628 Brasileiro. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, n. 3, p. 9–17, 2013.

629 DE MOURA, P. R.; PINTO VIDAL, F. A. Transdução de sinais: Uma revisão sobre
630 proteína G. **Scientia Medica**, v. 21, n. 1, p. 1–11, 2011.

631 DE VANTÉRY, C. et al. Acquisition of meiotic competence in growing mouse oocytes
632 is controlled at both translational and posttranslational levels. **Developmental biology**,
633 v. 187, n. 1, p. 43–54, 1997.

634 DEEPA, S. S.; DONG, L. Q. APPL1: role in adiponectin signaling and beyond.
635 **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 296, n. 1, p. E22–
636 E36, 2009.

637 DRIANCOURT, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals.
638 Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1211–
639 1239, 2001.

640 DUPONT, J. et al. Involvement of adipokines, AMPK, PI3K and the PPAR signaling
641 pathways in ovarian follicle development and cancer. **International Journal of**
642 **Developmental Biology**, v. 56, n. 10–12, p. 959–967, 2012.

643 DUPONT, J. et al. Adipokines in human reproduction. **Hormone Molecular Biology**
644 **and Clinical Investigation**, v. 24, n. 1, p. 11–24, 2015.

645 EDSON, M. A.; NAGARAJA, A. K.; MATZUK, M. M. The mammalian ovary from
646 genesis to revelation. **Endocrine Reviews**, v. 30, n. 6, p. 624–712, out. 2009.

647 EPPIG, J. J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals.
648 **Reproduction**, v. 122, n. 6, p. 829–838, 2001.

649 EVANS, A. C. O. Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals.
650 **Reproduction in domestic animals**, v. 38, n. 4, p. 240–246, 2003.

651 FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal**
652 **Reproduction Science**, v. 78, n. 3–4, p. 203–216, 2003.

653 FAIR, T. Mammalian oocyte development: Checkpoints for competence. **Reproduction,**
654 **Fertility and Development**, v. 22, n. 1, p. 13–20, 2010.

655 FATET, A.; PELLICER-RUBIO, M. T.; LEBOEUF, B. Reproductive cycle of goats.
656 **Animal Reproduction Science**, v. 124, n. 3–4, p. 211–219, 2011.

657 GALIC, S.; OAKHILL, J. S.; STEINBERG, G. R. Molecular and Cellular
658 Endocrinology: Adipose tissue as an endocrine organ. **Molecular and Cellular**
659 **Endocrinology**, v. 316, p. 129–139, 2010.

660 GILCHRIST, R. B.; RITTER, L. J.; ARMSTRONG, D. T. Oocyte-somatic cell
661 interactions during follicle development in mammals. **Animal Reproduction Science**, v.
662 82–83, p. 431–446, 2004.

663 GOLDSTEIN, B. J.; SCALIA, R. G.; MA, X. L. Protective vascular and myocardial
664 effects of adiponectin. **Nature clinical practice. Cardiovascular medicine**, v. 6, n. 1, p.
665 27–35, 2009.

666 GORALSKI, K. B. et al. Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and
667 adipocyte metabolism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 38, p. 28175–28188,
668 2007.

669 GOTTARDI, F. P.; MINGOTI, G. Z. Bovine oocyte maturation and influence on
670 subsequent embryonic developmental competence. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 33, n. 2,
671 p. 82–94, 2009.

672 HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. . E. **Reprodução animal**. 7^a Edição ed. São Paulo: Manole,
673 2004.

674 HEIKINHEIMO, O.; GIBBONS, W. E. The molecular mechanisms of oocyte maturation
675 and early embryonic development are unveiling new insights into reproductive medicine.
676 **Mol Hum Reprod**, v. 4, n. 8, p. 745–756, 1998.

677 HILL, J. W.; ELMQUIST, J. K.; ELIAS, C. F. Hypothalamic pathways linking energy
678 balance and reproduction. **American journal of physiology. Endocrinology and**
679 **metabolism**, v. 294, n. 5, p. E827–E832, 2008.

680 HIRSHFIELD, A. N. Development of follicles in the mammalian ovary. **International**
681 **review of cytology**, v. 124, p. 43–101, 1991.

682 HUG, C. et al. T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms
683 of Acrp30/adiponectin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the**
684 **United States of America**, v. 101, n. 28, p. 10308–13, 2004.

685 HUNTER, R. H. F. **Physiology of the Graafian follicle and ovulation**. 1^a edição ed.
686 Cambridge, UK: [s.n.].

687 KADIVAR, A. et al. Correlation of Adiponectin mRNA abundance and its receptors with
688 quantitative parameters of sperm motility in rams. **International Journal of Fertility**
689 **and Sterility**, v. 10, n. 1, p. 127–135, 2016.

690 KADOWAKI, T. et al. Review series Adiponectin and adiponectin receptors in insulin
691 resistance , diabetes , and the metabolic syndrome. **The journal of clinical investigation**,
692 v. 116, n. 7, p. 1784–1792, 2006.

693 KAWWASS, J. F.; SUMMER, R.; KALLEN, C. B. Direct effects of leptin and
694 adiponectin on peripheral reproductive tissues: A critical review. **Molecular Human**
695 **Reproduction**, v. 21, n. 8, p. 617–632, 2015.

696 KIEFER, F. W. Browning and thermogenic programming of adipose tissue. **Best Practice**
697 **and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 30, n. 4, p. 479–485, 2016.

698 KIEZUN, M. et al. Adiponectin expression in the porcine pituitary during the estrous
699 cycle and its effect on LH and FSH secretion. **American journal of physiology.**
700 **Endocrinology and metabolism**, v. 307, n. 11, p. E1038-46, 2014.

701 KIM, D. H.; SEONG, H. H.; LEE, H. J. In vitro culture conditions for the mouse preantral
702 follicles isolated by enzyme treatment. **Asian-Australasian Journal of Animal**
703 **Sciences**, v. 21, n. 4, p. 532–537, 2008.

704 KIM, S. T. et al. Adiponectin and adiponectin receptors in the mouse preimplantation
705 embryo and uterus. **Human Reproduction**, v. 26, n. 1, p. 82–95, 2011.

706 KRISHER, R. L. The effect of oocyte quality on development. **Journal of animal**
707 **science.**, v. 82 E-Suppl, p. 14–23, 2004.

708 KUMAR, T. R. et al. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle
709 maturation but not male fertility. **Nature genetics**, v. 15, n. 2, p. 201–4, 1997.

710 LAGALY, D. V. et al. Role of adiponectin in regulating ovarian theca and granulosa cell
711 function. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 284, n. 1–2, p. 38–45, 2008.

712 LIMA, G. L.; SANTOS, É. A. A. DOS. Aplicação das biotécnicas de MOIFOPA,
713 transgênese e clonagem na reprodução de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 4, n.
714 0, p. 36–42, 2010.

715 LORD, E. et al. Expression of adiponectin and its receptors in swine. **Journal of Animal**
716 **Science**, v. 83, p. 565–578, 2005.

717 LUO, L.; LIU, M. Adipose tissue in control of metabolism. **Journal of Endocrinology**,
718 v. 231, n. 3, p. R77–R99, 2016.

719 MAILLARD, V. et al. Effect of adiponectin on bovine granulosa cell steroidogenesis,
720 oocyte maturation and embryo development. **Reproductive biology and**
721 **endocrinology : RB&E**, v. 8, p. 23, 2010.

722 MAILLARD, V. et al. Expression and effect of resistin on bovine and rat granulosa cell
723 steroidogenesis and proliferation. **Reproduction**, v. 141, n. 4, p. 467–479, 2011.

724 MAO, X. et al. APPL1 binds to adiponectin receptors and mediates adiponectin signalling
725 and function. **Nature cell biology**, v. 8, n. 5, p. 516–523, 2006.

726 MARDYŁA, A. R.-. Resistin – Adipocyte Hormone as a Regulator of Female
727 Reproduction. **Emergency Medicine: Open Access**, v. 2, n. 5, 2012.

728 MARTINS, F. S. et al. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Revista**
729 **Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 1, p. 36–49, 2008.

730 MAZERBOURG, S. et al. The insulin-like growth factor system: A key determinant role
731 in the growth and selection of ovarian follicles? A comparative species study.
732 **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, p. 247–258, 2003.

733 MERMILLOD, P. et al. Factors Affecting Oocyte Quality: Who is Driving the Follicle?
734 **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. SUPPL.2, p. 393–400, 2008.

735 MONNIAUX, D. et al. Développement folliculaire ovarien et ovulation chez les

736 mamíferes. **Productions Animales**, v. 22, n. 2, p. 59–76, 2009.

737 NISHIO, S. I. et al. Adiponectin and adiponectin receptor genes are coexpressed during
738 zebrafish embryogenesis and regulated by food deprivation. **Developmental Dynamics**,
739 v. 237, p. 1682–1690, 2008.

740 NOGUEIRAS, R. et al. Novel expression of resistin in rat testis: functional role and
741 regulation by nutritional status and hormonal factors. **Journal of cell science**, v. 117, p.
742 3247–3257, 2004.

743 NORRIS, R. P. et al. Mouse Ovarian Follicles : One of Two Paths To Meiotic
744 Resumption. **Development**, v. 135, n. 19, p. 3229–3238, 2009.

