

ELISA MARIANO PIOLTINE

**SISTEMA NPPC-NPR2 NA ESPÉCIE BOVINA:
IDENTIFICAÇÃO EM FOLÍCULOS ANTRAIS E MODULAÇÃO
NA CONCENTRAÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS CÍCLICOS
E NA EXPRESSÃO GÊNICA DE PDE3
EM COMPLEXOS *CUMULUS*-OÓCITO**

**ASSIS
2015**

ELISA MARIANO PIOLTINE

**SISTEMA NPPC-NPR2 NA ESPÉCIE BOVINA:
IDENTIFICAÇÃO EM FOLÍCULOS ANTRAIS E MODULAÇÃO
NA CONCENTRAÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS CÍCLICOS
E NA EXPRESSÃO GÊNICA DE PDE3
EM COMPLEXOS *CUMULUS*-OÓCITO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Letras de Assis – UNESP – Universidade Estadual Paulista para a obtenção do título de Mestra em Biociências (Área de Conhecimento: Caracterização e Aplicação da Diversidade Biológica).

Orientador: Marcelo Fábio Gouveia Nogueira

Co-Orientadora: Mariana Fernandes Machado

ASSIS
2015

PIOLTINE, Elisa Mariano. **Sistema NPPC-NPR2 na espécie bovina: identificação em folículos antrais e modulação na concentração de nucleotídeos cíclicos e na expressão gênica de PDE3 em complexos *cumulus*-oócito**. 2015. 91 f. Dissertação (Mestrado em Biociências). – Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis, 2015.

RESUMO

Em camundongo, estudos recentes demonstraram que o precursor do peptídeo natriurético tipo C (NPPC) e o seu receptor do tipo 2 (NPR2) são essenciais para a manutenção do bloqueio da meiose I no oócito. Além disso, fatores parácrinos secretados pelo oócito, como a proteína morfogenética óssea (BMP15), podem modular esse bloqueio pelo estímulo da expressão do gene NPR2 nas células do *cumulus* de camundongos. Em recente estudo na espécie bovina, o fluido folicular bovino (FFb), quando adicionado ao meio de maturação, interferiu na maturação nuclear do oócito e, como resultado, melhorou a produção *in vitro* de embriões. Contudo, não são conhecidos quais os fatores, presentes no FFb, que são responsáveis por esse efeito podendo inclusive haver participação das microvesículas presentes neste. Além de ser um componente do FFb, foi demonstrado que o estradiol pode participar diretamente da estimulação do NPR2. Portanto, os objetivos gerais do presente trabalho envolvem a elucidação do sistema NPPC-NPR2 no ovário bovino e a investigação da influência do NPPC exógeno, do estradiol e das vesículas extracelulares sobre a expressão do gene da PDE3 no oócito bovino e sobre a concentração de nucleotídeos cíclicos nos complexos *cumulus*-oócito. Foram realizados quatro experimentos: 1) Ensaio imunoenzimático (ELISA) para investigar a presença e a concentração do NPPC no fluido folicular, no lisado de células da granulosa mural e nas vesículas extracelulares, de acordo com a classe de diâmetro folicular (3 a 6 mm; 6 a 8 mm e >8 mm); 2) Imunolocalização do receptor NPR2 no folículo antral bovino; 3) Expressão do gene da PDE3 no oócito bovino, mediante RT-PCR em tempo real, em CCOs imaturos e maturados *in vitro* por 6 horas com NPPC exógeno, estradiol e vesículas extracelulares; 4) Mensuração da concentração de AMPc e GMPc, em oócitos e células do *cumulus*, respectivamente, imaturos e maturados *in vitro* por 6 horas com NPPC exógeno ou vesículas extracelulares, com kits específicos EIA AMPc, Format A PLUS, Biomol e EIA GMPc. No Experimento 1, a proteína NPPC foi encontrada nos três tipos de amostras, porém com uma maior concentração nas vesículas extracelulares, independente do diâmetro folicular. No Experimento 2, a maior marcação do NPR2 foi detectada nas células da granulosa mural, independente do diâmetro folicular. No Experimento 3, foi detectado o RNAm da PDE3 em oócitos imaturos e maturados *in vitro* e a abundância relativa do RNAm da PDE3 foi menor em oócitos maturados com estradiol em relação ao controle. No Experimento 4, as maiores concentrações de AMPc e de GMPc foram detectadas em CCOs imaturos em relação aos maturados *in vitro*. Respectivamente, as VEC e o NPPC propiciaram uma menor degradação de AMPc (no oócito) e de GMPc (nas células do *cumulus*). Em

conclusão, podemos inferir que o sistema NPPC-NPR2 está presente em diversos compartimentos do folículo antral bovino e que o NPPC atua direta ou indiretamente no bloqueio meiótico, seja pela inibição parcial da expressão de *PDE3* oocitária ou pela maior concentração de GMPc nas células do *cumulus* após 6 horas de MIV.

Palavras-chave: NPPC. NPR2. Maturação *in vitro*. Retomada da meiose. Expressão gênica. Complexo *cumulus*-oócito. *Bos indicus*.

PIOLTINE, Elisa Mariano. **NPPC-NPR2 system in cattle: identification in antral follicles and modulation in the concentration of cyclic nucleotides and gene expression PDE3 in *cumulus*-oocyte complex**. 2015. 91 f. Dissertação (Mestrado em Biociências). – Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis, 2015.

