



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

ADRIANO FELIPE MENDES

**AVALIAÇÃO DO USO DE SOF (FLUIDO DE OVIDUTO SINTÉTICO) E CLA
(ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO) NA EXPRESSÃO GÊNICA DE GENES
RELACIONADOS AO METABOLISMO LIPÍDICO E MATURAÇÃO OOCITÁRIA EM
COCs (COMPLEXOS *CUMULUS*-OÓCITO) BOVINOS**

Presidente Prudente - SP
2019



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

ADRIANO FELIPE MENDES

**AVALIAÇÃO DO USO DE SOF (FLUIDO DE OVIDUTO SINTÉTICO) E CLA
(ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO) NA EXPRESSÃO GÊNICA DE GENES
RELACIONADOS AO METABOLISMO LIPÍDICO E MATURAÇÃO OOCITÁRIA EM
COCs (COMPLEXOS *CUMULUS*-OÓCITO) BOVINOS**

Defesa apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre – Área de concentração: Fisiopatologia animal

Orientadora:
Profa. Dra. Caliê Castilho

Presidente Prudente - SP
2019

636.036
M538a

Mendes, Adriano Felipe.

Avaliação do uso de SOF (Fluido de Oviduto Sintético) e CLA (Ácido Linoleico Conjugado) na expressão gênica de genes relacionados ao metabolismo lipídico e maturação oocitária em COCs (complexos *cumulus*-oócito) bovinos / Adriano Felipe Mendes. – Presidente Prudente, 2019.

32 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2019.

Bibliografia.

Orientadora: Caliê Castilho.

1. *COX2*. 2. *FADS2*. 3. *GREM1*. 4. *PTGS2*. 5. *SCD1*.
I. Título.

ADRIANO FELIPE MENDES

**AVALIAÇÃO DO USO DE SOF (FLUIDO DE OVIDUTO SINTÉTICO) E CLA
(ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO) NA EXPRESSÃO GÊNICA DE GENES
RELACIONADOS AO METABOLISMO LIPÍDICO E MATURAÇÃO OOCITÁRIA EM
COCs (COMPLEXOS *CUMULUS*-OÓCITO) BOVINOS**

Defesa apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre - Área de Concentração: Fisiopatologia Animal

Presidente Prudente, 23 de setembro de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Orientadora Caliê Castilho
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Profa. Dra. Gisele Zoccal Mingoti
Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”
Araçatuba-SP

Profa. Dra. Ines Cristina Giometti Ceda
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à minha família: minha mãe, Elza Aparecida Mendes, minhas irmãs Adriana Mendes e Andréia Aparecida Mendes, meu irmão André Luiz Mendes e meu pai Luiz Felipe Mendes, que não mediram esforços para que eu pudesse chegar até aqui e lutar pelo sonhado título de Mestre. Também agradeço de forma especial à minha grande amiga Jacqueline Alves Itame que, de muitas formas, através da grande amizade compartilhada por nós, ilumina o meu caminho. Agradeço à minha orientadora Caliê Castilho que aceitou o papel de me conduzir na execução desse trabalho dando o suporte necessário para, no final, lutar pelo título em questão. Também agradeço aos colaboradores João Ricardo Scaliante Junior, Gabriela Azenha Milani Soriano, Priscila Helena dos Santos, Ines Cristina Giometti, Sheila Merlo Firetti, Anthony César de Souza Castilho, Claudia Maria Bertan Membrive, Raquel Puelker, Jennifer Cardoso Couto, Teissiane Ferreira e Francis Lopes Pacagnelli que contribuíram para o desenvolvimento e aperfeiçoamento desse trabalho de diferentes formas.

O presente estudo foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – (Brasil) CAPES – Código de Financiamento 001.

RESUMO

Avaliação do uso de SOF (Fluido De Oviduto Sintético) e CLA (Ácido Linoleico Conjugado) na expressão gênica de genes relacionados ao metabolismo lipídico e maturação oocitária em COCs (Complexos *Cumulus*-Oócito) bovinos

Visando o desenvolvimento de um meio capaz de suportar todas as etapas da produção *in vitro* de embriões bovinos, o objetivo desse estudo foi investigar se a utilização de fluido de oviduto sintético (SOF) acrescido ou não de ácido linoleico conjugado (CLA) durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos altera a abundância de transcritos ligados ao metabolismo lipídico e maturação oocitária. Os complexos *cumulus*-oócito (COCs) foram aspirados de ovários obtidos em abatedouro e maturados em quatro grupos: M199 (*Medium* 199), M199+CLA (M199 com 100 μ M de CLA), SOF e SOF+CLA (SOF com 100 μ M de CLA). A abundância relativa de RNAm de oócitos e células do *cumulus* foi avaliada após a maturação. As amostras de RNA total foram tratadas com DNase antes de serem submetidas ao protocolo de transcrição reversa. Foram realizadas análises de RT-qPCR dos genes *FADS2* (*fatty acid desaturase 2*), *SCD1* (*stearoyl-CoA desaturase 1*), *SREBP1* (*sterol regulatory element binding transcription factor 1*), *GREM1* (*gremlin 1*), *AREG* (*amphiregulin*) e *COX2* (*cyclooxygenase 2*). O Gene *PPIA* (*peptidylprolyl isomerase A*) foi utilizado como referência e o método $\Delta\Delta$ Ct com correção de eficiência foi usado para calcular os valores de expressão relativa (genes alvo/*PPIA*) para cada gene alvo usando uma amostra de controle como calibrador. As amostras foram distribuídas em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x2, totalizando 4 tratamentos, com 5 repetições. Os dados foram submetidos a análise de variância e em caso de diferença significativa ($p < 0,05$) as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. COCs maturados com SOF apresentam maior abundância relativa de RNAm dos marcadores qualidade *GREM1* ($p = 0,0065$) e *COX2* ($p = 0,0040$) em oócitos e *GREM1* ($p = 0,0004$) em células do *cumulus*. O meio SOF também proporciona maior abundância relativa de *FADS2* ($p = 0,0001$), essencial para o metabolismo lipídico, em oócitos. Adicionalmente, oócitos maturados com SOF apresentam menor abundância relativa de *SCD1* sem influência da adição de CLA. Em contrapartida, a abundância relativa de *SCD1* é reduzida no meio M199 com a utilização de CLA. Concluímos que o meio SOF proporciona maior abundância de marcadores de qualidade em oócitos independentemente da adição de CLA.

Palavras-chave: *COX2*, *FADS2*, *GREM1*, *PTGS2*, *SCD1*.

ABSTRACT

Evaluation of the use of SOF (Synthetic Ovidute Fluid) and CLA (Conjugated Linoleic Acid) in the gene expression of genes related to lipid metabolism and oocyte maturation in bovine COCs (*Cumulus-Oocyte Complexes*)

In order to develop a medium capable of supporting all stages of *in vitro* production of bovine embryos, the aim of this study was to investigate whether the use of synthetic oviduct fluid (SOF) with or without conjugated linoleic acid (CLA) during *in vitro* maturation of bovine oocytes changes the abundance of transcripts linked to lipid metabolism and oocyte maturation. *Cumulus*-oocyte complexes (COCs) were aspirated from slaughtered ovaries and matured into four groups: M199 (Medium 199), M199+CLA (M199 with 100 μ M CLA), SOF and SOF+CLA (SOF with 100 μ M CLA). The relative abundance of oocytes and *cumulus* cells mRNA was evaluated after maturation. Total mRNA samples were treated with DNase before being subjected to the reverse transcription protocol. RT-qPCR analyzes of the *FADS2* (fatty acid desaturase 2), *SCD1* (stearoyl-CoA desaturase 1), *SREBP1* (sterol regulatory element binding transcription factor 1), *GREM1* (gremlin 1), *AREG* (amphiregulin) and *COX2* (cyclooxygenase 2) genes were performed. The gene *PPIA* (peptidylprolyl isomerase A) was used as reference and the $\Delta\Delta$ Ct method with efficiency correction was used to calculate the relative expression values (target genes/*PPIA*) for each target gene using a control sample and calibrator. The samples were distributed in a completely randomized design in a 2x2 factorial scheme, totaling 4 treatments with 5 replications. Data were subjected to analysis of variance and in case of significant difference ($p < 0.05$) the means were compared by Tukey test at 5% significance. The use of the SOF medium in the maturation of bovine COCs results in higher relative mRNA abundance of quality markers *GREM1* ($p = 0.0065$) and *COX2* ($p = 0.0040$) in oocytes and *GREM1* ($p = 0.0004$) in *cumulus* cells. In addition, the SOF medium provides higher relative abundance of *FADS2* ($p = 0.0001$), essential for lipid metabolism, in oocytes. Additionally, oocytes matured in SOF medium show lower relative abundance of *SCD1* without influence of CLA addition. In contrast, the relative abundance of *SCD1* is reduced in M199 medium using CLA. We conclude that the SOF medium provides greater abundance of oocyte quality markers regardless of the addition of CLA.