745 OCÓN-GROVE, O. M. et al. Adiponectin and its receptors are expressed in the chicken
746 testis: Influence of sexual maturation on testicular ADIPOR1 and ADIPOR2 mRNA
747 abundance. **Reproduction**, v. 136, n. 5, p. 627–638, 2008.

748 PAJVANI, U. B. et al. Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone
749 Acrp30/adiponectin: Implications for metabolic regulation and bioactivity. **Journal of**
750 **Biological Chemistry**, v. 278, n. 11, p. 9073–9085, 2003.

751 PALIN, M. F.; BORDIGNON, V. V.; MURPHY, B. D. Adiponectin and the Control of
752 Female Reproductive Functions. In: **Vitamins and Hormones**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc.,
753 2012. v. 90p. 239–287.

754 PARIMISSETTY, A. et al. Secret talk between adipose tissue and central nervous system
755 via secreted factors-an emerging frontier in the neurodegenerative research. **Journal of**
756 **neuroinflammation**, v. 13, n. 1, p. 67, 2016.

757 PAULA, N. R. D. O. et al. Embriões caprinos produzidos in vivo ou in vitro : técnicas ,
758 problemas e perspectivas. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 32, n. 1, p. 21–35, 2008.

759 PÉREZ-PÉREZ, A. et al. Role of leptin in female reproduction. **Clinical Chemistry and**
760 **Laboratory Medicine**, v. 53, n. 1, p. 15–28, 2015.

761 RAHMANIFAR, F.; TABANDEH, M. R. Adiponectin and its receptors gene expression
762 in the reproductive tract of ram. **Small Ruminant Research**, v. 105, n. 1–3, p. 263–267,
763 2012.

764 REVERCHON, M. et al. Chemerin inhibits IGF-1-induced progesterone and estradiol
765 secretion in human granulosa cells. **Human Reproduction**, v. 27, n. 6, p. 1790–1800,
766 2012.

767 REVERCHON, M. et al. Adipokines and the Female Reproductive Tract. **International**
768 **Journal of Endocrinology**, v. 2014, p. 10, 2014a.

769 REVERCHON, M. et al. Resistin in dairy cows: Plasma concentrations during early
770 lactation, expression and potential role in adipose tissue. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, 2014b.

771 REVERCHON, M. et al. CHEMERIN (RARRES2) decreases in vitro granulosa cell
772 steroidogenesis and blocks oocyte meiotic progression in bovine species. **Biology of**
773 **reproduction**, v. 90, n. 5, p. 102, 2014c.

774 RICHARDS, J. S. Hormonal Control of Gene Expression in the Ovary. **Endocrine**
775 **Reviews**, v. 15, n. 6, 1994.

776 RIET-CORREA, B. et al. Sistemas produtivos de caprinocultura leiteira no semiárido
777 paraibano: Caracterização, principais limitantes e avaliação de estratégias de intervenção.
778 **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 33, n. 3, p. 345–352, 2013.

779 RODRIGUES, R. O céu é o limite para o agronegócio brasileiro. **Revista Conjuntura**
780 **Econômica**, v. 60, n. 11, p. 14–15, 2006.

781 SÁNCHEZ, F.; SMITZ, J. Molecular control of oogenesis. **Biochimica et Biophysica**
782 **Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1822, n. 12, p. 1896–1912, 2012.

783 SANTOS, E. DOS et al. Adiponectin and Reproduction. In: **Vitamins and Hormones**.
784 v. 90p. 187–209.

785 SCARAMUZZI, R. J. et al. A model for follicle selection and the determination of
786 ovulation rate in the ewe. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 5, n. 5, p. 457–
787 478, 1993.

788 SCARAMUZZI, R. J. et al. Regulation of folliculogenesis and the determination of
789 ovulation rate in ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, n. 3, p.
790 444–467, 2011.

791 SCHMIDT, T. et al. Expression of adipokines in preimplantation rabbit and mice

792 embryos. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 129, n. 6, p. 817–825, 2008.

793 SHEN, C. J. et al. The concentrations of visfatin in the follicular fluids of women
794 undergoing controlled ovarian stimulation are correlated to the number of oocytes
795 retrieved. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 6, p. 1844–1850, 2010.

796 SILVA-SANTOS, K. C. et al. Ovarian follicle reserve: emerging concepts and
797 applications. **Animal Reproduction Science**, v. 10, n. 3, p. 180–186, 2013.

798 SINGH, A.; KRISHNA, A. Localization of adiponectin and its receptor and its possible
799 roles in the ovary of a vespertilionid bat, *Scotophilus heathi*. **General and Comparative**
800 **Endocrinology**, v. 176, p. 240–251, 2012.

801 SIRARD, M. A. Resumption of meiosis: Mechanism involved in meiotic progression and
802 its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1241–1254,
803 2001.

804 SMOLINSKA, N. et al. Expression of adiponectin and adiponectin receptors 1 (AdipoR1)
805 and 2 (AdipoR2) in the porcine uterus during the oestrous cycle. **Animal Reproduction**
806 **Science**, v. 146, n. 1–2, p. 42–54, 2014.

807 TABANDEH, M. R. et al. Changes in the gene expression of adiponectin and adiponectin
808 receptors (AdipoR1 and AdipoR2) in ovarian follicular cells of dairy cow at different
809 stages of development. **Theriogenology**, v. 73, n. 5, p. 659–669, 2010.

810 TAKEMURA, Y. et al. Expression of adiponectin receptors and its possible implication
811 in the human endometrium. **Endocrinology**, v. 147, n. 7, p. 3203–3210, 2006.

812 TEIXEIRA, I. A. M. et al. Inovações tecnológicas na caprinocultura Technological
813 innovation in goat production. **Rev. Bras. Saúde Prod. Anim**, v. 14, n. 1, p. 104–120,
814 2013.

815 TERSIGNI, C. et al. Adipokines: new emerging roles in fertility and reproduction.
816 **Obstetrical & gynecological survey**, v. 66, n. 1, p. 47–63, 2011.

817 TRAYHURN, P. Endocrine and signalling role of adipose tissue: New perspectives on
818 fat. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 184, n. 4, p. 285–293, 2005.

819 TRAYHURN, P.; BEATTIE, J. H. Physiological role of adipose tissue: white adipose

820 tissue as an endocrine and secretory organ. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 60,
821 n. 2001, p. 329–339, 2001.

822 TRAYHURN, P.; TEMPLE, N. J.; VAN AERDE, J. Evidence from immunoblotting
823 studies on uncoupling protein that brown adipose tissue is not present in the domestic pig.
824 **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 67, n. 12, p. 1480–1485, dez.
825 1989.

826 VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth,
827 differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p.
828 1717–1751, 2005.

829 WANG, C. et al. Yin-Yang regulation of adiponectin signaling by APPL isoforms in
830 muscle cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 46, p. 31608–31615, 2009.

831 WEBB, R.; ARMSTRONG, D. . Control of ovarian function; effect of local interactions
832 and environmental influences on follicular turnover in cattle: a review. **Livestock**
833 **Production Science**, v. 53, n. 2, p. 95–112, 1998.

834 XIN, X. et al. APPL1 mediates adiponectin-stimulated p38 MAPK activation by
835 scaffolding the TAK1-MKK3-p38 MAPK pathway. **American journal of physiology.**
836 **Endocrinology and metabolism**, v. 300, n. 1, p. E103-10, 2011.

837 YAMAUCHI, T. et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic
838 metabolic effects. **Nature**, v. 423, n. 6941, p. 762–769, 2003.

839 YAMAUCHI, T. et al. Adiponectin receptors: A review of their structure, function and
840 how they work. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**,
841 v. 28, n. 1, p. 15–23, 2014.

842

843

844

4 ARTIGO

4.1 Expressão de adiponectina e seus receptores (AdipoR1 e AdipoR2) no ovário caprino e efeito sobre a maturação nuclear de oócitos *in vitro*

Expression of adiponectin and its receptors (AdipoR1 and AdipoR2) in goat ovary and effect on oocyte nuclear maturation in vitro

Resumo

A adiponectina é uma adipocina majoritariamente secretada por adipócitos que está envolvida na regulação da função reprodutiva de machos e fêmeas. Seus níveis de circulação têm correlação inversa com a quantidade de tecido adiposo corporal e seus efeitos biológicos são mediados principalmente através de dois receptores, AdipoR1 e AdipoR2. O objetivo deste estudo foi verificar a presença do sistema adiponectina (Adiponectina, e seus receptores, AdipoR1 e AdipoR2) em ovário caprinos através de qPCR e imunohistoquímica. Além disso, avaliar o efeito da adição de adiponectina recombinante humana (5 e 10 µg/mL) sobre a maturação de oócitos caprinos *in vitro*. Nós demonstramos que o RNAm e proteína para o sistema adiponectina estão presentes no ovário caprino. A expressão gênica e proteica dos receptores AdipoR1 e AdipoR2 foi detectada nas células foliculares (oócito, *cumulus*, granulosa e teca) de pequenos e grandes folículos antrais, enquanto que RNAm de adiponectina não foi detectada em oócitos de pequenos e grandes folículos e em células do *cumulus* de grandes folículos antrais. Finalmente, a adição de adiponectina, nas concentrações testadas, durante a maturação *in vitro* afetou a porcentagem de oócitos em metafase II. Em conclusão, neste estudo, demonstramos a expressão da adiponectina e seus receptores AdipoR1 e AdipoR2 em folículos ovarianos de caprinos. Além disso, demonstrou-se que a adiponectina rh aumenta a progressão da maturação nuclear de oócitos caprinos *in vitro*.