ABSTRACT

In mice, recent studies have demonstrated that the natriuretic peptide precursor C (NPPC) and its type-2-receptor (NPR2) are essential for the maintenance of meiosis I arrest in the oocyte. Moreover, paracrine factors secreted by the oocyte such as bone morphogenetic protein 15 (BMP15) can modulate this arrest through the expression of the NPR2 gene in *cumulus* cells of mice. In a recent study in cattle, the bovine follicular fluid (bFF) added to the maturation medium was able to interfere with the oocyte nuclear maturation resulting in higher embryo yield *in vitro*. However, it is not known what factors present in bFF might be responsible for this effect and one candidate could be the presence of microvesicles in the bFF. Additionally, the estradiol hormone is component of the bFF and was demonstrated to directly stimulate NPR2 expression. Therefore, the objectives of this work includes the investigation of the NPPC-NPR2 system in the bovine ovary and the assessment of the effects of exogenous NPPC, estradiol and extracellular vesicles on the expression of the PDE3 gene in bovine oocytes and the concentrations of cyclic-nucleotides in *cumulus*-oocyte complexes. We designed four experiments: 1) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the presence and concentration of the NPPC in follicular fluid, in the lysate of mural granulosa cells and in the extracellular vesicles, according to follicular diameter (3 to 6 mm, 6 to 8 mm, >8 mm); 2) Immunolocalization of NPR2 receptor in bovine antral follicles; 3) PDE3 gene expression in bovine oocyte by RT-PCR in real time, in immature COCs and in COCs *in vitro* matured for 6 h with exogenous NPPC, estradiol and extracellular vesicles; 4) Measurement of the concentration of cAMP and cGMP in oocytes and *cumulus* cells, respectively, either immature or matured *in vitro* for 6 h with exogenous NPPC or extracellular vesicles through specific cAMP EIA kit, Format A PLUS, and Biomol EIA cGMP. In Experiment 1, the NPPC protein was present in all three types of samples, but with a higher concentration in extracellular vesicles, regardless of follicular diameter. In Experiment 2, the highest stain of NPR2 was observed in mural granulosa cells, irrespective of follicular diameter. In Experiment 3 we detected mRNA of PDE3 in both immature and matured oocytes and the relative abundance of PDE3 mRNA was lower in oocytes matured with estradiol when compared to control group. In Experiment 4, the highest concentrations of cAMP and cGMP were detected in immature COCs in relation to the *in vitro* matured ones. Respectively, extracellular vesicles and NPPC seemed to reduce degradation of cAMP (in oocyte) and cGMP (in *cumulus* cells). In conclusion, we can infer that the NPPC-NPR2 system is present in several compartments of the bovine antral follicle and the NPPC

acts directly or indirectly in meiosis arrest either by inhibiting expression of PDE3 in the oocyte or through the increasing the cGMP concentration in *cumulus* cells after 6 h of *in vitro* maturation.

Keywords: NPPC. NPR2. Follicular fluid. *In vitro* maturation. Resumption of meiosis. Gene expression. *Cumulus*-oocyte complex. *Bos indicus*.

AGRADECIMENTOS

- Ao meu orientador, Marcelo, e co-orientadora, Mariana, por acreditarem em mim, me mostrarem o caminho da ciência, fazerem parte da minha vida nos momentos bons e ruins, por serem exemplos de profissionais as quais sempre farão parte da minha vida.
- À minha família, a qual amo muito, pelo carinho, paciência e incentivo.
- Aos amigos que fizeram parte desses momentos sempre me ajudando e incentivando.
- Aos meus amigos de laboratório Livia, Letícia, Patrícia, Eduardo, Anthony e Ramon que sempre estiveram do meu lado dando força e apoio.
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio à pesquisa (auxílio e bolsa).

EPÍGRAFE

“Agir, eis a inteligência verdadeira.
Serei o que quiser.
Mas tenho que querer o que for.
O êxito está em ter êxito, e não em ter condições de êxito.
Condições de palácio tem qualquer terra larga,
mas onde estará o palácio se não o fizerem ali?”

(Fernando Pessoa)

SUMÁRIO

Introdução Geral

Introdução.....	12
Hipóteses.....	17
Objetivos.....	18

Capítulo 1 - Imunoquantificação do peptídeo natriurético tipo C e imunolocalização do seu receptor do tipo 2 (NPR2) em folículos antrais ovarianos bovinos

Resumo.....	21
Introdução.....	22
Metodologia.....	25
Resultados e Discussão.....	31
Conclusões.....	38
Referências Bibliográficas.....	39

Capítulo 2 - Efeito do NPPC e de vesículas extracelulares (VEC) na concentração de nucleotídeos cíclicos e do NPPC, VEC e estradiol na expressão gênica da PDE3 em complexos *cumulus*-oócito bovinos

Resumo.....	45
Introdução.....	46
Metodologia.....	48
Resultados e Discussão.....	55
Conclusões.....	62
Referências Bibliográficas.....	64

Anexos

Normas de Publicação.....68

Conclusões Gerais.....81

Referências Bibliográficas.....84

INTRODUÇÃO GERAL

Esta dissertação para o programa de Mestrado em Biociências – Caracterização e Aplicação da Biodiversidade – se encontra dividida em cinco sessões principais. A primeira, denominada ***Introdução Geral***, descreve o trabalho de maneira mais profunda e detalhada. As duas partes subsequentes, ***“Imunoquantificação do peptídeo natriurético tipo C e imunolocalização do seu receptor do tipo 2 (NPR2) em folículos antrais ovarianos bovinos”*** e ***“Efeito do NPPC e de vesículas extracelulares (VEC) na concentração de nucleotídeos cíclicos e do NPPC, VEC e estradiol na expressão gênica da PDE3 em complexos cumulus-oócito bovinos”***, correspondem a duas propostas de artigos resultantes do trabalho efetuado. A sessão ***“Anexos”*** compreende as normas de publicação do periódico. Finalizando, a sessão ***“Conclusões Gerais”*** apresenta de forma sucinta os resultados obtidos.