Keywords: *COX2*, *FADS2*, *GREM1*, *PTGS2*, *SCD1*.

SUMÁRIO

ARTIGO CIENTÍFICO.....	8
ANEXO: Normas da Revista Anais da Academia Brasileira de Ciências.....	28

1 **ARTIGO CIENTÍFICO**2
3 **AVALIAÇÃO DO USO DE SOF (FLUIDO DE OVIDUTO SINTÉTICO) E CLA**
4 **(ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO) NA EXPRESSÃO GÊNICA DE GENES**
5 **RELACIONADOS AO METABOLISMO LIPÍDICO E MATURAÇÃO OOCITÁRIA**
6 **EM COCs (COMPLEXOS *CUMULUS*-OÓCITO) BOVINOS**7
8 Autores:9 Adriano Felipe Mendes ¹, Raquel Puelker ², Sheila Merlo Firetti ¹, João Ricardo Scaliante
10 Junior ³, Priscila Helena dos Santos ⁴, Claudia Maria Bertan Membrive ⁵, Anthony César de
11 Souza Castilho ¹, Ines Cristina Giometti e Caliê Castilho ^{1*}.12
13 Endereços profissionais:14 ¹ Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE): Rodovia Raposo Tavares, Km 572, Bairro
15 Limoeiro, Presidente Prudente, SP, Brasil, CEP 19.067-175;16 ² Progest Biotecnologia em Reprodução Animal: Rod. Marechal Rondon, Botucatu, SP,
17 Brasil, CEP 18602-260;18 ³ Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” (UNESP): Rua Clóvis Pestana, 793,
19 Dona Amélia, Araçatuba, SP, Brasil, CEP 16.050.680;20 ⁴ Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” (UNESP): Rua Prof. Dr. Plínio Pinto
21 e Silva, Botucatu, SP, Brasil, CEP 18.618.691;22 ⁵ Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” (UNESP): Rodovia Comandante
23 João Ribeiro de Barros (SP 294), Km 651, Dracena, SP, Brasil, CEP 17.900-000;24
25 Palavras-chave:26 *COX2, FADS2, GREM1, PTGS2, SCD1.*27
28 **TÍTULO EM EXECUÇÃO:**
29 **EXPRESSÃO GÊNICA EM OÓCITOS BOVINOS MATURADOS COM SOF**30
31 Seção da Academia:

32 Ciências Agrárias

33
34 Autor para correspondência:35 Caliê Castilho (calie@unoeste.br).

36

37 **RESUMO**

38

39 Visando desenvolver um meio para todas as etapas da produção *in vitro* de embriões bovinos,
40 esse estudo investigou se o fluido de oviduto sintético (SOF) acrescido de ácido linoleico
41 conjugado (CLA) na maturação *in vitro* de complexos *cumulus*-oócito (COCs) bovinos
42 modula a expressão de genes ligados ao metabolismo lipídico e à maturação oocitária. COCs
43 foram maturados em diferentes meios: *Medium* 199 (M199), M199 com 100 µM CLA, SOF e
44 SOF com 100 µM CLA. COCs maturados com SOF apresentam maior abundância relativa de
45 RNAm dos marcadores qualidade *GREM1*, *gremlin 1*, ($p=0,0065$) e *COX2*, *cyclooxygenase 2*,
46 ($p=0,0040$) em oócitos e *GREM1* ($p=0,0004$) em células do *cumulus*. O meio SOF também
47 proporciona maior abundância relativa de *FADS2*, *fatty acid desaturase 2*, ($p=0,0001$),
48 essencial para o metabolismo lipídico, em oócitos. Adicionalmente, oócitos maturados com
49 SOF apresentam menor abundância relativa de *SCD1*, (*stearoyl-CoA desaturase 1*) sem
50 influência da adição de CLA. Em contrapartida, a abundância relativa de *SCD1* é reduzida no
51 meio M199 com a utilização de CLA. Concluímos que o meio SOF proporciona maior
52 abundância de marcadores de qualidade em oócitos independentemente da adição de CLA.

53 INTRODUÇÃO

54

55 A produção *in vitro* de embriões (PIVE) abrange a maturação oocitária, fertilização e
56 cultivo embrionário pré-implantação. Meios de cultivo específicos são utilizados em cada
57 uma dessas etapas. O meio *Tissue Culture Medium* 199 (TCM 199), por exemplo, é muito
58 utilizado como base para a maturação *in vitro* de oócitos bovinos e pode ser modificado de
59 acordo com cada laboratório para melhorar os resultados. O meio fluido de oviduto sintético
60 (SOF) é comumente utilizado no cultivo de embriões e, assim como o TCM 199, pode sofrer
61 modificações em sua composição (Hosseini et al. 2008). A viabilidade da utilização de um
62 meio apto para todas essas etapas foi avaliada por Gandhi et al. 2000. Esses autores
63 mostraram ser possível obter sucesso utilizando SOF em todas as etapas da PIVE (Gandhi et
64 al. 2000). Considerando o desenvolvimento de um meio apropriado a todas as etapas da
65 PIVE, é necessário que este seja capaz de suprir os complexos *cumulus*-oócito e embriões e,
66 além disso, é desejável que favoreça a criotolerância dessas estruturas.

67 O excesso de gotículas lipídicas reduz a criotolerância em embriões (Abe et al.
68 2002). Modificações nas condições de cultivo podem reduzir o acúmulo de lipídios elevando
69 a criotolerância de oócitos e embriões (Abe et al. 2002). A adição de ácidos graxos poli-
70 insaturados (AGPI) durante a maturação oocitária pode melhorar a qualidade e resistência
71 embrionária à criopreservação (Marques et al. 2007). Dentre esses ácidos graxos, destacamos
72 o ácido linoleico conjugado (CLA) que, adicionado ao meio de cultivo de embriões contendo
73 soro fetal bovino (SFB), reduz o acúmulo de lipídios embrionários e melhora
74 significativamente a sobrevivência pós-criopreservação (Pereira et al. 2007).

75 O metabolismo lipídico é regulado por diferentes genes com destaque para *FADS2*
76 (*fatty acid desaturase 2*), *SCD1* (*stearoyl-CoA desaturase 1*) e *SREBP1* (*sterol regulatory*
77 *element binding transcription factor 1*). Além dos genes relacionados ao metabolismo
78 lipídico, existem outros que também são importantes para a competência oocitária dentre os
79 quais estão: *GREM1* (*gremlin 1*), *AREG* (*amphiregulin*) e *COX2* (*cyclooxygenase 2*) que
80 também é conhecido como *PTGS2* (*prostaglandin-endoperoxide synthase 2*).

81 Nossa hipótese é que o meio SOF na maturação *in vitro* de oócitos pode influenciar a
82 expressão de genes relacionados ao metabolismo de lipídios e maturação oocitária. Desta
83 maneira pode-se avançar no desenvolvimento de um meio único adotado para todas as etapas
84 do processo de PIVE em bovinos.

85 Desta forma, o objetivo do presente estudo foi investigar se o uso de SOF acrescido
86 de CLA na maturação *in vitro* de COCs bovinos modula a expressão de genes ligados ao
87 metabolismo lipídico e à maturação oocitária.