Palavras-chave: folículo, ovário, caprinos, tecido adiposo, expressão gênica

Abstract

Adiponectin is a adipokine secreted mainly from adipocytes, involved in the control of male and female reproductive functions. Adiponectin circulating levels presents an inverse correlation with fat body mass and its biological effects are mediated mainly through two receptors AdipoR1 and AdipoR2. The aim of the present study, was to verify the expression of adiponectin system (Adiponectin and its receptors, AdipoR1 and AdipoR2) in goat ovary through qPCR and immunohistochemistry, and further investigate the *in vitro* effects of recombinant adiponectin (5 µg/mL and 10 µg/mL) on goat oocytes nuclear maturation. We demonstrated that adiponectin system's mRNA and proteins are present in goat ovary. Gene and protein expression of AdipoR1 and AdipoR2 were detected in follicular cells (oocyte, *cumulus*, granulosa and teca) of small and large antral follicles, while Adiponectin mRNA was not detected in small and large follicles oocytes, neither in large follicles *cumulus* cells. Finally, addition of adiponectin in maturation medium, in tested concentrations, affected the number of oocytes that reached metaphase II. In conclusion, in the present study, we demonstrated Adiponectin and its receptors AdipoR1 and AdipoR2 expression in goat ovarian follicles. Furthermore, was demonstrated that rh adiponectin increases nuclear maturation progression *in vitro* of goat oocyte.

Keywords: follicle, ovary, goat, adipose tissue, gene expression

927 **1. Introdução**

928 O aumento na produtividade dos animais de produção tem sido um tópico
929 constante na área de pesquisa, em resposta à demanda de consumo da população
930 (THORNTON, 2010). Neste contexto, o entendimento da fisiologia reprodutiva destes
931 animais torna-se chave para o aprimoramento das técnicas reprodutivas e,
932 conseqüentemente, o aumento desejado da produtividade.

933 Nos ruminantes, a função reprodutiva pode ser influenciada, em diferentes níveis
934 do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, por alterações energéticas relacionadas à
935 dieta (DUPONT; SCARAMUZZI; REVERCHON, 2014), sendo a relação entre o
936 balanço energético e a reprodução bastante conhecidos (GARCIA-GARCIA, 2012).

937 O tecido adiposo, antes reconhecido apenas por seu papel como reservatório de
938 energia, tem sido identificado como um importante modulador nesta relação
939 (ANGELIDIS et al., 2013; SANTOS et al., 2012). Agora reconhecido também como um
940 órgão endócrino, o tecido adiposo libera uma grande variedade de fatores proteicos
941 chamados adipocinas (TRAYHURN, 2005). Estas adipocinas tem implicações
942 importantes em diversos processos fisiológicos, entre eles a reprodução (REVERCHON
943 et al., 2014).

944 A adiponectina, uma proteína de peso molecular de 30 kDa e 244 aminoácidos, é
945 formada por uma sequência de sinal no terminal-N, uma sequência variável espécie-
946 dependente, um domínio de colágeno e um domínio globular no terminal-C
947 (GOLDSTEIN; SCALIA; MA, 2009; MAEDA et al., 1996). Sua secreção é
948 inversamente relacionada à quantidade de tecido adiposo (CAMPOS et al., 2008) e seus
949 níveis circulantes são duas a três vezes maiores nas fêmeas do que nos machos
950 (COMBS et al., 2003).

951 A atuação da adiponectina se dá através de dois receptores de membrana
952 específicos, AdipoR1 e AdipoR2 (YAMAUCHI et al., 2014), que são formados por sete
953 domínios transmembrana, porém, com o terminal-N no meio intracelular e o terminal-C
954 no meio extracelular, caracterizando uma orientação oposta à clássica dos receptores
955 acoplados às proteínas G (KADOWAKI; YAMAUCHI, 2005; YAMAUCHI et al.,
956 2003).

957 O sistema adiponectina foi identificado em diferentes órgãos do sistema
958 reprodutor das fêmeas de variadas espécies. Nas células ovarianas adiponectina,
959 AdipoR1 e AdipoR2 foram observados em bovinos (MAILLARD et al., 2010;
960 TABANDEH et al., 2010), aves (CHABROLLE et al., 2007; DIOT et al., 2015),
961 camundongos (CHABROLLE; TOSCA; DUPONT, 2007) e suínos (CHAPPAZ et al.,
962 2008). AdipoR1 e AdipoR2 foram ainda identificados nas células ovarianas de peixes
963 (NISHIO et al., 2008) e humanos (CHABROLLE et al., 2009; COMIM; HARDY;
964 FRANKS, 2013). A proteína da adiponectina foi visualizada também em células
965 foliculares de ovinos (ORTEGA et al., 2010).

966 Dados na literatura sugerem um efeito esteroideogênico da adiponectina na
967 função ovariana. Em suínos, estudos *in vitro* demonstraram que a adiponectina diminuiu
968 a secreção basal de testosterona nas células da teca interna e, nas células da granulosa,
969 aumentou a secreção de estradiol e, ainda, em combinação com insulina, aumentou a
970 secreção de progesterona (KIEZUN et al., 2014). Em células da granulosa primárias de
971 humanos, a adiponectina aumentou a secreção induzida por IGF-1 de progesterona e
972 estradiol (CHABROLLE et al., 2009). Em galináceos, a adiponectina também se
973 mostrou capaz de modificar o padrão de secreção de progesterona induzida por LH,
974 FSH ou IGF-1 nas células da granulosa (CHABROLLE et al., 2007).

975 O efeito desta adipocina foi também verificado na maturação de oócitos *in vitro*.
976 Em suínos a adiponectina provocou efeito positivo na maturação nuclear dos oócitos
977 tratados (CHAPPAZ et al., 2008), entretanto este efeito não foi observado na espécie
978 bovina (MAILLARD et al., 2010; DIVAR et al., 2016).

979 No que tange à espécie caprina não foram encontrados dados literários acerca do
980 sistema adiponectina e sua influência na reprodução da fêmea. Nesta perspectiva, este
981 trabalho tem como objetivo investigar a presença da adiponectina e seus receptores no
982 ovário caprino e sua provável ação sobre a maturação de oócitos *in vitro*.

983

984 **2. Material e Métodos**

985 *2.1. Coleta de tecidos*

986 Folículos antrais foram dissecados dos ovários de cabras adultas (*Capra hircus*),
987 coletados independentemente do estágio do ciclo estral, obtidos em abatedouro
988 comercial e transportados para o laboratório em solução salina sobre gelo. Os folículos
989 isolados, foram classificados de acordo com o diâmetro em pequenos (< 3 mm) e
990 grandes (≥ 3 mm) folículos antrais.

991 Os folículos foram agrupados (10-15 folículos/categoria) separadamente em
992 placas de petri em tampão fosfato salino (PBS) e, sob esteromicroscópio (Nikon
993 Corporation, Japão), foram então seccionados, e as células da granulosa (CG) aderidas à
994 parede do folículo removidas através de suaves raspagens com uma lâmina de bisturi.
995 Depois de remover todos os complexos *cumulus*-oócitos (COCs) da placa de petri, as
996 CG foram recuperadas por centrifugação a 1200 g por 1 min. Em seguida, as camadas
997 de células da teca (CT) foram agitadas em vortex por 1 min em 1 mL de PBS,
998 transferidas para 1 mL de tampão fresco e centrifugadas por mais 1 min. Os *pellets* de
999 CG e CT foram homogeneizados em 0,5 mL de TRI[®] Reagente (Invitrogen, Thermo

1000 Fisher Scientific, Inc., Carlsbad, CA, USA) e armazenados a – 80 °C, até à extração de
1001 RNA.

1002 Complexos *cumulus*-oócito foram aspirados a partir de pequenos e grandes
1003 folículos antrais. As células do *cumulus* foram mecanicamente separadas por cuidadosas
1004 e repetidas pipetagens até que nenhuma célula do *cumulus* aderente pudesse ser
1005 observada sob estereomicroscópio. *Pools* de 10-15 oócitos desnudos e células do
1006 *cumulus* de 10-15 COCs, de cada categoria de folículos, foram coletados e submetidos
1007 imediatamente à extração de RNA total utilizando TRI[®] Reagente. Seis amostras de
1008 cada *pool* de tecido foram analisadas.

1009 A contaminação cruzada de células da granulosa e da teca foi testada pela
1010 detecção de RNAm codificando as citocromos P450 aromatase (CYP19A1) e 17 α -
1011 hidroxilase (CYP17A1) em cada amostra por PCR como descrito por Batista et al.
1012 (2013). A presença de amplicons de CYP19A1 em amostras de teca ou de CYP17A1
1013 em amostras de granulosa indicou contaminação cruzada e tais amostras foram
1014 descartadas.