INTRODUÇÃO

A maturação oocitária é um processo no qual o oócito adquire a capacidade intrínseca para um desenvolvimento gradual até a ativação do genoma embrionário após a fertilização (Ferreira *et al.*, 2009). Na fase embrionária, as células germinativas primordiais migram do epiblasto para o saco vitelino (McLaren 2000) e, na fase fetal, retornam para a crista genital, agora como oogônias. Estas iniciam a primeira prófase meiótica por volta de 72 a 82 dias de gestação em vacas até a primeira parada da meiose no estágio de diplóteno ou vesícula germinativa – GV (Richards 1980; van den Hurk e Zhao 2005). Ao nascimento, todos os oócitos já atingiram a prófase da primeira divisão meiótica e permanecem no estágio de GV até a retomada da meiose I e sua progressão até meiose II, o que caracteriza a maturação oocitária (Sun *et al.*, 2009).

In vivo, a retomada da maturação ocorre em resposta ao pico pré-ovulatório de LH (Edwards 1965), momento em que ocorrem diversos eventos citoplasmáticos e nucleares que preparam o oócito para a fertilização e o desenvolvimento subsequente. O estímulo hormonal leva à ativação da via da proteína cinase ativadora de mitógeno - MAPK (Dekel *et al.*, 1981) e de outras cinases como o fator promotor da maturação (MPF), também conhecido como complexo proteico CDK/ciclina B (Wu *et al.*, 1997). Em seguida, a membrana nuclear é desfeita e a cromatina é condensada em um processo conhecido como quebra da vesícula germinativa – GVBD (Gordon 1994). Estudos em roedores sugerem que o LH mediante o mecanismo da adenosina 3',5'-monofosfato cíclica (AMPc) dependente

das proteínas quinase A e C (PKA e PKC), induz a síntese de fatores parácrinos como os fatores semelhantes ao fator de crescimento epidermal (EGF-*like*) e o esterol ativador da meiose (MAS) na regulação da GVBD via duas principais MAPK nas células foliculares (ERKs 1 e 2; Sun *et al.*, 2009). Após a GVBD, os microtúbulos se reorganizam em fuso meiótico e os cromossomos homólogos separam-se para compor o primeiro corpúsculo polar. Nessa fase, a atividade de transcrição é praticamente nula para que o oócito progrida diretamente até a metáfase II (MII), sendo virtual a passagem pela fase de prófase II. O oócito permanece em MII até que ocorra a fertilização ou estímulo que a mimetize (Gordon 1994; Mamo *et al.*, 2011).

Maturação oocitária in vitro

O isolamento mecânico do oócito, de um folículo antral, induz a retomada da maturação espontânea *in vitro*, sem o requerimento de gonadotrofinas (Pincus e Enzmann, 1935). Esse fato deve-se, provavelmente, à incapacidade do oócito em manter as concentrações de AMPc, sendo que altas concentrações previnem a retomada meiótica em diversas espécies (Dekel *et al.*, 1981; Vivarelli *et al.*, 1983; Aktas *et al.*, 1995; Mamo, 2011).

Este nucleotídeo cíclico é sintetizado pela enzima adenilatociclase e degradado pela ação das fosfodiesterases (PDEs; Conti e Beavo, 2007). A ação das diferentes PDEs, na degradação do AMPc, é compartimentalizada dentro do folículo ovariano (Tsafriri *et al.*, 1996; Conti *et al.*, 2002; Sasseville *et al.*, 2009). Como exemplo, a PDE3 parece ser a principal enzima ativa no oócito, enquanto que as PDE8A e

PDE8B predominam nas células do *cumulus*, seguidas da PDE4D (Sasseville *et al.*, 2009). A utilização de inibidores específicos para os diversos subtipos de PDEs permite bloquear a ação dessas enzimas nos diferentes compartimentos foliculares e evitar a degradação do AMPc para a sua forma inativa (Sirard e First 1988; Mayes e Sirard 2002).

Além do AMPc, a guanosina monofosfato cíclica (GMPc) e as junções comunicantes tipo *gap*, que fazem o contato do oócito com as células somáticas adjacentes, têm papel fundamental na retomada precoce da meiose pois a perda dessas junções, *in vitro*, leva à interrupção da transferência de substâncias inibitórias, como o AMPc, purinas e outras supostas moléculas regulatórias (Larsen *et al.*, 1987). Desta forma, torna-se claro que o ambiente folicular mantém os oócitos parados em meiose seja pela secreção de fatores inibitórios e/ou pela supressão de moléculas estimulatórias (Downs, 1996).

Bloqueio meiótico oocitário

Em camundongos, estudos recentes demonstraram que o peptídeo natriurético do tipo C (NPPC; produzido pelas células da granulosa murais) e o seu receptor do tipo 2 (NPR2; expresso predominantemente nas células do *cumulus*) são essenciais para a manutenção do bloqueio da meiose no oócito (Zhang *et al.*, 2010).

O NPPC pertence à família dos peptídeos natriuréticos que é formada por três proteínas estruturalmente homólogas, isto é, NPPA, NPPB e NPPC. Os precursores dos peptídeos natriuréticos tipo A e B são produzidos nos átrios e ventrículos

cardíacos, respectivamente, e desempenham papéis fundamentais na regulação cardiovascular quando acoplados ao receptor tipo 1, NPR1 (Suga *et al.*, 1992). Diferentemente, o NPPC é encontrado em tecidos centrais e periféricos, atuando como um regulador local autócrino e parácrino quando ligado ao receptor NPR2, porém com pouca atividade natriurética (Koller *et al.*, 1991).

A interação do ligante NPPC com seu receptor NPR2 nas células do *cumulus* estimula a produção de guanosina monofosfato cíclica (GMPC), que é transferida para o oócito através das junções comunicantes tipo *gap*. Este nucleotídeo cíclico impede que a PDE3A atue na degradação do AMPc intraoocitário mantendo, desta forma, o bloqueio meiótico (Zhang *et al.*, 2010; Figura 1).