88

89 **MATERIAIS E MÉTODOS**

90

91 Os COCs foram obtidos de ovários de fêmeas bovinas provenientes de um frigorífico
92 localizado no município de Presidente Prudente, SP. Os ovários foram colhidos
93 imediatamente após o abate e acondicionados em recipiente isotérmico contendo cloreto de
94 sódio 0,9% previamente aquecido a 37°C e encaminhados ao laboratório. Os folículos
95 ovarianos foram aspirados com agulha 40 x 1,2 mm acoplada a seringa de 20 mL para
96 obtenção dos COCs. O fluido folicular foi depositado em tubos de 50 mL para decantação em
97 banho-maria a 37°C, por aproximadamente 20 minutos.

98 Apenas COCs com pelo menos três camadas de células do *cumulus* compactas foram
99 utilizados na maturação *in vitro*. Os COCs foram distribuídos entre os quatro grupos
100 experimentais contendo 10% de SFB: meio de maturação *Medium* 199 (Anexo 1)
101 suplementado com 75µg/mL de amicacina, 4 mg/mL de BSA, 0,01 UI/mL de FSHr, 0,001
102 µg/µL de 17β Estradiol e 1µM de cisteamina (M199); M199 acrescido de 100 µM de CLA
103 diluído em dimetilsulfóxido (M199+CLA); SOF (Anexo 2) sem hormônios (SOF); SOF
104 acrescido de 100 µM de CLA (SOF+CLA). Os COCs foram depositados em grupos de 20 em
105 gotas de maturação contendo 100 µL de M199, M199+CLA, SOF ou SOF+CLA em placas de
106 Petri livres de RNase e DNase sob óleo mineral e incubados à temperatura de 39°C com
107 atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ por um período de 22 a 24 horas.

108 Os oócitos e células do *cumulus* foram preparados para a expressão gênica após o
109 período de maturação. Para tanto, os oócitos foram separados das células do *cumulus* em meio
110 de lavagem, LAV, (Anexo 3) suplementado com amicacina e 10% de SFB. Inicialmente por
111 meio de agitação com pipeta automática e, posteriormente, colocados em tubos com
112 capacidade para 1,5 mL contendo 30 µL de meio de lavagem e a seguir agitados por
113 aproximadamente 5 minutos em agitador de amostras. Após a agitação, os tubos de 1,5 mL
114 foram lavados com LAV e os oócitos foram acondicionados em tubos com capacidade para
115 1,5 mL previamente identificados e congelados a -80°C. As células do *cumulus* resultantes do
116 processo foram centrifugadas a 10000 rotações por minuto durante 5 minutos em tubos
117 contendo 100 µL de LAV. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de
118 células do *cumulus* formado foi congelado à -80°C. Foram realizadas 6 repetições nos grupos

119 M199 e M199+CLA e 5 repetições nos grupos SOF e SOF+CLA com 20 oócitos em cada
120 repetição, sendo que cada repetição de oócitos produziu uma repetição de células do *cumulus*.

121 Para a análise da expressão gênica, as amostras foram submetidas à extração de RNA
122 utilizando o *PicoPure™ RNA Isolation Kit (Applied Biosystems™)* conforme instruções do
123 fabricante. As concentrações de RNA total das amostras de células do *cumulus* foram
124 mensuradas por espectrofotometria (*Nanodrop, ND-2000®*). A fim de evitar contaminação
125 por DNA genômico e interferência nos resultados, todas as amostras de RNA total foram
126 tratadas com DNase antes de serem submetidas ao protocolo de transcrição reversa (RT-
127 *reverse transcription*). O RT das amostras foi realizado utilizando o *kit High Capacity*
128 (*AppliedBiosystems®*) de acordo com as instruções do fabricante. As análises de RT-qPCR de
129 cada gene alvo (*FADS2, SCD1, SREBP1, GREM1, AREG* e *COX2*) foi realizada no
130 equipamento *QuantStudio™ 7 Flex (AppliedBiosystems®)*, utilizando o *Sybr® Green PCR*
131 *Master Mix System (Applied Biosystems, São Paulo, Brasil)*.

132 Os genes *PPIA (peptidylprolyl isomerase A)*, *GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate*
133 *dehydrogenase)* e *RPL15 (ribosomal protein L15)* foram utilizados como genes endógenos.
134 Para selecionar o gene de referência mais estável para análises detalhadas dos oócitos e
135 células do *cumulus*, os perfis de amplificação de *PPIA, GAPDH* e *RPL15* foram comparados
136 utilizando o *geNorm applet para Microsoft Excel (medgen.ugent.be/genorm)*. O gene de
137 referência mais estável para as células foi o *PPIA*, e o método $\Delta\Delta Ct$ com correção de
138 eficiência foi usado para calcular os valores de expressão relativa (genes alvo/*PPIA*) para cada
139 gene alvo, usando uma amostra de controle como calibrador. As características dos
140 oligonucleotídeos iniciadores utilizados estão apresentadas na Tabela 1.

141 Para a análise de expressão de mRNA dos genes alvo foi utilizado o volume de 1 μ L
142 de cada amostra e 24 μ L de uma mistura contendo a sonda e o primer de interesse. A reação
143 foi realizada na sequência: 95°C por 10 minutos, 40 ciclos para desnaturação a 95°C por 10
144 segundos, seguido de anelamento e extensão por 1 minuto.

145

146 Tabela 1: Características dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na análise da expressão
 147 gênica.

Gene	Sequência do oligonucleotídeo iniciador	Temperatura de anelamento (°C)	Concentração final (µM)
<i>PPIA</i> (endógeno)	F: 5'-GCCATGGAGCGCTTTGG-3' R: 5'-CCACAGTCAGCAATGGTGATCT-3'	60	300
<i>AREG</i> (alvo)	F: 5'-CTTTCGTCTCTGCCATGACCTT-3' R: 5'-CGTTCCTCAGCGACACCTTCA-3'	60	300
<i>GREM1</i> (alvo)	F: 5'-TGGTGCAAGGGCAAGAAGGATAGA-3' R: 5'-CACTGTGTTTGGAGGTTGGCCTTT-3'	60	300
<i>COX2</i> (alvo)	F: 5'-AAGCCTAGCACTTTGGGTGGAGAA-3' R: 5'-TCCAGAGTGGGAAGAGCTTGCATT-3'	60	300
<i>FADS2</i> (alvo)	F: 5'-GGGTGATGATGTGCTGGATT-3' R: 5'-CCCTGGACATCTGAAGAGAAAAG-3'	60	300
<i>SCD1</i> (alvo)	F: 5'-GACCCTGGGCAAGTCATTTA-3' R: 5'-AAACTGCCCTTTGAGGTAGG-3'	60	300
<i>SREBP1</i> (alvo)	F: 5'-GACTACATCCGCTTCCTTCAG-3' R: 5'-CCAGGTCCTTCAGCGATT-3'	60	300
<i>GAPDH</i> (endógeno)	F: 5'-GGCGTGAACCACGAGAAGTATAA-3' R: 5'-CCCTCCACGATGCCAAAGT-3'	60	200
<i>RPL15</i> (endógeno)	F: 5'-CTCATCGTTGGTGCCAATGCAAGT-3' R: 5'-TCACATCCACCCTGGGAAACAGAA-3'	60	300

148 *PPIA*: peptidylprolyl isomerase A; *AREG*: amphiregulin; *GREM1*: gremlin 1; *COX2*: cyclooxygenase 2; *FADS2*:
 149 fatty acid desaturase 2; *SCD1*: stearyl-CoA desaturase 1; *SREBP1*: sterol regulatory element binding
 150 transcription factor 1; *GAPDH*: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *RPL15*: ribosomal protein L15.

151

152 As amostras foram distribuídas em delineamento inteiramente casualizado em
 153 esquema fatorial 2x2, totalizando 4 tratamentos, com 5 repetições. Os dados foram
 154 submetidos a análise de variância e em caso de diferença significativa ($p < 0,05$) as médias
 155 foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

156

157 RESULTADOS

158

159 Dos genes diretamente ligados ao metabolismo lipídico, apenas *FADS2* apresentou
 160 maior abundância relativa de RNAm em oócitos maturados em meio SOF ($p = 0,0001$). Os
 161 genes *GREM1* ($p = 0,0065$) e *COX2* ($p = 0,0040$), implicados com a maturação oocitária
 162 também apresentaram maior abundância relativa de RNAm em oócitos maturados em meio
 163 SOF. Os resultados da abundância relativa de RNAm dos oócitos estão apresentados na
 164 Tabela 2.