1015

1016 2.2. Extração de RNA total e síntese de cDNA

1017 O RNA total foi extraído de cada *pool* de células (oócito, células do *cumulus*,
1018 células da granulosa e células da teca) usando TRI[®] Reagente. As amostras foram
1019 homogeneizadas em 500 μ L de TRI[®] Reagente e extraída com 100 μ L de clorofórmio;
1020 após separação da fase aquosa, o RNA foi precipitado com isopropanol, lavadas em
1021 etanol 70% (v/v), e o *pellet* de RNA foi eluído em água MilliQ. Em seguida, para
1022 eliminação de possíveis resíduos de DNA, todas as amostras de RNA total foram
1023 tratadas com RNase-Free DNase (RQ1, Promega, Madison, USA), segundo o protocolo
1024 recomendado pelo fabricante. O RNA total foi quantificado medindo a absorbância a

1025 260 nm e a pureza do RNA foi determinada pela razão de absorvância a 260/280 nm
1026 utilizando um espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare Life Sciences).

1027 Para se obter o DNA complementar (cDNA), adicionou-se 2 µg de RNA total
1028 com 0,5 µg de hexâmeros aleatórios (Promega) e 0,5 µg de iniciador Oligo(dT)₁₅
1029 (Promega). A mistura foi então sujeita a desnaturação a 70°C durante 5 min e
1030 imediatamente arrefecida em água gelada durante 5 min. Subsequentemente,
1031 adicionaram-se 13 µL do *mix* constituído por 4 µL de 5× reaction buffer (GoScript™
1032 Promega), 4 µL de MgCl₂ (25 mM, Promega), 1 µL de solução de dNTP (0,5 mM,
1033 Promega), 1 µL de transcriptase reversa (GoScript™; Promega) e 3 µL de água livre de
1034 nuclease. As amostras foram submetidas a uma fase de anelamento a 25°C durante 5
1035 min, de extensão a 42°C durante 60 min e de inativação a 70°C durante 15 min.

1036

1037 2.3. *Real-time PCR*

1038 A reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (qPCR) foi
1039 realizada utilizando o Sistema PCR em Tempo-Real Rotor-Gene Q (Qiagen). Os
1040 oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram desenhados com base nas sequências
1041 publicadas para caprinos, Adiponectina (GenBank: KF452236.1), AdipoR1 (GenBank:
1042 HQ846828.1) e AdipoR2 (GenBank: JX573540.1). Os primers para os genes de
1043 referência gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e Ubiquitina (UBQ) foram
1044 descritos previamente (FROTA et al., 2011). A sequência dos oligonucleotídeos
1045 iniciadores e os números de acesso estão apresentados na Tabela 1.

1046 A qPCR foi realizada em volume de reação final de 15 µL contendo 2 µL da
1047 amostra padronizada em uma concentração de 500 µg/ml, 7,5 µL de qPCR Master Mix
1048 (GoTaq® qPCR Master Mix; Promega, Madison, USA), 0,5 µL de cada primer *forward* e
1049 *reverse* e 4,5 µL de água livre de nuclease. O protocolo utilizado consistiu de uma fase

1050 de ativação (95°C por 2 min), uma fase de desnovação (95°C por 15 seg.) seguida por
 1051 40 ciclos de anelamento/extensão (60°C por 60 seg.).

1052 **Tabela 1. Sequências de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a realização**
 1053 **da qPCR.**

1054

Gene		Sequências de oligonucleotídeos (5'-3')	N° GenBank
Adiponectina	Forward	5'-GCTCCGTGCTCCTCTATCTG-3'	KF452236.1
	Reverse	5'-CCGCATAGACCCCATGTGA-3'	
AdipoR1	Forward	5'-GAAGGTGGTGTTCGGGATGT-3'	HQ846828.1
	Reverse	5'-CAGTGTGGAAGAGCCAGGAG-3'	
AdipoR2	Forward	5'-GCTCTCAGGCTCAGGAAAGG-3'	JX573540.1
	Reverse	5'-AAGCCAGACGCCTCTACAAG-3'	
GAPDH	Forward	5'-TGTTTGTGATGGGCGTGAACCA-3'	AJ431207.1
	Reverse	5'-ATGGCGTGGACAGTGGTCATAA-3'	
Ubiquitina	Forward	5'-GAAGATGGCCGCACTCTTCTGAT-3'	GI:57163956
	Reverse	5'-ATCCTGGATCTTGGCCTTCACGTT-3'	
CYP17A1	Forward	5'-ACTGAATGCCTTTGCCCTGT-3'	AF251387
	Reverse	5'-CTGATTATGTTGGTGACCGCC-3'	
CYP19A1	Forward	5'-CATCCTCAATACCAGGTCCCA-3'	AY148883
	Reverse	5'-GGTTTCCTCTCCACATACCCA-3'	

1055

1056 As amostras foram mensuradas em duplicata, com controle negativo para cada
 1057 primer avaliado. O método delta-delta-CT ($\Delta\Delta Ct$) foi utilizado para transformar os
 1058 valores de CT em níveis de expressão normalizado (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

1059

1060 2.4. *Imunohistoquímica*

1061 Os ovários destinados aos estudos de imunohistoquímica foram fixados em
1062 paraformaldeído 4% em PBS durante 24 horas, e subsquentemente desidratados,
1063 diafanizados e incluídos em parafina. Secções seriadas de 4 µm foram montadas sobre
1064 lâminas silanizadas (S4651; Sigma, St. Louis, USA), secadas *overnight* a 37 °C,
1065 desparafinizadas em xilol e hidratadas em concentrações decrescentes de etanol.

1066 A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada por incubação dos tecidos em
1067 um reagente de bloqueio da peroxidase (Dako, Carpinteria, USA) por 30 minutos. A
1068 recuperação antigênica foi realizada pela imersão das secções em tampão citrato, pH 6.0
1069 em forno microondas. Em seguida, as reações inespecíficas foram bloqueadas com soro
1070 de cabra normal (1:10; Dako, Glostrup, Denmark) em PBS por 30 min. Anticorpos
1071 policlonais de coelhos anti-Adiponectina (N-20-R, sc-17044; Santa Cruz
1072 Biotechnology, Santa Cruz, USA), anti-AdipoR1 (H-40, sc-99183, Santa Cruz
1073 Biotechnology) ou anti-AdipoR2 (H-44, sc-99184; Santa Cruz Biotechnology) diluídos
1074 a 1:50 em tampão de bloqueio foram incubados com os tecidos *overnight* à 4 °C. Os
1075 anticorpos utilizados neste estudo são recomendados para detectar adiponectina e seus
1076 receptores na maioria das espécies animais, incluindo rato, humano, equino, suíno,
1077 canino e bovino. Em seguida, as secções foram lavadas em PBS, e então incubadas com
1078 um polímero conjugado a peroxidase (EnVision™ + Dual Link System-HRP; Dako,
1079 Carpinteria, USA), em câmara úmida à temperatura ambiente por 30 minutos. A
1080 imunomarcção foi revelada pela incubação à temperatura ambiente com 3-3'-
1081 diaminobenzidina (DAB, Dako). Finalmente, as secções foram contra-coradas com
1082 hematoxilina, fotografadas e avaliadas sob microscópio de luz Leica DM 500 acoplado
1083 com câmara Leica ICC50 HD e software LAS EZ 4.3 (Leica Biosystems Nussloch
1084 GmbH, Nussloch, Alemanha). Os controles negativos envolveram omissão do anticorpo

1085 primário do procedimento ou os anticorpos primários foram pré-incubados com
1086 peptídeo bloqueio (sc-17044 P, Santa Cruz Biotechnology) ou adiponectina na
1087 proporção de 1:100. Nenhuma imunoreação foi visualizada nas preparações controle.

1088

1089 2.5. *Maturação in vitro (MIV)*

1090 Ovários de cabras adultas foram coletados em abatedouro comercial e
1091 transportados para o laboratório a 38 °C em PBS contendo solução
1092 antibiótico/antimicótico (Ab/Am; 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina e
1093 0,25 µg/mL amfotericina B; Gibco, Life Technologies), nas duas horas seguintes ao
1094 abate. Os COCs foram obtidos por aspiração de folículos antrais entre 2 e 8 mm de
1095 diâmetro com agulha 18G conectada a seringa de 10 mL, previamente preenchida com 3
1096 mL de TCM199 tamponado com HEPES, suplementado com solução Ab/Am;
1097 selecionados sob estereomicroscópio (Nikon Corporation, Japão) e apenas aqueles com
1098 no mínimo uma camada de células do *cumulus* compacta e citoplasma homogêneo
1099 foram selecionados.

1100 Os COCs foram lavados três vezes em meio de maturação livre de soro (TCM-
1101 199-Bicarbonato, contendo 2 mM de L-glutamina, 0,3 mM de piruvato de sódio e 50
1102 µg/mL de gentamicina), e distribuídos aleatoriamente em placas de petri 35 mm (Nunc,
1103 Roskilde, Dinamarca) contendo 25-35 oócitos em gotas de 80 µL de meio de maturação
1104 livre de soro, suplementado ou não com adiponectina (0, 5 ou 10 µg/mL) ou 10% (v/v)
1105 de Soro Fetal Bovino (SFB) como controle positivo, sob óleo mineral. Os COCs foram
1106 cultivados por 27 h a 39 °C em atmosfera humidificada de 5% de CO₂. A adiponectina
1107 recombinante humana (rh) (adiponectina humana de comprimento total, RD
1108 172023100) derivada de células de mamíferos (células HEK 293) foi adquirida da

1109 BioVendor Laboratory Medicine (Heidelberg, Alemanha). Este experimento foi
1110 repetido sete vezes (n= 660 oócitos).