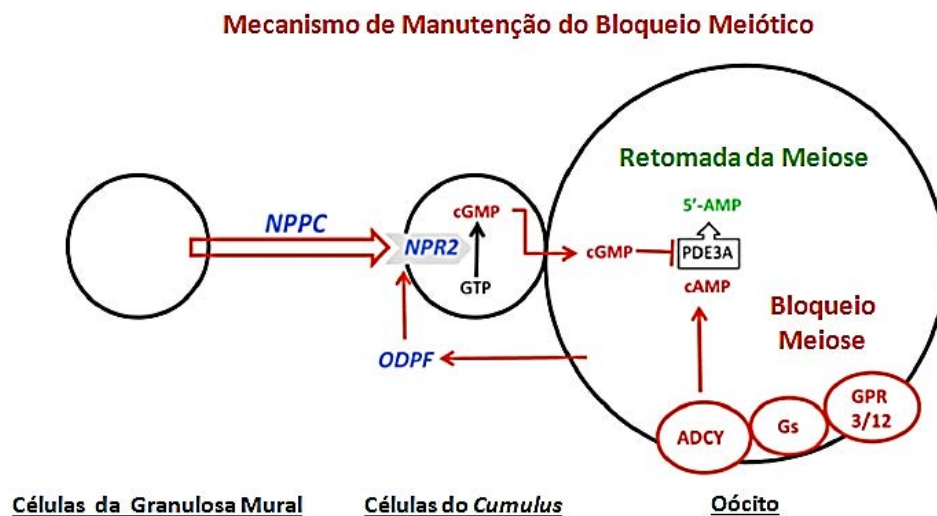


Figura 1. Modelo descritivo sobre o papel do NPPC, seu receptor (NPR2) e os fatores parácrinos secretados pelo oócito (ODPF) na manutenção do bloqueio meiótico oocitário em camundongos. ADCY (adenililciclase), GPR3/12 (receptores acoplados às proteínas Gs 3 e 12; adaptado de Zhang *et al.*, 2010).

De forma geral, o bloqueio da retomada espontânea da meiose no oócito, melhora as taxas de produção de embriões, como demonstrado pelo sistema de simulação da maturação fisiológica em bovinos e camundongos (SPOM; Albuz *et al.*, 2010). Neste sistema a maturação citoplasmática é mais sincronizada com a nuclear resultando em embriões de melhor qualidade (Thomas *et al.*, 2004). Da mesma forma, estudos com fluido folicular bovino (FFb) obtidos a partir de folículos, com diâmetro médio entre 3 e 8 mm, demonstraram efeito inibitório *in vitro* sobre a retomada meiótica de oócitos bovinos (Gonçalves *et al.*, 2001).

Na maturação *in vitro* de oócitos bovinos, a suplementação com FFb, proveniente de folículos menores que 3 mm de diâmetro e contendo células da granulosa mural, foi capaz de inibir a retomada meiótica, o que não ocorreu quando o fluido folicular foi centrifugado. Este fato decorre da presença de um fator inibitório da maturação nuclear, nas células da granulosa mural, demonstrando a importância do ambiente folicular no bloqueio meiótico. Além disso, a suplementação do meio de maturação com 5% de FFb promoveu a penetração espermática, pela melhora na expansão do *cumulus* e aumento das concentrações de ATP no oócito, o que manteve a sua competência para ser fertilizado após o estresse mitocondrial e, ao final da PIV, melhorou a taxa de produção de blastocistos (Somfai *et al.*, 2012).

Contudo, não se sabe qual fator presente no FFb seja responsável pelo bloqueio meiótico oocitário e qual o papel do sistema NPPC-NPR2 em CCOs bovinos. É possível que o estradiol atue no sistema NPPC-NPR2, uma vez que foi demonstrado que este esteroide estimula o NPR2 nas células do *cumulus* de camundongos (Zhang *et al.*, 2010). Alternativamente, o NPPC, se presente no fluido folicular e/ou

células da granulosa mural, pode influenciar diretamente a maturação quando ligado ao seu receptor nas células do *cumulus*, pelo bloqueio da PDE3A oocitária, mantendo altos níveis de AMPc intraoocitário (Zhang *et al.*, 2010).

Estudos recentes indicaram que a comunicação celular pode ser mediada pela secreção e absorção de pequenas vesículas envolvidas por uma membrana e contendo proteínas e miRNAs em seu interior, denominadas microvesículas e exossomos e, de modo geral, como vesículas extracelulares (VEC). Estas já foram demonstradas estar presentes no fluido folicular ovariano na espécie equina (Da Silveira *et al.*, 2011). Estas vesículas também podem estar contidas no fluido folicular ovariano bovino e estar relacionadas com o sistema NPPC-NPR2. Desse modo, estas poderiam conter no seu interior o NPPC ou ainda poderiam atuar de outra forma no bloqueio meiótico oocitário.

Portanto, os objetivos gerais do presente trabalho envolvem a detecção do sistema NPPC-NPR2 no ovário bovino e a investigação da influência do NPPC exógeno, do estradiol e das vesículas extracelulares sobre a expressão do gene da PDE3 no oócito bovino e sobre a concentração de nucleotídeos cíclicos nos complexos *cumulus*-oócito.

HIPÓTESES

1) A proteína NPPC está presente no compartimento antral (revestimento mural e fluido folicular) do folículo bovino;

- 2) O receptor NPR2 está presente no folículo antral bovino e está localizado, predominantemente, nas células do *cumulus oophorus*;
- 3) Quando comparado ao controle, a expressão gênica da PDE3 no oócito é menor quando este é tratado *in vitro* com o NPPC ou com um concentrado de vesículas extracelulares obtido do fluido folicular (VEC);
- 4) Quando comparado ao controle, a concentração do AMPc e do GMPc, respectivamente no oócito e nas células do *cumulus*, é maior quando houver o tratamento *in vitro* com o NPPC ou com as VEC.