165

Tabela 2 – Valores médios da abundância relativa de RNAm dos genes *FADS2*, *GREM1*, *SCD1*, *SREBP1*, *AREG* e *COX2* em oócitos maturados nos meios *Medium* 199 (M199) e fluido de oviduto sintético (SOF) acrescidos ou não de ácido linoleico conjugado (CLA).

Meio	<i>FADS2</i>	<i>GREM1</i>	<i>SCD1</i>	<i>SREBP1</i>	<i>AREG</i>	<i>COX2</i>
M199 (n=10)	0,24b	1,26b	0,72	0,92	1,30	0,75b
SOF (n=10)	0,85a	2,25a	0,23	1,60	1,33	1,86a
CLA						
Ausente (n=10)	0,51	1,45	0,54	1,36	1,49	1,24
Presente (n=10)	0,57	2,06	0,41	1,15	1,13	1,37
Probabilidades						
Meio de maturação	0,0001	0,0065	<0,0001	0,0541	0,9448	0,0040
CLA	0,5940	0,0722	0,1105	0,5325	0,4698	0,6969
Interação Meio x CLA	0,2084	0,4095	0,0102	0,5248	0,7176	0,8233
CV (%)	46,14	40,16	35,42	58,30	82,35	56,53

166 *FADS2*: fatty acid desaturase 2; *GREM1*: gremlin 1; *SCD1*: stearoyl-CoA desaturase 1; *SREBP1*: sterol
 167 regulatory element binding transcription factor 1; *AREG*: amphiregulin; *COX2*: cyclooxygenase 2. Médias
 168 seguidas por letras diferentes diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (p<0,05).

169

170 A Tabela 3 mostra o desdobramento da interação entre os meios de maturação M199
 171 e SOF com o CLA para a abundância relativa de RNAm do gene *SCD1* em oócitos. Os dados
 172 mostram que a abundância relativa de RNAm de *SCD1* é influenciada pelo meio ao qual os
 173 COCs foram maturados. Além disso, essa abundância é influenciada pela presença de CLA
 174 apenas no meio de maturação M199.

175

Tabela 3 – Desdobramento da interação entre os meios de maturação *Medium* 199 (M199) e fluido de oviduto sintético (SOF) e ácido linoleico conjugado (CLA) para a abundância relativa de RNAm do gene *SCD1* (*stearoyl-CoA desaturase 1*) em oócitos.

Meio de maturação	CLA	
	Ausente	Presente
M199	0,89Aa	0,54Ab
SOF	0,19Ba	0,28Ba

Médias seguidas por letras diferentes, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (p<0,05).

176

177 Nas células do *cumulus* o gene *GREM1*, ligado à maturação oocitária, apresentou
 178 maior abundância relativa de RNAm quando SOF foi utilizado (p=0,0004). Houve tendência
 179 para uma maior abundância de RNAm de *SCD1* nas células do *cumulus* quando M199 foi
 180 utilizado (p=0,524). Os valores médios da abundância relativa de RNAm dos genes *FADS2*,
 181 *GREM1*, *SCD1*, *SREBP1*, *AREG* e *COX2* em células do *cumulus* estão apresentados na
 182 Tabela 4.

183

Tabela 4 – Valores médios da abundância relativa de RNAm dos genes *FADS2*, *GREM1*, *SCD1*, *SREBP1*, *AREG* e *COX2* em células do *cumulus* de oócitos maturados nos meios *Medium* 199 (M199) e fluido de oviduto sintético (SOF) acrescidos ou não de ácido linoleico conjugado (CLA).

Meio de maturação	<i>FADS2</i>	<i>GREM1</i>	<i>SCD1</i>	<i>SREBP1</i>	<i>AREG</i>	<i>COX2</i>
M199	0,52	1,18b	0,51	0,56	0,69	0,27
SOF	0,37	2,14a	0,32	0,51	0,54	0,20
CLA						
Ausente	0,49	1,64	0,48	0,57	0,76	0,27
Presente	0,40	1,68	0,35	0,50	0,47	0,20
Probabilidades						
Meio de maturação	0,0731	0,0004	0,0524	0,5668	0,3798	0,2224
CLA	0,3342	0,8521	0,1792	0,3903	0,0927	0,1979
Interação Meio x CLA	0,1132	0,1390	0,3052	0,1525	0,4396	0,8140
CV (%)	41,38	29,22	46,90	36,48	59,51	51,17

184 *FADS2*: fatty acid desaturase 2; *GREM1*: gremlin 1; *SCD1*: stearyl-CoA desaturase 1; *SREBP1*: sterol
 185 regulatory element binding transcription factor 1; *AREG*: amphiregulin; *COX2*: cyclooxygenase 2. CLA: ácido
 186 linoleico conjugado. Médias seguidas por letras diferentes diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância
 187 (p<0,05).

188

189 DISCUSSÃO

190

191 Visando desenvolver um meio único para todas as etapas da PIVE em bovinos, este
 192 foi o primeiro experimento que avaliou a abundância relativa de RNAm de genes relacionados
 193 à competência oocitária (*AREG*, *GREM1* e *COX2*) e metabolismo lipídico (*FADS2*, *SCD1* e
 194 *SREBP1*) em COCs maturados com meio SOF acrescido ou não de CLA. O meio SOF
 195 resultou em maior abundância relativa de *FADS2* essencial para o metabolismo lipídico, em
 196 oócitos. Adicionalmente, oócitos maturados com SOF apresentam menor abundância relativa
 197 de *SCD1* sem influência da adição de CLA. Em contrapartida, a abundância relativa de *SCD1*
 198 é reduzida no meio M199 com a utilização de CLA. Os COCs maturados com SOF
 199 apresentam maior abundância relativa de RNAm para os marcadores de qualidade *GREM1* e
 200 *COX2* em oócitos e *GREM1* em células do *cumulus*.

201 Observamos maior abundância relativa de RNAm do gene *FADS2* em oócitos
 202 maturados em meio SOF. O produto do gene *FADS2* catalisa a etapa inicial da cascata
 203 enzimática da síntese de ácidos graxos poli-insaturados (Warzych et al. 2017). Apenas *FADS2*
 204 inicia a cascata de alongamento da cadeia de dessaturação onde os ácidos graxos essenciais
 205 serão transformados em ácidos graxos poli-insaturados (Stoffel et al. 2008). O metabolismo
 206 lipídico e energético, a síntese de ácidos graxos poli-insaturados, as estruturas da membrana
 207 celular e as vias de sinalização lipídica dependem de ácidos graxos essenciais (Cunnane,

208 2003). A expressão do gene *FADS2*, portanto, é essencial para que o metabolismo de ácidos
209 graxos aconteça adequadamente. O meio SOF foi o único capaz de proporcionar maior
210 abundância desse gene no presente estudo.

211 Também mostramos que a abundância relativa de RNAm do gene *SCD1* é
212 influenciada pelo tipo de meio de maturação utilizado e, além disso, o meio de maturação
213 *Medium 199* sofre influência do CLA nesse parâmetro. A enzima *SCD1* é responsável por
214 reduzir a lipotoxicidade de ácidos graxos saturados através da conversão em ácidos graxos
215 monoinsaturados (Aardema et al. 2017). Esse processo de conversão é essencial, pois os
216 ácidos graxos saturados proporcionam elevação dos níveis de espécies reativas de oxigênio
217 altamente tóxicas interferindo negativamente no metabolismo celular (Brookheart et al. 2009).
218 A inibição do gene *SCD1* resulta em diminuição no acúmulo de triglicerídeos, menor
219 expressão do gene aromatase e produção de estradiol mais baixa em células do *cumulus*
220 humanas (Fayezi et al. 2017). Portanto, a atividade do gene *SCD1* é requerida. Observamos
221 que o meio *Medium 199* apresentou menor abundância relativa de *SCD1* após a adição de
222 CLA, mas o meio SOF não sofreu influência da adição de CLA nesse parâmetro.