1111 Após o período de maturação, parte dos oócitos foram desnudados das células do
1112 *cumulus* por cuidadosas e repetidas pipetagens em PBS-PVP. Os oócitos desnudos
1113 foram incubados com 10 µg/mL Hoechst 33342 em PBS-PVP durante 30 min à
1114 temperatura ambiente, lavados três vezes em PBS-PVP e montados em lâminas com
1115 meio de montagem ProLong[®] Gold (Molecular Probes, Life Technologies), cobertos por
1116 lamínulas suportadas por colunas de parafina e seladas com verniz para unhas. As
1117 amostras foram observadas utilizando microscópio de fluorescência Zeiss Axioplan
1118 (Carl Zeiss, Inc., Göttingen, Alemanha). As imagens foram adquiridas usando o
1119 software AxioVision e uma câmera digital AxioCam MRm (Zeiss). Os oócitos foram
1120 classificados de acordo com a configuração nuclear como vesícula germinativa (GV),
1121 ruptura da vesícula germinativa (GVBD), metáfase I (MI) e metáfase II (MII).

1122

1123 2.6. Análise estatística

1124 Os dados categóricos foram analisados utilizando-se o Procedimento Glimmix
1125 do SAS ajustados para distribuição binomial e a função “*logit*” foi utilizada. No entanto
1126 devido ao resultado 0 ou 100%, algumas análises foram realizadas pelo Teste Exato de
1127 Fisher usando o procedimento FREQ do SAS.

1128 Os dados da qPCR são apresentados utilizando o método comparativo
1129 desenvolvido por Livak e Schmittgen (2001), utilizando células *cumulus* como
1130 referência para expressão relativa da abundância de RNAm, que foi ajustado para o
1131 valor relativo de 1. Os valores de *threshold* do ciclo delta (Δ CT) para cada gene alvo
1132 foram obtidos após normalização do valor CT do gene de referência. Os dados foram
1133 analisados utilizando o Δ CT com o procedimento Glimmix do SAS ajustado a uma

1134 distribuição Gaussiana e a função “*identify*” foi utilizada. Como efeito fixo do modelo
1135 foi considerado o tipo de célula (*cumulus*, oócito, granulosa e teca) e o tamanho
1136 folicular (< 3 mm ou ≥ 3 mm) e o efeito aleatório de cada *pool* de células. Os $\Delta\Delta CT$
1137 foram obtidos a partir de diferenças de ΔCT LSM de comparações entre pares entre
1138 tratamentos e a célula do *cumulus* foi utilizada como grupo de referência (YUAN et al.,
1139 2006). Os valores de expressão relativa foram obtidos aumentando a eficiência de
1140 amplificação de PCR ($E = 2$) para a potência $\Delta\Delta CT$ (YUAN et al., 2006). Os limites de
1141 confiança para a representação gráfica da expressão relativa foram gerados a partir dos
1142 valores inferiores e superiores do intervalo de confiança, obtidos através das diferenças
1143 de ΔCT da média dos quadrados mínimos como descrito por Yuan et al. (2006).

1144 Para os dados da maturação *in vitro*, o procedimento Glimmix do SAS foi
1145 utilizado ajustando-se para distribuição Gaussiana e a função “*identify*” foi utilizada. As
1146 variáveis foram analisadas por meio de um modelo matemático que incluiu efeito fixo
1147 de tratamento. O método residual foi utilizado para calcular os denominadores graus de
1148 liberdade para aproximar os testes F nos modelos mistos. A proporção relativa dos
1149 oócitos em cada estágio de maturação nuclear foi calculada com a seguinte equação:
1150 $\text{Proporção relativa} = \text{número de oócitos em cada estágio} / \text{total de oócitos}$. Todas as
1151 comparações estatísticas foram feitas utilizando médias ajustadas pelo método dos
1152 quadrados mínimos.

1153 Todos os resultados são apresentados como médias \pm erro padrão da média
1154 (SEM). As diferenças com $P \leq 0,05$ foram consideradas significativas e aquelas com
1155 $0,05 < P \leq 0,10$ foram consideradas tendências.

1156

1157

1158

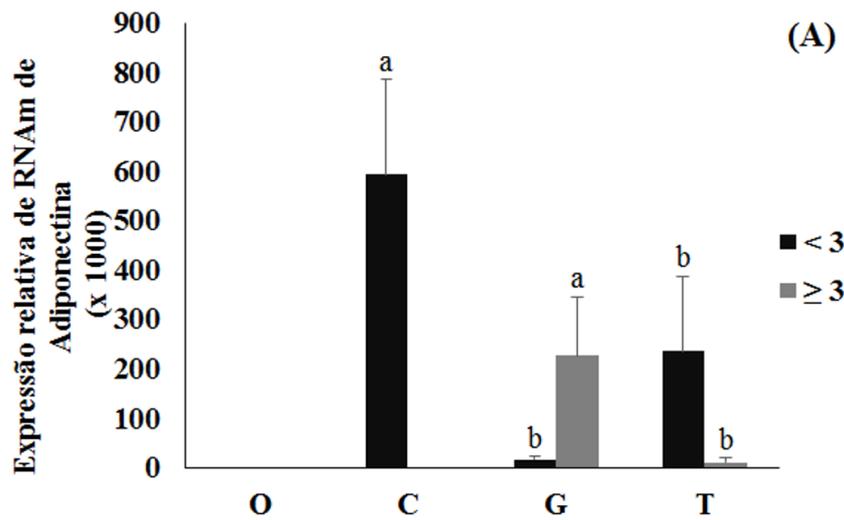
1159 **3. Resultados**

1160 *3.1. Análise da expressão gênica*

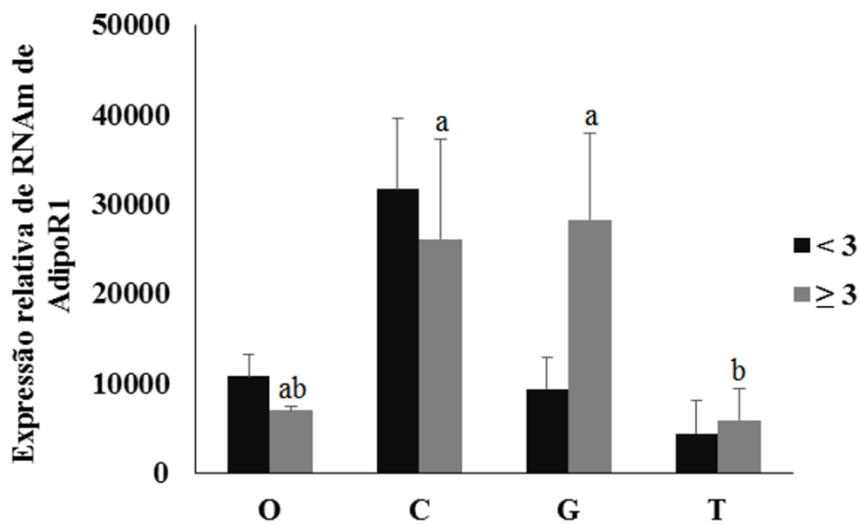
1161 A qPCR revelou a presença de RNAm de adiponectina nas células do *cumulus*
1162 de pequenos folículos e nas células da granulosa e teca em ambos os tamanhos
1163 foliculares, mas não nos oócitos, independente do tamanho, ou nas células do *cumulus*
1164 de grandes folículos (Figura 1A).

1165 Os níveis de RNAm de adiponectina em pequenos folículos antrais, foram
1166 significativamente maiores ($P < 0,05$) nas células do *cumulus* comparado com as células
1167 da granulosa e da teca, e os níveis de RNAm não diferiram entre a teca e granulosa. Em
1168 grandes folículos antrais, os níveis de RNAm de adiponectina foram significativamente
1169 maiores ($P < 0,05$) na granulosa quando comparados com os das células da teca (Figura
1170 1A).

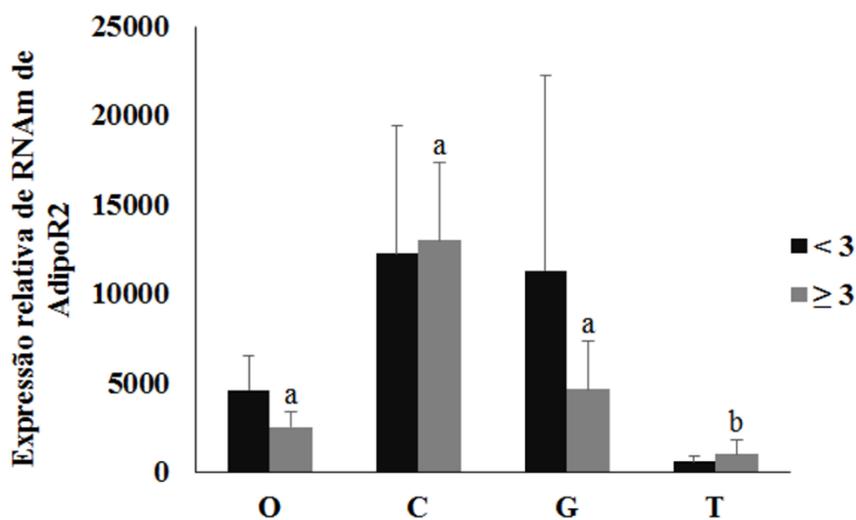
1171 Foram detectadas expressões dos receptores AdipoR1 e AdipoR2 para todos os
1172 tipos celulares avaliados (oócitos, células do *cumulus*, células da granulosa e células da
1173 teca) de pequenos e grandes folículos antrais. A expressão dos receptores AdipoR1 e
1174 AdipoR2 apresentaram diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os tipos celulares
1175 oriundos apenas de grandes folículos antrais. As células da teca apresentaram níveis de
1176 RNAm para AdipoR1 significativamente ($P < 0,05$) inferiores quando comparados com
1177 os outros tipos celulares (Figura 1B). Os níveis de expressão para AdipoR2 também
1178 foram significativamente ($P < 0,05$) menores nas células da teca quando comparados
1179 com células do *cumulus* e granulosa, entretanto não diferiu ($P > 0,05$) quando
1180 comparados com os oócitos (Figura 1C).