OBJETIVOS

São pretendidos, como objetivos específicos:

1. Investigar a presença e a concentração do NPPC no fluido folicular, no lisado de células da granulosa mural e nas vesículas extracelulares, de acordo com a classe de diâmetro folicular (3 a 6 mm; 6 a 8 mm e >8 mm);
2. Imunolocalizar o receptor NPR2 no folículo antral bovino;
3. Avaliar o efeito da utilização, nas primeiras 6 horas da MIV, do NPPC exógeno, do estradiol e das vesículas extracelulares sobre a expressão do gene da PDE3 no oócito bovino;
4. Avaliar o efeito da utilização, nas primeiras 6 horas da MIV, do NPPC exógeno e das vesículas extracelulares na concentração de AMPc (oócito) e de GMPc (células do *cumulus*).

CAPÍTULO 1

Imunoquantificação do peptídeo natriurético tipo C e imunolocalização do seu receptor do tipo 2 (NPR2) em folículos antrais ovarianos bovinos

*Este manuscrito está de acordo com as normas para publicação no periódico **Reproductive Biology and Endocrinology**, exceto pela disposição das figuras no texto e pelo idioma.*

Endereço eletrônico: <http://www.rbej.com/authors/instructions/research>

Imunoquantificação do peptídeo natriurético tipo C e imunolocalização do seu receptor do tipo 2 (NPR2) em folículos antrais ovarianos bovinos

Elisa Mariano Pioltine^{1}*

**Autor correspondente*

Email: elisapioltine@hotmail.com

Mariana Fernandes Machado²

Email: marifmach@ibb.unesp.br

Ana Elisa Valencise Quaglio²

Email: anaequaglio@hotmail.com

Juliano Coelho da Silveira³

Email: julianodasilveira@usp.br

Renée Laufer Amorim⁴

Email: renee@fmvz.unesp.br

Marcelo Fábio Gouveia Nogueira^{1,2}

Email: marcelo@assis.unesp.com

¹*Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista, Campus Assis.*

²*Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu.*

³*Departamento de Medicina Veterinária, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Campus Pirassununga.*

⁴*Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu.*

31 **Resumo**

32 **Introdução:** Em camundongo, estudos recentes demonstraram que o precursor do
33 peptídeo natriurético tipo C (NPPC) e o seu receptor do tipo 2 (NPR2) são essenciais
34 para a manutenção do bloqueio da meiose I no oócito. Como forma de melhorar a
35 maturação *in vitro* na espécie bovina, o objetivo deste trabalho foi elucidar alguns
36 aspectos do sistema NPPC-NPR2 no folículo antral ovariano bovino.

37 **Metodologia:** Para a comprovação da presença da proteína NPPC, e de sua
38 quantificação, foi realizado um ensaio imunoenzimático (ELISA) em três tipos de
39 amostras: fluido folicular, células da granulosa murais e vesículas extracelulares. Cada
40 um destes tipos foi dividido em três grupos, de acordo com o diâmetro do folículo antral
41 que foram coletados (3 a 6 mm; 6 a 8 mm e >8 mm). Foi utilizado um kit comercial
42 ELISA (específico para a detecção da proteína de interesse). Para a localização do
43 NRP2, foi realizada a técnica de imunistoquímica em todo o ovário bovino. A análise
44 estatística utilizada para o primeiro experimento foi ANOVA, enquanto no segundo
45 experimento os dados foram analisados de modo descritivo.

46 **Resultados:** A proteína NPPC foi encontrada nos três tipos de amostras, porém com
47 uma maior concentração nas vesículas extracelulares. Houve diferença significativa
48 entre os grupos com diâmetros foliculares de 3 a 6 mm e >8 mm, com relação às
49 células da granulosa, sendo que a maior concentração foi observada nos folículos de
50 menor diâmetro. No folículo, NPR2 foi localizado nas células da granulosa murais, nas
51 células do *cumulus oophorus*, bem como nas células da teca. A maior marcação foi

observada nas células da granulosa, com menor intensidade detectada nos outros dois tipos celulares.

Conclusão: Podemos inferir que o sistema NPPC-NPR2 está presente em diversos compartimentos do folículo antral bovino, quer pelo seu ligante quer pelo seu receptor. A presença do NPPC foi maior nas vesículas extracelulares, independente do diâmetro folicular. A maior marcação do NPR2 foi detectada nas células da granulosa mural, independente do diâmetro folicular.

Palavras chaves: NPPC, NPR2, células da granulosa, fluido folicular, vesículas extracelulares, folículo antral, *Bos indicus*.

Introdução

Na fase embrionária, as células germinativas primordiais migram do epiblasto para o saco vitelino [1] e, na fase fetal, retornam para a crista genital, agora como oogônias. Estas iniciam a primeira prófase meiótica por volta de 72 a 82 dias de gestação em vacas até a primeira parada da meiose no estágio de diplóteno ou vesícula germinativa – GV [2]. Ao nascimento, todos os oócitos já atingiram a prófase da primeira divisão meiótica e permanecem no estágio de GV até a retomada da meiose I e sua progressão até meiose II, o que caracteriza a maturação oocitária [3].

71 *In vivo*, a retomada da maturação ocorre em resposta ao pico pré-ovulatório de LH [4],
72 momento em que ocorrem diversos eventos citoplasmáticos e nucleares que preparam
73 o oócito para a fertilização e o desenvolvimento subsequente.

74 O isolamento mecânico do oócito de um folículo antral induz a retomada da maturação
75 espontânea *in vitro*, sem o requerimento de gonadotrofinas [5]. Esse fato deve-se,
76 provavelmente, à incapacidade do oócito em manter as concentrações de adenosina
77 3',5'-monofosfato cíclica (AMPC), sendo que altas concentrações previnem a retomada
78 meiótica em diversas espécies [6-9].