223 Com relação aos genes implicados com a maturação oocitária (*GREM1*, *AREG* e
224 *COX2*), oócitos maturados em meio SOF apresentaram maior abundância relativa dos genes
225 *GREM1* e *COX2*. Em diferentes espécies a regulação positiva da expressão do gene *COX2* em
226 células do *cumulus* está relacionada à melhora na competência oocitária. Essa regulação
227 positiva está ligada à transição de oócitos de camundongos do estágio de vesícula germinativa
228 para metáfase II (Shao et al. 2015), melhoria da competência oocitária em suínos (Sugimura
229 et al. 2015) e em células do *cumulus* humanas está associada ao desenvolvimento de embriões
230 de qualidade superior (McKenzie et al. 2004). Portanto, a maior abundância relativa de
231 RNAm de *COX2* é desejável e tal característica foi observada nos oócitos maturados em meio
232 SOF.

233 O gene *GREM1* apresentou maior abundância relativa de RNAm tanto em oócitos
234 quanto células do *cumulus* dos COCs maturados em meio SOF. Os genes *GREM1* e *COX2*
235 são expressos nas células do *cumulus* onde participam do processo de expansão diretamente
236 relacionado à retomada da meiose oocitária (Shimada et al. 2006). A expressão de *GREM1* e
237 *COX2* é sinalizada pela interação de fatores de crescimento, como *AREG*, nos receptores das
238 células do *cumulus* (Pangas et al. 2004; Shimada et al. 2006). Os genes *GREM1* e *COX2*,
239 expressos em células do *cumulus*, interagem com fatores secretados por oócitos,
240 desempenhando papel na expansão das células do *cumulus* durante a maturação oocitária
241 sendo, portanto, associados com maior competência oocitária e embriões de boa qualidade

242 (Goldrat et al. 2019). Sendo os mesmos utilizados como marcadores de qualidade em células
243 do *cumulus* de búfalas (Pandey et al. 2018). Considerando esses dois marcadores de
244 qualidade, o meio SOF, mais uma vez mostrou-se superior.

245 Todos os grupos foram suplementados com 10% de SFB. O SFB está ligado com o
246 acúmulo de lipídios intracelulares e consequente diminuição da fluidez da membrana
247 plasmática, características indesejáveis. Porém, o SFB contém substâncias benéficas para o
248 desenvolvimento embrionário (Leão et al. 2015) e sua substituição total resulta em baixas
249 taxas de produção embrionária (Duque et al. 2003). Além disso, mostramos que o meio SOF é
250 capaz de proporcionar maior abundância relativa de *FADS2*, um gene chave no metabolismo
251 lipídico. A manutenção da fluidez de membrana, assim como o controle da proporção de
252 ácidos graxos saturados e insaturados e distribuição das gotículas lipídicas é imprescindível
253 para elevar a tolerância à criopreservação de oócitos e embriões.

254 Concluimos que o uso do meio SOF na maturação oocitária resulta em alteração na
255 expressão de genes ligados ao metabolismo lipídico e induz maior expressão de genes
256 marcadores de qualidade em oócitos, independente da adição de CLA.

257 **AGRADECIMENTOS**

258

259 O presente estudo foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de
260 Pessoal de Nível Superior – (Brasil) CAPES – Código de Financiamento 001.

261 **REFERÊNCIAS**

262

263 AARDEMA H, VAN TOL HTA, WUBBOLTS RW, BROUWERS JFHM, GADELLA BM
264 AND ROELEN BAJ. 2017. Stearoyl-CoA desaturase activity in bovine *cumulus* cells protects
265 the oocyte against saturated fatty acid stress. Biol Reprod 96: 982-992.

266

267 ABE H, YAMASHITA S, SATOH T AND HOSHI H. 2002. Accumulation of cytoplasmic
268 lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture
269 systems using serum-free or serum-containing media. Mol Reprod Dev 61 : 57-66.

270

271 ASHKENAZI H, CAO X, MOTOLA S, POPLIKER M, CONTI M AND TSAFRIRI A. 2005
272 Epidermal Growth Factor Family Members: Endogenous Mediators of the Ovulatory
273 Response. Endocrinology 146: 77-84.

274

275 BAI Y, MCCOY JG, LEVIN EJ, SOBRADO, P, RAJASHANKAR, KR AND FOX, BG.
276 2015. X-ray structure of a mammalian stearoyl-CoA desaturase. Nature. 524(7564): 252-256.

277

278 BROOKHEART RT, MICHEL CI AND SCHAFFER JE. 2009. As a matter of fat. Cell
279 Metab 10: 9-12.

280

281 CUNNANE, SC. 2003. Problems with essential fatty acids: time for a new paradigm?. Prog
282 Lipid Res 42: 544-568.

283

284 DUQUE P, HIDALGO CO, GOMEZ E, PINTADO B, FACAL N AND DIEZ C.
285 2003. Macromolecular source as dependent on osmotic pressure and water source:
286 18 effects on bovine *in vitro* embryo development and quality. Reprod Nutr Dev 43: 487-496.

287

288 FAYEZI S, GHAFFARI NOVIN M, DARABI M, NOROUZIAN M, NOURI M, FARZADI
289 L AND DARABI M. 2018. Primary Culture of Human *Cumulus* Cells Requires Stearoyl-
290 Coenzyme A Desaturase 1 Activity for Steroidogenesis and Enhancing Oocyte *In vitro*
291 Maturation. Reprod Sci 25(6): 844-853.

292

- 293 GANDHI AP, LANE M, GARDNER DK AND KRISHER RL. 2000. A single medium
294 supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture.
295 Hum Reprod 15: 395-401.
296
- 297 GOLDRAT O, VAN DEN STEEN G, GONZALEZ-MERINO E, DECHÈNE J, GERVY C,
298 DELBAERE A, DEVREKER F, DE MAERTELAER V AND DEMEESTERE I. 2019.
299 Letrozole-associated controlled ovarian hyperstimulation in breast cancer patients versus
300 conventional controlled ovarian hyperstimulation in infertile patients: assessment of oocyte
301 quality related biomarkers. Reprod Biol Endocrinol17(1):3.
302
- 303 GONZÁLEZ-SERRANO AF, PIRRO V, FERREIRA CR, OLIVERI P, EBERLIN LS,
304 HEINZMANN J, LUCAS-HAHN A, NIEMANN H AND COOKS, RG. 2013 Desorption
305 electrospray ionization mass spectrometry reveals lipid metabolism of individual oocytes and
306 embryos. PLoS One 8(9): e74981.
307
- 308 HELLIWELL RJ, ADAMS LF AND MITCHELL MD. Prostaglandin synthases: recent
309 developments and a novel hypothesis. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 70(2):101-
310 113.
311
- 312 HOSSEINI SM, MOULAVI F, HAJIAN M, ABEDI P, FOROUZANFAR M, HOSSEINI SO,
313 HOSSEINI LS, PIRESTANI A, NAVA HG, TAJIK P, SHAHVERDI A AND NASR-
314 ESFAHANI, MH. 2008. Highly Efficient *In vitro* Production of Bovine Blastocyst in Cell-
315 Free Sequential Synthetic Oviductal Fluid vs. TCM199 Vero Cell Co-Culture System. Int J
316 Fertil Steril 2(2): 66-73.
317
- 318 HSIEH M AND CONTI M. 2005. G-protein-coupled receptor signaling and the EGF network
319 in endocrine systems. Trends Endocrinol Metab 16: 320-326.
320
- 321 HUANG Y, ZHAO Y, YU Y, LI R, LIN S, ZHANG C, LIU P AND QIAO J. 2015. Altered
322 *amphiregulin* expression induced by diverse luteinizing hormone receptor reactivity in
323 granulosa cells affects IVF outcomes. Reprod Biomed Online 30(6): 593-601.
324
- 325 LEÃO BSC, ROCHA-FRIGONI NAS, CABRAL EC, COELHO MB, FERREIRA CR,
326 EBERLIN MN, ACCORSI MF, NOGUEIRA É AND MINGOTI, GZ. 2015. Improved