1181



1182



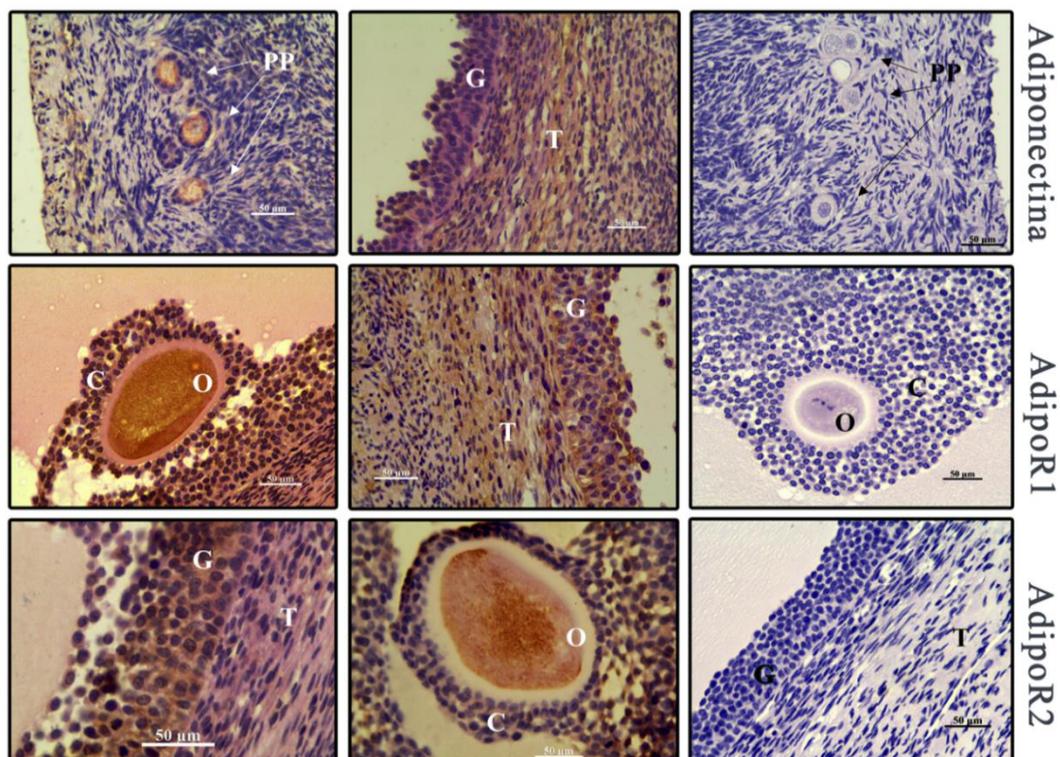
1183

1184 **Figura 1. Níveis relativos de mRNA.** Níveis relativos de mRNA de Adiponectina (A);
 1185 AdipoR1 (B) e AdipoR2 (C). Oócito – O; Células do *Cumulus* – C; Células da
 1186 Granulosa – G; Células da Teca – T. Pequenos (<math>< 3</math> mm) e grandes (≥ 3 mm) folículos

1187 antrais. Valores arbitrários. Letras minúsculas diferentes representam diferenças
1188 significativas ($P < 0,05$) entre tipos celulares em um mesmo grupo.
1189

1190 3.2. Análise da expressão proteica

1191 Foi observada imunomarcagem referente à adiponectina e seus receptores em
1192 todas as células foliculares de folículos em todas as fases de desenvolvimento (Figura
1193 2). As lâminas dos controles negativos não apresentaram imunomarcagem. Os oócitos de
1194 todos os folículos observados apresentaram marcação mais intensa do que os outros
1195 tipos celulares para os três anticorpos.

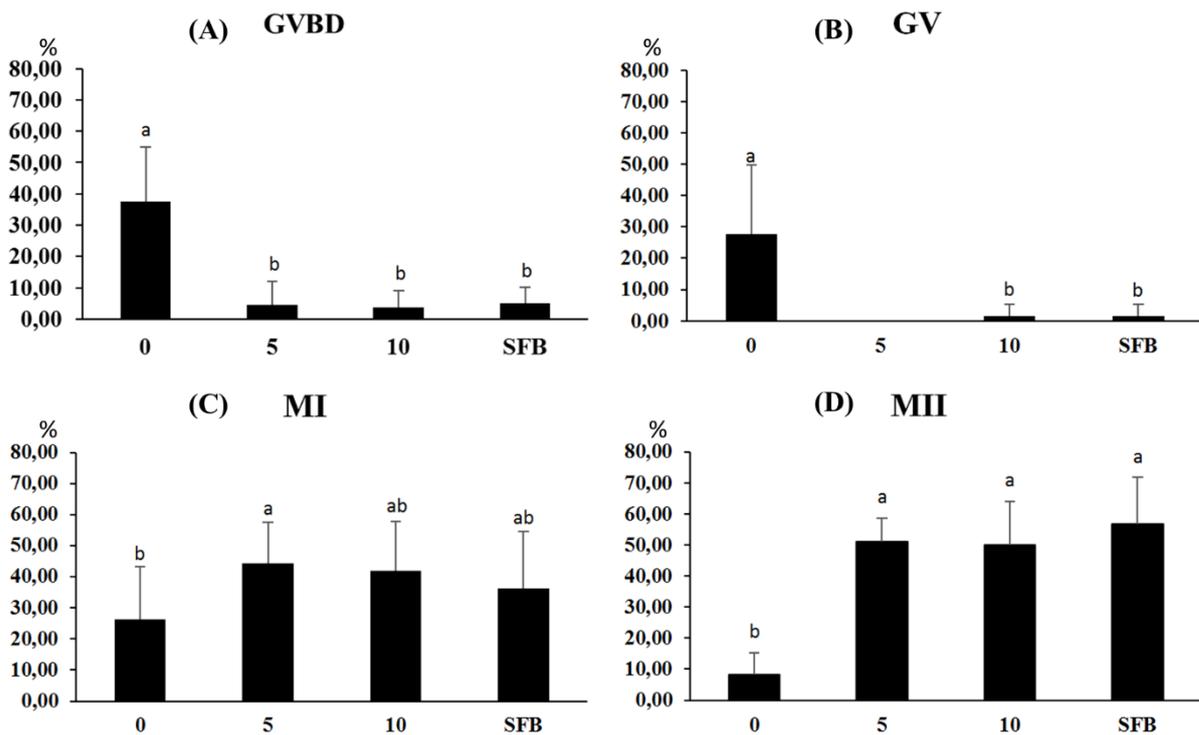


1196

1197 **Figura 2. Localização de adiponectina, AdipoR1 e AdipoR2 em ovários caprinos**
1198 **por imunohistoquímica.** A imunomarcagem positiva de adiponectina, AdipoR1 e
1199 AdipoR2 foi observada em folículos primordiais (PP), folículos primários (PM) e em
1200 células da granulosa (G), células da teca (T), células do *cumulus* (C) e oócitos (O) de
1201 folículos antrais. Nenhuma marcação foi observada no controle negativo.
1202