79 Em camundongos, estudos recentes demonstraram que o NPPC (produzido pelas
80 células da granulosa murais) e o NPR2 (expresso predominantemente nas células do
81 *cumulus*) são essenciais para a manutenção do bloqueio da meiose no oócito [10].

82 O NPPC pertence à família dos peptídeos natriuréticos que é formada por três
83 proteínas estruturalmente homólogas, isto é, NPPA, NPPB e NPPC. Os natriuréticos
84 precursores dos peptídeos tipo A e B são produzidos nos átrios e ventrículos cardíacos,
85 respectivamente, e desempenham papéis fundamentais na regulação cardiovascular
86 quando acoplados ao receptor tipo 1, NPR1 [11]. Diferentemente, o NPPC é encontrado
87 em tecidos centrais e periféricos, atuando como um regulador local autócrino e
88 parácrino quando ligado ao receptor NPR2, porém com pouca atividade natriurética
89 [12].

90 A interação do ligante NPPC com seu receptor NPR2 nas células do *cumulus*, estimula
91 a produção de guanosina monofosfato cíclica (GMPc), que é transferida para o oócito
92 através das junções comunicantes tipo *gap*. Este nucleotídeo cíclico impede que as

fosfodiesterases (PDE3A) atuem na degradação do AMPc intraoocitário mantendo, desta forma, o bloqueio meiótico [10]. O AMPc no oócito é produzido pela ação da enzima adenilatociclase, a qual é ativada via ação de duas proteínas G (GPR3 e GPR12; [13]).

Na maturação *in vitro* de oócitos bovinos, a suplementação com fluido folicular bovino (FFb) proveniente de folículos menores que 3 mm de diâmetro e contendo células da granulosa murais, foi capaz de inibir a retomada meiótica, o que não ocorreu quando o fluido folicular foi centrifugado. Este fato decorre da presença de um fator inibitório da maturação nuclear, nas células da granulosa murais, demonstrando a importância do ambiente folicular no bloqueio meiótico. Além disso, a suplementação do meio de maturação com 5% de FFb promoveu a penetração espermática, pela melhora na expansão do *cumulus* e aumento das concentrações de ATP no oócito, o que manteve a sua competência para ser fertilizado após o estresse mitocondrial e, ao final da PIV, melhorou a taxa de produção de blastocistos [14].

Contudo, não se sabe qual fator presente no FFb seja responsável pelo bloqueio meiótico oocitário e qual o papel do sistema NPPC-NPR2 em CCOs bovinos. É possível que o estradiol atue no sistema NPPC-NPR2, uma vez que foi demonstrado que este esteroide estimula o NPR2 nas células do *cumulus* de camundongos [10]. Alternativamente, o NPPC, se presente no fluido folicular e/ou células da granulosa murais, pode influenciar diretamente a maturação quando ligado ao seu receptor nas células do *cumulus*, pelo bloqueio da PDE3A oocitária, mantendo altos níveis de AMPc intraoocitário [10].

Estudos recentes indicaram que a comunicação celular pode ser mediada pela secreção e absorção de pequenas vesículas envolvidas por uma membrana e contendo proteínas e miRNAs em seu interior, denominadas microvesículas e exossomos e, de modo geral, como vesículas extracelulares (VEC). Estas já foram demonstradas estar presentes no fluido folicular ovariano na espécie equina [15]. Estas vesículas também podem estar contidas no fluido folicular ovariano bovino e estar relacionadas com o sistema NPPC-NPR2. Desse modo, estas conteriam no seu interior o NPPC ou ainda poderiam atuar de modo alternativo no bloqueio meiótico oocitário.

Portanto, os objetivos do presente trabalho envolvem a detecção do sistema NPPC-NPR2 no ovário bovino, investigando a presença e a concentração do NPPC no fluido folicular, no lisado de células da granulosa mural e nas vesículas extracelulares, de acordo com a classe de diâmetro folicular (3 a 6 mm; 6 a 8 mm e >8 mm) bem como a identificação do NPR2 no folículo antral bovino.

Metodologia

1. Coleta e dissecação dos ovários para obtenção dos folículos antrais

Ovários bovinos foram coletados em abatedouro situado a 50 km de Botucatu-SP e transportados em solução fisiológica em gelo (cerca de 5°C) até o Laboratório de Fisiologia Molecular Ovariana do Departamento de Fisiologia da UNESP de Botucatu-SP. Folículos antrais foram dissecados com o auxílio de pinças oftálmicas e tesouras e separados em três grupos de acordo com o diâmetro folicular em 3 a 6 mm, 6 a 8 mm e

maior que 8 mm (Figura 1). Em seguida foram coletadas amostras de fluido folicular (FF) e células da granulosa (CG) de um pool de 10 folículos para cada grupo, totalizando seis réplicas por grupo.