- 327 embryonic cryosurvival observed after *in vitro* supplementation with conjugated linoleic acid
328 is related to changes in the membrane lipid profile. Theriogenology 84: 127-136.
329
- 330 MARQUES CC, BAPTISTA MC, VASQUES MI, HORTA AEM AND PEREIRA RM.
331 2007. Effect of Polyunsaturated Fatty Acids (PUFA) on Bovine Oocyte *In vitro* Maturation
332 and Subsequent Embryo Development and Freezability. Reprod Domestic Anim 42: 08-109.
333
- 334 MCKENZIE LJ, PANGAS SA, CARSON SA, KOVANCI E, CISNEROS P, BUSTER JE,
335 AMATO P AND MATZUK MM. 2004. Human *cumulus* granulosa cell gene expression: a
336 predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. Hum Reprod
337 19(12):2869-2874.
338
- 339 NIRINGIYUMUKIZA JD, CAI H AND XIANG W. 2018. Prostaglandin E2 involvement in
340 mammalian female fertility: ovulation, fertilization, embryo development and early
341 implantation. Reprod Biol Endocrinol 16(1): 43.
342
- 343 OCAMPO A, PEDRAZA J, ORTIZ G, HERNÁNDEZ-PÉREZ E, PORCHIA L AND
344 LÓPEZ-BAYGHEN E. 2018 Assessment of Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2 and
345 Versican gene expression profile from the *cumulus* cells: association with better *in vitro*
346 fertilization outcomes. J Ovarian Res 11(1):84.
347
- 348 PANDEY S, SOMAL A, PARMAR MS, GUPTA S, BHARTI MK, BHAT IA, INDU B,
349 CHANDRA V, KUMAR GS AND SHARMA GT. 2018. Effect of roscovitine on
350 developmental competence of small follicle-derived buffalo oocytes. Indian J Med Res
351 148(Suppl): S140-S150.
352
- 353 PANGAS SA, JORGEZ CJ AND MATZUK MM. 2004. Growth differentiation factor 9
354 regulates expression of the bone morphogenetic protein antagonist gremlin. J Biol Chem 279:
355 32281-32286.
356
- 357 PEREIRA RM, BAPTISTA MC, VASQUES MI, HORTA AE, PORTUGAL PV, BESSA RJ,
358 SILVA JC, PEREIRA MS AND MARQUES CC. 2007. Cryosurvival of bovine blastocysts is
359 enhanced by culture with trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid (10t, 12c CLA). Anim
360 Reprod Sci 9: 293-301.

361

362 PEREIRA RM AND MARQUES CC. 2008. Animal oocyte and embryo cryopreservation.
363 Cell Tissue Bank 9: 267-277.

364

365 PONTES JHF, MELO STERZA FA, BASSO AC, FERREIRA CR, SANCHES BV, RUBIN
366 KC AND SENEDA MM. 2011. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy
367 rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors.
368 Theriogenology 75: 1640-1646.

369

370 SEO MJ AND OH DK. 2017. Prostaglandin synthases: molecular characterization and
371 involvement in prostaglandin biosynthesis. Prog Lipid Res 66: 50-68.

372

373 SHIMADA M, HERNANDEZ-GONZALEZ I, GONZALEZ-ROBAYNA I AND
374 RICHARDS JS. 2006. Paracrine and autocrine regulation of epidermal growth factorlike
375 factors in *cumulus* oocyte complexes and granulosa cells: key roles for prostaglandin synthase
376 2 and progesterone receptor. Mol Endocrinol 20: 1352-1365.

377

378 STOFFEL W, HOLZ B, JENKE B, BINCZEK E, GÜNTER RH, KISS C,
379 KARAKESISOGLOU I, THEVIS M, WEBER A-A, ARNHOLD S AND ADDICKS K.
380 2008. $\Delta 6$ -Desaturase (*FADS2*) deficiency unveils the role of $\omega 3$ - and $\omega 6$ -polyunsaturated
381 fatty acids. EMBO J 27: 2281-2292.

382

383 SUDANO MJ, SANTOS VG, TATA A, FERREIRA CR, PASCHOAL DM, MACHADO R,
384 BURATINI J, EBERLIN MN AND LANDIM-ALVARENGA FDC. 2012.
385 Phosphatidylcholine and Sphingomyelin Profiles Vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus*
386 *taurus* *In vitro*- and *In vivo*-Produced Blastocysts. Biol Reprod 87: 130.

387

388 WARZYCH E, PAWLAK P, PSZCZOLA M, CIESLAK A, MADEJA ZE AND LECHNIAK
389 D. 2017. Interactions of bovine oocytes with follicular elements with respect to lipid
390 metabolism. Anim Sci J 88: 1491-1497.

391 ANEXOS

392 ANEXO 1: Composição básica do meio *Medium 199* (M199), Thermo Fisher Scientific Inc.,
 393 número de catálogo 31100035.

Componentes	Peso molecular	Concentração (mg/L)	mM
<i>Amino Acids</i>			
<i>Glycine</i>	75.0	50.0	0.6666667
<i>L-Alanine</i>	89.0	25.0	0.28089887
<i>L-Arginine hydrochloride</i>	211.0	70.0	0.33175355
<i>L-Aspartic acid</i>	133.0	30.0	0.22556391
<i>L-Cysteine hydrochloride-H2O</i>	176.0	0.1	5.681818E-4
<i>L-Cystine 2HCl</i>	240.0	26.0	0.108333334
<i>L-Glutamic Acid</i>	147.0	75.0	0.5102041
<i>L-Glutamine</i>	146.0	100.0	0.6849315
<i>L-Histidine hydrochloride-H2O</i>	210.0	21.88	0.10419047
<i>L-Hydroxyproline</i>	131.0	10.0	0.07633588
<i>L-Isoleucine</i>	131.0	40.0	0.3053435
<i>L-Leucine</i>	131.0	60.0	0.45801526
<i>L-Lysine hydrochloride</i>	183.0	70.0	0.38251367
<i>L-Methionine</i>	149.0	15.0	0.10067114
<i>L-Phenylalanine</i>	165.0	25.0	0.15151516
<i>L-Proline</i>	115.0	40.0	0.3478261
<i>L-Serine</i>	105.0	25.0	0.23809524
<i>L-Threonine</i>	119.0	30.0	0.25210086
<i>L-Tryptophan</i>	204.0	10.0	0.04901961
<i>L-Tyrosine disodium salt dihydrate</i>	261.0	58.0	0.22222222
<i>L-Valine</i>	117.0	25.0	0.21367522
<i>Vitamins</i>			
<i>Ascorbic Acid</i>	176.0	0.05	2.840909E-4
<i>Biotin</i>	244.0	0.01	4.0983607E-5
<i>Choline chloride</i>	140.0	0.5	0.0035714286
<i>D-Calcium pantothenate</i>	477.0	0.01	2.096436E-5
<i>Folic Acid</i>	441.0	0.01	2.2675737E-5
<i>Menadione (Vitamin K3)</i>	172.0	0.01	5.8139532E-5
<i>Niacinamide</i>	122.0	0.025	2.0491803E-4
<i>Nicotinic acid (Niacin)</i>	123.0	0.025	2.0325204E-4
<i>Para-Aminobenzoic Acid</i>	137.0	0.05	3.6496352E-4
<i>Pyridoxal hydrochloride</i>	204.0	0.025	1.2254903E-4
<i>Pyridoxine hydrochloride</i>	206.0	0.025	1.21359226E-4
<i>Riboflavin</i>	376.0	0.01	2.6595744E-5
<i>Thiamine hydrochloride</i>	337.0	0.01	2.967359E-5
<i>Vitamin A (acetate)</i>	328.0	0.1	3.0487805E-4
<i>Vitamin D2 (Calciferol)</i>	397.0	0.1	2.5188917E-4
<i>alpha Tocopherol phos. Na salt</i>	554.7	0.01	1.8027762E-5
<i>i-Inositol</i>	180.0	0.05	2.7777778E-4
<i>Inorganic Salts</i>			
<i>Calcium Chloride (CaCl2) (anhyd.)</i>	111.0	200.0	1.8018018
<i>Ferric nitrate (Fe(NO3)-9H2O)</i>	404.0	0.7	0.0017326733
<i>Magnesium Sulfate (MgSO4)</i>	120.0	97.67	0.8139166