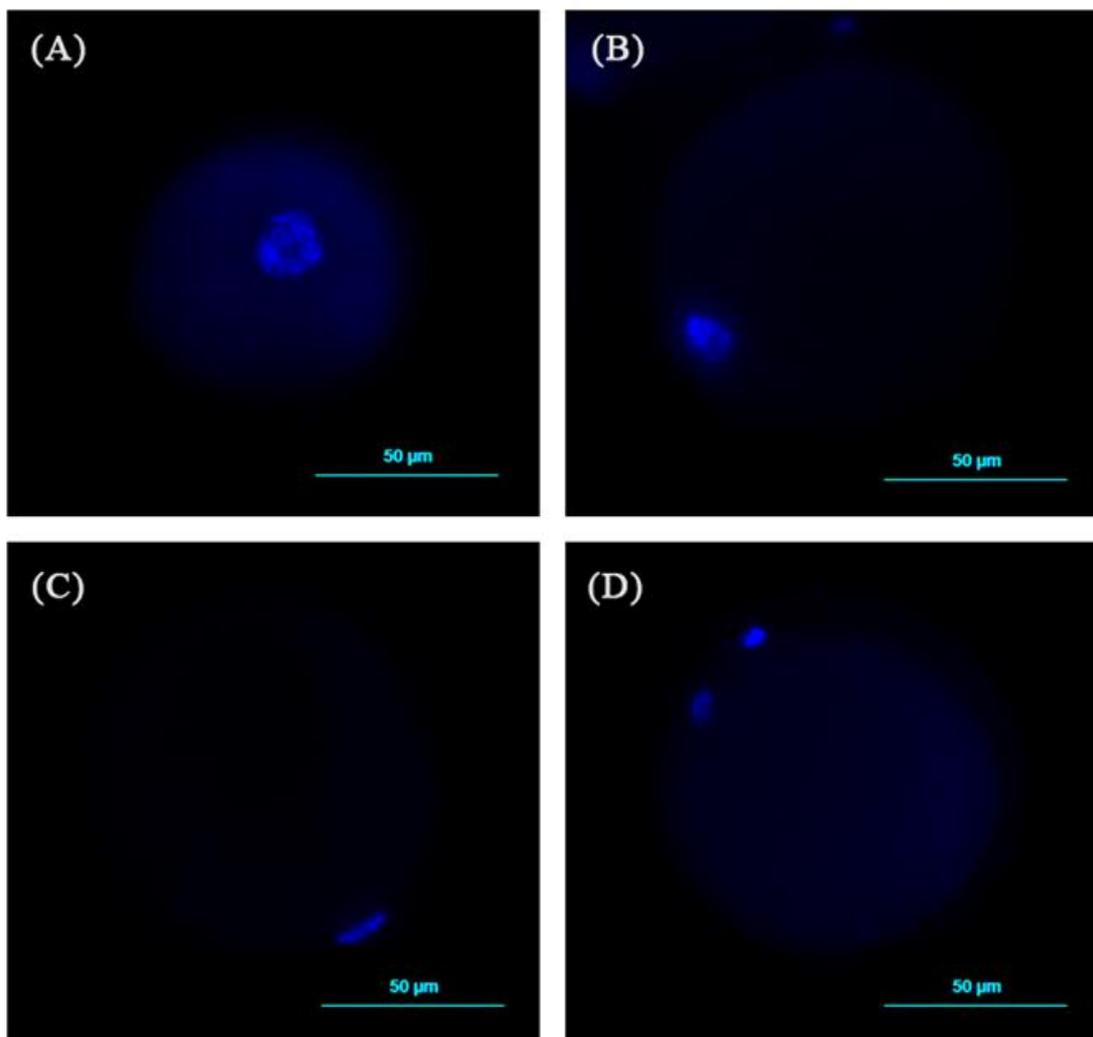
1203 3.3 Efeitos da adiponectina sobre a progressão meiótica

1204 A Figura 3 apresenta os dados para os efeitos da adiponectina sobre a maturação
 1205 meiótica de oócitos caprinos. Quando comparado ao grupo controle, a proporção de
 1206 oócitos bloqueados nos estágios de GV ou GVBD (Figura 4 A-B) foram
 1207 significativamente reduzidos ($P < 0,05$) nos grupos 5 ou 10 $\mu\text{g/mL}$ de adiponectina. A
 1208 maturação na presença de 5 $\mu\text{g/mL}$ de adiponectina, resultou em maiores taxas de
 1209 metáfase I (MI) comparado ao grupo sem adiponectina ($P < 0,05$; Figura 4C). Enquanto
 1210 que a proporção de oócitos que progrediram ao estágio de MII foi significativamente
 1211 maior ($P < 0,05$), nos grupos 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ de adiponectina (Figura 4D). Os grupos
 1212 suplementados com adiponectina apresentaram percentuais similares de metáfase II
 1213 (MII) comparado ao grupo cultivado com SFB.



1214

1215 **Figura 3. Taxa de maturação nuclear.** Taxa em porcentagem de oócitos por estágio
 1216 de maturação nuclear (GV, GVBD, MI e MII) por grupo tratamento (0, 5 ou 10 $\mu\text{g/mL}$
 1217 de adiponectina rh) ou 10% de Soro Fetal Bovino (SFB). Diferentes letras minúsculas
 1218 representam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os grupos tratamento por estágio de
 1219 maturação nuclear.



1220

1221 **Figura 4. Estágios da maturação nuclear.** Imagens representativa dos estágios de
1222 maturação nuclear dos oócitos corados com bis-benzamida (Hoechst 33342) e avaliados
1223 sob microscópio de fluorescência. (A) Vesícula Germinativa – GV; (B) ruptura da
1224 vesícula germinativa – GVBD; (C) Metáfase I – MI; (D) Metáfase II – MII.

1225

1226 4. Discussão

1227 Neste estudo foi demonstrada a presença do sistema adiponectina nas células
1228 foliculares de caprinos. Embora a expressão e a imunolocalização do sistema
1229 adiponectina já tenha sido estudada em outras espécies, bem como em diferentes tipos
1230 celulares, a expressão gênica e proteica da adiponectina e seus receptores não havia sido
1231 estudada em caprinos.

1232 Nossos resultados demonstraram que não foi possível detectar o RNAm da

1233 adiponectina em oócitos de pequenos e grandes folículos antrais caprinos, assim como
1234 nas células do *cumulus* provenientes de grandes folículos antrais. Estes resultados
1235 divergem dos demonstrados por Maillard et al. (2010) e Tabandeh et al. (2010), os quais
1236 demonstraram expressão da adiponectina em oócitos e células do *cumulus* de folículos
1237 antrais bovinos.

1238 Quantitativamente, a expressão relativa de adiponectina nas células do *cumulus*
1239 foi significativamente maior do que nas células da granulosa e da teca de pequenos
1240 folículos. Nos folículos grandes, a expressão relativa na granulosa se mostrou
1241 significativamente maior quando comparada com a das células da teca. Esses dados
1242 revelam uma divergência do que foi observado em ovários de galináceos, nos quais a
1243 expressão de adiponectina nas células da teca foi 10-30 vezes maior do que nas células
1244 da granulosa (CHABROLLE et al., 2007). Além disso, em camundongos a expressão da
1245 adiponectina também foi menor em células da granulosa (CHABROLLE; TOSCA;
1246 DUPONT, 2007). Maillard et al. (2010), por outro lado, observaram uma boa expressão
1247 de adiponectina nas células da granulosa de bovinos.

1248 A análise da expressão dos dois receptores evidenciou uma expressão diminuída
1249 de AdipoR1 e Adipo2 nas células da teca de folículos grandes, quando comparada com
1250 a expressão dos receptores nas células da granulosa. Estes resultados divergem dos
1251 encontrados por Tabandeh et al. (2010) em bovinos, onde a expressão de AdipoR1 e
1252 AdipoR2 foi maior nas células da teca de folículos grandes. Difere também dos
1253 resultados observados em camundongos, nos quais a expressão dos receptores nas
1254 células da granulosa foi menor do que nas células da teca (CHABROLLE; TOSCA;
1255 DUPONT, 2007). Porém, resultados semelhantes aos que obtivemos foram observados
1256 em galináceos, onde a expressão de AdipoR1 foi duas vezes maior em células da
1257 granulosa do que em células da teca e a expressão de AdipoR2 foi similar nos dois tipos

1258 celulares (CHABROLLE et al., 2007). Esta discrepância aponta para um modo de ação
1259 espécie-específico do sistema adiponectina sobre o desenvolvimento folicular.

1260 No presente estudo, a proteína da adiponectina e seus receptores AdipoR1 e
1261 AdipoR2 foram imunolocalizados em oócitos, células do *cumulus*, células da granulosa
1262 e teca dos folículos ovarianos em todas as fases de desenvolvimento. Estes achados
1263 corroboram com aqueles obtidos em ovários de bovinos (MAILLARD et al., 2010),
1264 camundongos (CHABROLLE et al., 2007) e humanos (COMIM et al., 2013), e
1265 contribuem para aumentar as evidências em torno da relevância fisiológica deste
1266 hormônio sobre a função ovariana.

1267 Apesar de não expressar RNAm para adiponectina, a proteína está presente de
1268 forma clara nos oócitos, indicando que a adiponectina deve ser produzida em outro local
1269 e em seguida transportada para o oócito. Sua produção por células somáticas ovarianas
1270 circundantes supriria o oócito com uma fonte de adiponectina, e muitas destas células
1271 (*cumulus*, granulosa e teca) mostraram produzir adiponectina, sugerindo uma ação
1272 parácrina. Uma ação endócrina também pode ser sugerida, uma vez que a adiponectina
1273 está presente no fluido folicular de caprinos (WANG et al., 2016).

1274 A maturação meiótica do oócito e a aquisição de competência de
1275 desenvolvimento é um processo fisiológico essencial para sobrevivência das espécies. A
1276 presença de RNAm e proteína de AdipoR1 e AdipoR2 em ambos oócitos e células do
1277 *cumulus*, sugerem que ambos os tipos celulares são sensíveis à adiponectina, e que a
1278 adiponectina também pode afetar a maturação do oócito.

1279 No presente trabalho, nós demonstramos que a adição de adiponectina (5 ou 10
1280 µg/mL) durante a MIV afetou a maturação meiótica de oócitos caprinos. Entretanto,
1281 resultados controversos têm sido reportados na literatura. Em bovinos, a suplementação
1282 do meio MIV com adiponectina (5 ou 10 µg/mL) não afetou a maturação meiótica de

1283 oócitos bovinos (MAILLARD et al. 2010; DIVAR et al., 2016). Em suínos, no entanto,
1284 Chappaz et al. (2008) reportaram que a adiponectina suína recombinante (30 µg/mL)
1285 diminuiu significativamente a proporção de oócitos imaturos, sugerindo uma aceleração
1286 da maturação meiótica do oócito suíno pela adiponectina.