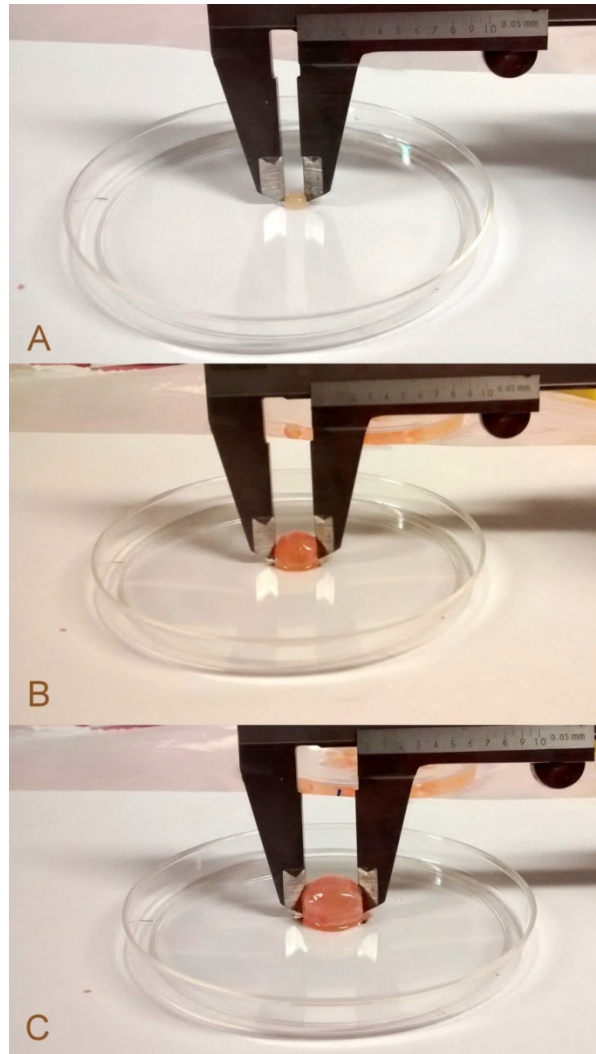


Figura 1. Folículos antrais dissecados em diferentes diâmetros. A) Folículo antral com diâmetro entre 3 e 6 mm. B) Folículo antral com diâmetro entre 6 e 8 mm. C) Folículo antral com diâmetro maior que 8 mm.

1.1. Fluido folicular (FF)

Após a dissecação dos folículos, o fluido folicular foi aspirado com o auxílio de uma agulha 26G acoplada a seringa de 1 mL para folículos de diâmetros de 3 a 6 e 6 a 8 mm, e agulha 21G acoplada a seringa de 5 mL para folículos com diâmetros maiores que 8 mm. Metade do volume das amostras foi congelado em freezer a -80°C para posterior análise da proteína por ELISA. A outra metade foi destinada a ultracentrifugação para isolamento das vesículas extracelulares (VEC).

1.2. Células da granulosa (CG)

As CG foram isoladas por lavagem da cavidade folicular mediante aspirações e ejeções sucessivas (cerca de 8 vezes) de solução fisiológica estéril utilizando uma seringa de 1 mL. Em seguida, a solução contendo as células foi centrifugada (5000 X g por 2 min) a fim de concentrar as células e possibilitar a remoção da solução fisiológica. O sedimento de CG resultante foi congelado a -80°C até a extração da proteína total.

1.3. Vesículas extracelulares (VEC)

As amostras de FF foram centrifugadas sucessivamente como descrito a seguir: 300 X g por 10 min, 2000 X g por 10 min e 10000 X g por 30 min, descartando-se o pellet ao final de cada centrifugação. Após esse procedimento, as amostras foram ultracentrifugadas em duas etapas de 100000 X g por 70 min, descartando-se o

sobrenadante a cada centrifugação [15]. O sedimento de VEC resultante foi congelado a -80°C até a extração da proteína total.

2. Extração da proteína total

As amostras de CG e VEC foram imersas em 750µL e 200µL, respectivamente, de solução Trizol[®] (Invitrogen[™]) para extração da proteína total. As CG foram trituradas utilizando-se um homogenizador de tecidos (PolytronUltraTurrax) e as VEC foram homogenizadas em vórtex por 3 min. O protocolo Trizol[®] envolve quatro etapas seqüenciais descritas a seguir: separação, precipitação, lavagem e solubilização da proteína total.

Na etapa de separação, acrescentou-se 200 e 128 µL de clorofórmio às amostras de CG e VEC, respectivamente. Em seguida as amostras foram agitadas manualmente por 15 seg e incubadas a temperatura ambiente por 5 min, seguida de centrifugação a 12000 X g por 15 min (2 a 8°C). Após a centrifugação, o sobrenadante que representa o RNA (transparente) foi descartado com o auxílio de um pipetador. Por fim, adicionou-se 400 µL de álcool 100% com centrifugação a 2000 X g por 5 min. O sobrenadante contendo a proteína foi retirado e transferido para um novo tubo de polipropileno de 1,5 mL (Eppendorf[®]). A precipitação da proteína foi realizada pela adição de 900 µL de álcool isopropílico, seguida de incubação a temperatura ambiente por 10 min e centrifugação a 12000 X g por 10 min (2 a 8°C). O sobrenadante contendo a proteína foi lavado duas vezes por sucessivas pipetagens em 500 µL de guanidina hidrocloreídrica 0.3 M em etanol 95%. As amostras foram incubadas a temperatura

ambiente por 10 min e em seguida lavadas com auxílio de vórtex e centrifugada a 8000 X g durante 5 min (2 a 8°C). O sobrenadante foi descartado e essa etapa foi repetida por mais três vezes. Na última etapa a solução de guanidina foi substituída por álcool 100% e o tempo de incubação de 20 min. Após a retirada do sobrenadante e secagem do pellet, a proteína total foi dissolvida em 10 e 3 µL de água RNase free para CG e VEC respectivamente, e armazenada a - 80°C até a investigação da NPPC por ensaio imunoenzimático.

3. Detecção da proteína NPPC por ensaio imunoenzimático (ELISA)

A proteína NPPC foi investigada em amostras de FF puro, CG e VEC pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando-se o kit C-Type Natriuretic Peptide (CNP) ELISA Kit (Blue Gene[®] - Cat. E02C0339), seguindo o protocolo do fabricante.