<i>(anhyd.)</i>			
<i>Potassium Chloride (KCl)</i>	75.0	400.0	5.3333335
<i>Sodium Chloride (NaCl)</i>	58.0	6800.0	117.24138
<i>Sodium Phosphate monobasic (NaH₂PO₄-H₂O)</i>	138.0	140.0	1.0144928
<i>Other Components</i>			
<i>Adenine sulfate</i>	404.0	10.0	0.024752475
<i>Adenosine 5'-phosphate</i>	347.0	0.2	5.763689E-4
<i>Adenosine 5'-triphosphate</i>	605.0	1.0	0.0016528926
<i>Cholesterol</i>	387.0	0.2	5.1679584E-4
<i>D-Glucose (Dextrose)</i>	180.0	1000.0	5.5555553
<i>Deoxyribose</i>	134.0	0.5	0.0037313432
<i>Glutathione (reduced)</i>	307.0	0.05	1.6286645E-4
<i>Guanine hydrochloride</i>	188.0	0.3	0.0015957447
<i>Hypoxanthine Na</i>	158.11	0.354	0.0022389477
<i>Phenol Red</i>	376.4	20.0	0.053134963
<i>Ribose</i>	150.0	0.5	0.0033333334
<i>Sodium Acetate</i>	82.0	50.0	0.6097561
<i>Thymine</i>	126.0	0.3	0.0023809525
<i>Tween 80®</i>		20.0	Infinity
<i>Uracil</i>	112.0	0.3	0.0026785715
<i>Xanthine-Na</i>	174.09	0.3	0.0017232466

395 ANEXO 2: Composição do meio fluido de oviduto sintético (SOF).

Componentes	Concentrações
<i>NaCl</i>	107.63 mM
<i>KCl</i>	7.16 mM
<i>KH₂PO₄</i>	1.19 mM
<i>MgSO₄</i>	1.51 mM
<i>CaCl, 2H₂O</i>	1.78 mM
<i>Sodium lactate</i>	5.35 mM
<i>NaHCO₃</i>	25.00 mM
<i>Na-pyruvate</i>	7.27 mM
<i>L-Glutamine</i>	0.20 mM
<i>BME amino acids</i>	45.0 µL/mL
<i>MEM amino acids</i>	5.0 µL/mL
<i>Tri-Sodium-Citrate</i>	0.34 mM
<i>Myo-inositol</i>	2.77 mM
<i>Gentamycine</i>	50.0 µg/mL
<i>Amikacin sulfate</i>	78.125 µg/mL
<i>Bovine serum albumin</i>	4%
<i>Fetal bovine serum</i>	10%

397 ANEXO 3: Composição básica do meio de lavagem (LAV), Thermo Fisher Scientific Inc.,
 398 número de catálogo 12340030.

Componentes	Peso molecular	Concentração (mg/L)	mM
<i>Glycine</i>	75.0	50.0	0.6666667
<i>L-Alanine</i>	89.0	25.0	0.28089887
<i>L-Arginine hydrochloride</i>	211.0	70.0	0.33175355
<i>L-Aspartic acid</i>	133.0	30.0	0.22556391
<i>L-Cysteine hydrochloride-H2O</i>	176.0	0.1	5.681818E-4
<i>L-Cystine 2HCl</i>	240.0	26.0	0.108333334
<i>L-Glutamic Acid</i>	147.0	75.0	0.5102041
<i>L-Glutamine</i>	146.0	100.0	0.6849315
<i>L-Histidine hydrochloride-H2O</i>	210.0	21.88	0.10419047
<i>L-Hydroxyproline</i>	131.0	10.0	0.07633588
<i>L-Isoleucine</i>	131.0	40.0	0.3053435
<i>L-Leucine</i>	131.0	60.0	0.45801526
<i>L-Lysine hydrochloride</i>	183.0	70.0	0.38251367
<i>L-Methionine</i>	149.0	15.0	0.10067114
<i>L-Phenylalanine</i>	165.0	25.0	0.15151516
<i>L-Proline</i>	115.0	40.0	0.3478261
<i>L-Serine</i>	105.0	25.0	0.23809524
<i>L-Threonine</i>	119.0	30.0	0.25210086
<i>L-Tryptophan</i>	204.0	10.0	0.04901961
<i>L-Tyrosine disodium salt dihydrate</i>	261.0	58.0	0.22222222
<i>L-Valine</i>	117.0	25.0	0.21367522
<i>Vitamins</i>			
<i>Ascorbic Acid</i>	176.0	0.05	2.840909E-4
<i>Biotin</i>	244.0	0.01	4.0983607E-5
<i>Choline chloride</i>	140.0	0.5	0.0035714286
<i>D-Calcium pantothenate</i>	477.0	0.01	2.096436E-5
<i>Folic Acid</i>	441.0	0.01	2.2675737E-5
<i>Menadione (Vitamin K3)</i>	172.0	0.01	5.8139532E-5
<i>Niacinamide</i>	122.0	0.025	2.0491803E-4
<i>Nicotinic acid (Niacin)</i>	123.0	0.025	2.0325204E-4
<i>Para-Aminobenzoic Acid</i>	137.0	0.05	3.6496352E-4
<i>Pyridoxal hydrochloride</i>	204.0	0.025	1.2254903E-4
<i>Pyridoxine hydrochloride</i>	206.0	0.025	1.21359226E-4
<i>Riboflavin</i>	376.0	0.01	2.6595744E-5
<i>Thiamine hydrochloride</i>	337.0	0.01	2.967359E-5
<i>Vitamin A (acetate)</i>	328.0	0.1	3.0487805E-4
<i>Vitamin D2 (Calciferol)</i>	397.0	0.1	2.5188917E-4
<i>alpha Tocopherol phos. Na salt</i>	554.7	0.01	1.8027762E-5
<i>i-Inositol</i>	180.0	0.05	2.7777778E-4
<i>Inorganic Salts</i>			
<i>Calcium Chloride (CaCl2) (anhyd.)</i>	111.0	200.0	1.8018018
<i>Ferric nitrate (Fe(NO3)-9H2O)</i>	404.0	0.7	0.0017326733
<i>Magnesium Sulfate (MgSO4) (anhyd.)</i>	120.0	97.67	0.8139166
<i>Potassium Chloride (KCl)</i>	75.0	400.0	5.3333335
<i>Sodium Bicarbonate (NaHCO3)</i>	84.0	2200.0	26.190475

<i>Sodium Chloride (NaCl)</i>	58.0	6100.0	105.17242
<i>Sodium Phosphate monobasic (NaH₂PO₄) anhydrous</i>	138.0	140.0	1.0144928
<i>Other Components</i>			
<i>2-deoxy-D-ribose</i>	134.0	0.5	0.0037313432
<i>Adenine sulfate</i>	404.0	10.0	0.024752475
<i>Adenosine 5'-phosphate</i>	347.0	0.2	5.763689E-4
<i>Adenosine 5'-triphosphate</i>	605.0	1.0	0.0016528926
<i>Cholesterol</i>	387.0	0.2	5.1679584E-4
<i>D-Glucose (Dextrose)</i>	180.0	1000.0	5.5555553
<i>Glutathione (reduced)</i>	307.0	0.05	1.6286645E-4
<i>Guanine hydrochloride</i>	188.0	0.3	0.0015957447
<i>HEPES</i>	238.0	5960.0	25.042017
<i>Hypoxanthine Na</i>	136.0	0.4	0.0029411765
<i>Phenol Red</i>	376.4	20.0	0.053134963
<i>Ribose</i>	150.0	0.5	0.0033333334
<i>Sodium Acetate</i>	82.0	50.0	0.6097561
<i>Thymine</i>	126.0	0.3	0.0023809525
<i>Tween 80®</i>		20.0	Infinity
<i>Uracil</i>	112.0	0.3	0.0026785715
<i>Xanthine-Na</i>	152.0	0.34	0.0022368422



ISSN 0001-3765 *printed version*
ISSN 1678-2690 *online version*

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

- [Aim and editorial policy](#)
- [Preparation of manuscripts](#)

The journal Anais da Academia Brasileira de Ciências from 2012 onwards only considers online submissions. Once you have prepared your manuscript according to the instructions below, please visit the new, improved online submission website at <https://mc04.manuscriptcentral.com/aabc-scielo>. Please read these instructions carefully and follow them strictly. In this way you will help ensure that the review and publication of your paper are as efficient and quick as possible. The editors reserve the right to return manuscripts that are not in accordance with these instructions. Papers must be clearly and concisely written in English.