1287 Estes resultados aparentemente controversos da MIV relatados na literatura são
1288 provavelmente dependentes das espécies estudadas ou do meio de cultura utilizado. O
1289 experimento descrito no presente trabalho foi realizado em meio isento de soro na
1290 ausência de qualquer fator de crescimento ou hormônio além da adiponectina. No
1291 entanto, os outros estudos usualmente adicionaram gonadotropinas, ou fatores de
1292 crescimento aos meios de cultura; Estes aditivos poderiam ter influenciado a ação da
1293 adiponectina ou afetado as suas vias de atuação, mostrando respostas diferentes. Assim,
1294 as possíveis interações entre eles e as possíveis vias pelas quais a adiponectina afeta a
1295 maturação do oócito permanecem obscuras e necessitam de futuras investigações.

1296 Em conclusão, neste estudo, demonstramos a expressão do sistema adiponectina
1297 e seus receptores AdipoR1 e AdipoR2 em folículos ovarianos de caprinos. Além disso,
1298 demonstrou-se que a adiponectina aumenta a progressão da maturação nuclear de
1299 oócitos caprinos *in vitro*. Os presentes achados provêm evidências para ações
1300 parácrina/autócrina do hormônio analisado. Entretanto, futuros estudos são necessários
1301 para elucidar os mecanismos envolvidos no efeito da adiponectina sobre a maturação
1302 meiótica e entender o potencial papel do sistema adiponectina na fertilidade de caprinos.

1303

1304 **Declaração de interesses dos autores**

1305 Não há interesses concorrentes que tenham sido declarados.

1306

1307

1308 **Fonte de financiamento**

1309 Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do
1310 Estado de Pernambuco (FACEPE) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal
1311 de Nível Superior (CAPES).

1312

1313 **Agradecimentos**

1314 Os autores agradecem a FACEPE e à CAPES pelo financiamento da pesquisa.

1315

1316 **Referências**

1317 ANGELIDIS, G. et al. The Emerging Roles of Adiponectin in Female Reproductive
1318 System-Associated Disorders and Pregnancy. **Reproductive Sciences**, v. 20, n. 8, p.
1319 872–881, 2013.

1320 CAMPOS, D. B. et al. The “beneficial” adipokines in reproduction and fertility.

1321 **International Journal of Obesity (Lond)**, v. 32, n. 2, p. 223–231, 2008.

1322 CHABROLLE, C. et al. Expression of adiponectin and its receptors (AdipoR1 and

1323 AdipoR2) in chicken ovary: Potential role in ovarian steroidogenesis. **Domestic Animal**

1324 **Endocrinology**, v. 33, n. 4, p. 480–487, 2007.

1325 CHABROLLE, C. et al. Adiponectin increases insulin-like growth factor I-induced

1326 progesterone and estradiol secretion in human granulosa cells. **Fertility and Sterility**,

1327 v. 92, n. 6, p. 1988–1996, 2009.

1328 CHABROLLE, C.; TOSCA, L.; DUPONT, J. Regulation of adiponectin and its

1329 receptors in rat ovary by human chorionic gonadotrophin treatment and potential

1330 involvement of adiponectin in granulosa cell steroidogenesis. **Reproduction**, v. 133, n.

1331 4, p. 719–731, 2007.

- 1332 CHAPPAZ, E. et al. Adiponectin enhances in vitro development of swine embryos.
1333 **Domestic Animal Endocrinology**, v. 35, p. 198–207, 2008.
- 1334 COMBS, T. P. et al. Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging
1335 affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin. **Diabetes**, v. 52, p. 268–276,
1336 2003.
- 1337 COMIM, F. V.; HARDY, K.; FRANKS, S. Adiponectin and its receptors in the ovary:
1338 Further evidence for a link between obesity and hyperandrogenism in polycystic ovary
1339 syndrome. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. 1–9, 2013.
- 1340 DIOT, M. et al. Expression of adiponectin, chemerin and visfatin in plasma and
1341 different tissues during a laying season in turkeys. **Reproductive biology and
1342 endocrinology : RB&E**, v. 13, p. 81, 2015.
- 1343 DIVAR, M. R. et al. The In Vitro Effect of Adiponectin on Early Bovine Embryonic
1344 Development and Transcriptomic Markers of Oocyte Competence. **Journal of
1345 Fertilization: In Vitro - IVF-Worldwide, Reproductive Medicine, Genetics & Stem
1346 Cell Biology**, v. 4, n. 1, p. 1–7, 2016.
- 1347 DUPONT, J.; SCARAMUZZI, R. J.; REVERCHON, M. The effect of nutrition and
1348 metabolic status on the development of follicles, oocytes and embryos in ruminants.
1349 **Animal**, v. 8, n. 7, p. 1031–1044, 2014.
- 1350 FROTA, I. M. A et al. Stability of housekeeping genes and expression of locally
1351 produced growth factors and hormone receptors in goat preantral follicles. **Zygote
1352 (Cambridge, England)**, v. 19, n. 1, p. 71–83, 2011.
- 1353 GARCIA-GARCIA, R. M. Integrative control of energy balance and reproduction in
1354 females. **ISRN veterinary science**, v. 2012, p. 1–13, 2012.

1355 GOLDSTEIN, B. J.; SCALIA, R. G.; MA, X. L. Protective vascular and myocardial
1356 effects of adiponectin. **Nature clinical practice. Cardiovascular medicine**, v. 6, n. 1,
1357 p. 27–35, 2009.

1358 KADOWAKI, T.; YAMAUCHI, T. Adiponectin and adiponectin receptors. **Endocrine**
1359 **Reviews**, v. 26, n. 3, p. 439–451, 2005.

1360 KIEZUN, M. et al. Adiponectin expression in the porcine pituitary during the estrous
1361 cycle and its effect on LH and FSH secretion. **American journal of physiology.**
1362 **Endocrinology and metabolism**, v. 307, n. 11, p. E1038-46, 2014.

1363 LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using
1364 real-time quantitative PCR. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

1365 MAEDA, K. et al. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-
1366 like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). **Biochemical and**
1367 **biophysical research communications**, v. 221, p. 286–289, 1996.

1368 MAILLARD, V. et al. Effect of adiponectin on bovine granulosa cell steroidogenesis,
1369 oocyte maturation and embryo development. **Reproductive biology and**
1370 **endocrinology : RB&E**, v. 8, p. 23, 2010.

1371 NISHIO, S. I. et al. Adiponectin and adiponectin receptor genes are coexpressed during
1372 zebrafish embryogenesis and regulated by food deprivation. **Developmental Dynamics**,
1373 v. 237, p. 1682–1690, 2008.

1374 ORTEGA, H. H. et al. Developmental programming: effect of prenatal steroid excess on
1375 intraovarian components of insulin signaling pathway and related proteins in sheep.
1376 **Biology of reproduction**, v. 82, n. 6, p. 1065–1075, 2010.

- 1377 REVERCHON, M. et al. Adipokines and the Female Reproductive Tract. **International**
1378 **Journal of Endocrinology**, v. 2014, p. 10, 2014.
- 1379 SANTOS, E. DOS et al. Adiponectin and Reproduction. In: **Vitamins and Hormones**.
1380 [s.l: s.n.], v. 90p. 187–209.
- 1381 TABANDEH, M. R. et al. Changes in the gene expression of adiponectin and
1382 adiponectin receptors (AdipoR1 and AdipoR2) in ovarian follicular cells of dairy cow at
1383 different stages of development. **Theriogenology**, v. 73, n. 5, p. 659–669, 2010.
- 1384 THORNTON, P. K. Livestock production: recent trends, future prospects.
1385 **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological**
1386 **sciences**, v. 365, p. 2853–2867, 2010.
- 1387 TRAYHURN, P. Endocrine and signalling role of adipose tissue: New perspectives on
1388 fat. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 184, n. 4, p. 285–293, 2005.
- 1389 YAMAUCHI, T. et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic
1390 metabolic effects. **Nature**, v. 423, n. 6941, p. 762–769, 2003.
- 1391 YAMAUCHI, T. et al. Adiponectin receptors: A review of their structure, function and
1392 how they work. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and**
1393 **Metabolism**, v. 28, n. 1, p. 15–23, 2014.
- 1394 YUAN, J. S. et al. Statistical analysis of real-time PCR data. **BMC Bioinformatics**, v.
1395 7, p. 85, 2006.
- 1396

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo identificou a presença da adiponectina e de seus receptores, AdipoR1 e AdipoR2, nas células foliculares de caprinos, além de demonstrar a ação positiva da adição da adiponectina no meio de maturação de oócitos caprinos.

Os resultados deste estudo sugerem um papel para adiponectina na função ovariana em caprinos. Permanece, no entanto, para ser determinado a importância da produção local desta adipocina dentro do ovário. Neste contexto, expandir as pesquisas para as vias moleculares de sinalização para melhorar a compreensão do seu mecanismo de ação e por conseguinte sua importância na função ovariana, se faz necessário.