Aim and editorial policy

All submitted manuscripts should contain original research not previously published and not under consideration for publication elsewhere. The primary criterion for acceptance is scientific quality. Papers should avoid excessive use of abbreviations or jargon, and should be intelligible to as wide an audience as possible. Particular attention should be paid to the Abstract, Introduction, and Discussion sections, which should clearly draw attention to the novelty and significance of the data reported. Failure to do this may result in delays in publication or rejection of the paper. Articles accepted for publication become property of the journal.

Texts can be published as a review, a full paper (article) or as a short communication. Issues appear in March, June, September and December.

Types of Papers

Reviews

Reviews are published by invitation only. A proposal for a Review must be sent to the Editorial Office (aabc@abc.org.br), which will proceed accordingly.

Articles

Whenever possible the articles should be subdivided into the following parts: 1. Front Page; 2. Abstract (written on a separate page, 200 words or less, no abbreviations); 3. Introduction; 4. Materials and Methods; 5. Results; 6. Discussion; 7. Acknowledgments, if applicable; 8. References. Articles from some areas such as Mathematical Sciences should follow their usual format. In some cases it may be advisable to omit part (4) and to merge parts (5) and (6). Whenever applicable, the Materials and Methods section should indicate the Ethics Committee that evaluated the procedures for human studies or the norms followed for the maintenance and experimental treatments of animals.

Short communications

Short communications aim to report on research which has progressed to the stage when it is considered that results should be divulged rapidly to other workers in the field. A short communication should also have an Abstract and should not exceed 1,500 words. Tables and Figures may be included but the text length should be proportionally reduced. Manuscripts submitted as articles but found to fit these

specifications will be published as short communications upon the author's agreement.

After the first screening, the articles will be evaluated by at least two reviewers, them being from educational and/or national and international research institutions, with proven scientific production. After due corrections and possible suggestions, the paper may be accepted or rejected, considering the reviews received.

We use the integrated Crossref Similarity Check program to detect plagiarism.

There are no APC and submission charges in the AABC.

Preparation of manuscripts

All parts of the manuscript should be double-spaced throughout. After acceptance, no changes will be made in the manuscript so that proofs require only corrections of typographical errors. The authors should send their manuscript in electronic version only.

Length of manuscript

While papers may be of any length required for the concise presentation and discussion of the data, succinct and carefully prepared papers are favored both in terms of impact as well as in readability.

Tables and Illustrations

Only high-quality illustrations will be accepted. All illustrations will be considered figures including drawings, graphs, maps, photographs as well as tables with more than 12 columns or more than 24 lines. Their tentative placement in the text should be indicated. The AABC do not charge the first 5 figures in black and white or scale of gray. Should the authors want colored figures in the hard copy, a cost may be generated for each one of them, as well as for each figure in black and white or scale of gray beyond 5. Figures that are published in colors only in the online version do not generate additional costs.

Digitalized figures

Figures should be sent according to the following specifications: 1. Drawings and illustrations should be in format EPS (PostScript) or AI (Adobe Illustrator) and never be inserted in text; 2. Images or figures in grayscale should be in format TIF and never be inserted in text; 3. Each figure should be saved in a separate file; 4. Figures should be submitted at high quality (minimum resolution of 300dpi) at the size they are to appear in the journal, i.e., 8 cm (one column) or 16.5 cm (two columns) wide, with maximal height for each **figure and respective legend smaller than or equal to 22 cm**. The legends to the figures should be sent double-spaced on a separate page. Each linear dimension of the smallest characters and symbols should not be less than 2 mm after reduction; 5. Manuscripts on Mathematics, Physics or Chemistry may be typeset in , or . The TEX, PDF and BIB files should be sent, and EPS files if there are any figures; 6. Manuscripts without mathematical formulae may be sent in RTF, DOC or DOCX.

Front page

The front page of the manuscript should present the following items: 1. Title of the article (the title should be short, specific, and informative); 2. Full name(s) of the author(s); 3. Full professional address of each author (institution, street, number, zip code, city/county, state if applicable, country, etc.); 4. Key words (four to six in alphabetical order); 5. Running title (up to 50 characters); 6. Academy Section (one out of our 10 areas) to which the content of the work belongs; 7. Name and e-mail address of the author to whom all correspondence and proofs

should be provided. Should any of these requirements not be met, we may unsubmit your paper and ask for corrections.

Acknowledgments

These should be included at the end of the text. Personal acknowledgments should precede those of institutions or agencies. Footnotes should be avoided; when necessary they must be numbered. Acknowledgments to grants and scholarships, and of indebtedness to colleagues as well as mention to the origin of an article (e.g. thesis) should be added to the Acknowledgments section.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at their first occurrence in the text, except for official, standard abbreviations. Units and their symbols should conform to those approved by the ABNT or by the Bureau International des Poids et Mesures (SI).

References

Authors are responsible for the accuracy of the References. Published articles and those in press may be included. Personal communications (Smith, personal communication) must be authorized in writing by those involved. References to thesis, meeting abstracts (not published in indexed journals) and manuscripts in preparation or submitted, but not yet accepted, should be cited in the text as (Smith et al., unpublished data) and should NOT be included in the list of references.

The references should be cited in the text as, for example, 'Smith 2004', 'Smith and Wesson 2005' or, for three or more authors, 'Smith et al. 2006'. Two or more papers by the same author(s) in the same year should be distinguished by letters, e.g. 'Smith 2004a', 'Smith 2004b' etc. Letters should also distinguish papers by three or more authors with identical first author and year of publication. References should be listed according to the alphabetical order of the first author, always in the order SURNAME XY in which X and Y are initials. If there are more than ten authors, use et al. after the first author. References must contain the title of the article. Names of the journals should be abbreviated without dots or commas. For the correct abbreviations, refer to lists of the major databases in which the journal is indexed or consult the World List of Scientific Periodicals. The abbreviation to be used for the Anais da Academia Brasileira de Ciências is An Acad Bras Cienc. The following examples are to be considered as guidelines for the References.

REFERENCES

ALBE-FESSARD D, CONDES-LARA M, SANDERSON P AND LEVANTE A. 1984a. Tentative explanation of the special role played by the areas of paleospinothalamic projection in patients with deafferentation pain syndromes. *Adv Pain Res Ther* 6: 167-182.

ALBE-FESSARD D, SANDERSON P, CONDES-LARA M, DELAND-SHEER E, GIUFFRIDA R AND CESARO P. 1984b. Utilisation de la depression envahissante de Leão pour l'étude de relations entre structures centrales. *An Acad Bras Cienc* 56: 371-383.

KNOWLES RG AND MONCADA S. 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 298: 249-258.

PINTO ID AND SANGUINETTI YT. 1984. Mesozoic Ostracode Genus *Theriosynoecum* Branson, 1936 and validity of related Genera. *An Acad Bras Cienc* 56: 207-215.

Books and book chapters

DAVIES M. 1947. An outline of the development of Science. Thinker's Library, n. 120. London: Watts, 214 p.

PREHN RT. 1964. Role of immunity in biology of cancer. In: NATIONAL CANCER CONFERENCE, 5., Philadelphia. Proceedings ... , Philadelphia: J.

406 (4/4)

B. Lippincott, p. 97-104.

UYTENBOGAARDT W AND BURKE EAJ. 1971. Tables for microscopic identification of minerals, 2nd ed., Amsterdam: Elsevier, 430 p.

WOODY RW. 1974. Studies of theoretical circular dichroism of polypeptides: contributions of B-tums. In: BLOUTS ER ET AL. (Eds), Peptides, polypeptides and proteins, New York: J Wiley & Sons, New York, USA, p. 338-350.

[\[Home\]](#) [\[About this journal\]](#) [\[Editorial board\]](#) [\[Subscription\]](#)

 All the content of the journal, except where otherwise noted, is licensed under a [Creative Commons License](#)

Rua Anfilóbio de Carvalho, 29, 3º andar
20030-060 Rio de Janeiro RJ Brasil
Tel: +55 21 2533-6274
+55 21 2532-0562

 e-Mail

aabc@abc.org.br

407