4. Investigação do receptor da proteína natriurética tipo dois (NPR2) por imunoistoquímica

Ovários bovinos foram obtidos em abatedouro e fixados em paraformaldeído. O tecido fixado foi mergulhado em parafina e cortes de 3 µm foram colocados em lâminas Starfrost[®] e desparafinizados em xilol duas vezes por 15 min e hidratados em banhos sucessivos de 5 min em etanol 100%, 95% e 85%, respectivamente. A recuperação antigênica foi realizada por incubação dos cortes em solução de citrato 10 nM (pH 6) por 30 min na panela de pressão Pascal (DakoCytomationR). A peroxidase endógena

foi bloqueada por incubação com uma solução 92% metanol e 8% peróxido de hidrogênio por 15 min, seguida de dez lavagens em água destilada e uma lavagem em uma solução de Tris 0,5 M (pH 7.4) por 5 min. Em seguida os cortes de tecidos foram incubados em câmara úmida com o anticorpo monoclonal murino anti-NPR2 humano (1:200; Novus Biologicals, Cat. H00004882-M01) por 18 horas a temperatura de 2 a 8°C. Após a incubação, as lâminas foram lavadas duas vezes por 5 min em Tris (pH 7.4) e incubadas com o anticorpo secundário anti-murino conjugado a peroxidase (EnVision Dual Link System; DakoCytomation®) por uma hora em temperatura ambiente. A imunomarcação foi detectada com DAB líquido (DakoCytomation®). O rim bovino foi utilizado como controle positivo para testar a funcionalidade do anticorpo e o controle negativo foi realizado pela ausência de incubação com o anticorpo primário (Anti-NPR2).

5. Análise Estatística

Para os resultados do primeiro experimento (detecção do NPPC), foi utilizado a ANOVA para a análise estatística, enquanto que para os resultados do segundo experimento (imunolocalização do NPR2) os dados foram analisados de modo descritivo.

Resultados e Discussão

O NPPC foi detectado por ELISA nos três tipos de amostras investigados, fluido folicular (FF), células da granulosa (CG) e vesículas extracelulares (VEC). Independente do diâmetro do folículo, a maior concentração de NPPC (pg/mL) foi detectada nas VEC em relação às CG e o FF (Figura 2).

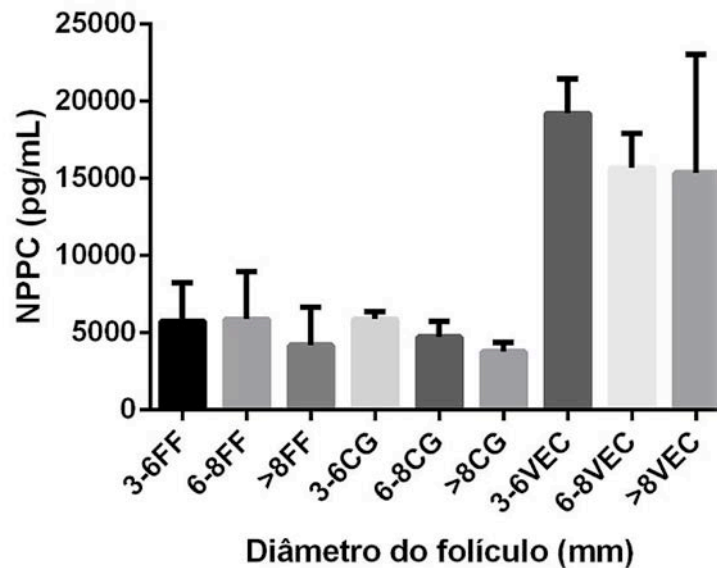


Figura 2. Concentração do NPPC nas diferentes amostras biológicas de acordo com os diâmetros foliculares. As amostras são o fluido folicular (FF), as células da granulosa mural (CG) e as vesículas extracelulares (VEC) obtidos dos folículos antrais bovinos com diâmetros entre 3 e 6 (3-6), entre 6 e 8 (6-8) e maior que 8 mm (>8).

A maior concentração de NPPC encontrada nas VEC confirma a sua presença no fluido folicular da espécie bovina, além de localizar qual seria um dos componentes do FF que conteria a NPPC. A dupla detecção do NPPC – no próprio FF bem como nas VEC –

260 suporta o potencial papel teórico deste no modelo NPPC-NPR2 para o bloqueio
261 meiótico também na espécie bovina.

262 Para melhor caracterizar a presença da proteína no FF, CG e VEC, os folículos foram
263 classificados em três categorias de acordo com o seu diâmetro (3 a 6 mm; 6 a 8 mm e
264 >8 mm).

265 Quando a análise foi realizada pelo diâmetro folicular segundo as amostras (FF, CG e
266 VEC), foi observado que as CG de folículos menores (3 a 6 mm) apresentaram maiores
267 concentrações de NPPC que as CG de folículos maiores (>8 mm; Figura 3). A fase
268 antral do crescimento folicular, até a ovulação, é regulada por mecanismos endócrinos
269 e neuroendócrinos, principalmente por gonadotrofinas hipotalâmicas e pelos esteroides
270 ovarianos [16]. Durante a onda folicular, ocorre o aumento da concentração de estradiol
271 e de inibina na circulação sistêmica, em decorrência do desenvolvimento do *pool*
272 folicular, o que induz a diminuição do FSH circulante por meio da retroalimentação
273 negativa [17]. O nadir do FSH circulante coincide com a aquisição da dominância pelo
274 folículo que conseguir mudar a dependência (de FSH para o LH) gonadotrófica [17].
275 Este evento ocorre nos folículos com diâmetros entre 6 e 8,5 mm, na dependência da
276 raça do animal, e é denominado de desvio folicular [18]. Após isto, o folículo dominante
277 ainda deverá adquirir capacidade ovulatória para que seja responsivo ao pico pré-
278 ovulatório de LH e ocorra a ovulação [18]. Podemos inferir que as concentrações de
279 NPPC encontradas em níveis mais elevado (estatisticamente nas CG, mas em termos
280 absolutos também no FF e nas VEC) nos folículos com 3 a 6 mm, poderiam indicar um
281 maior limiar para retomar a meiose em fases iniciais do crescimento do folículo antral.
282 Conforme ocorre o crescimento do folículo e este se aproxima do diâmetro pré-

ovulatório (>8 mm) a concentração do NPPC poderia ser menor e indicar um abaixamento do limiar para a retomada da meiose (deflagrado pelo pico pré-ovulatório de LH). Entretanto, o presente desenho experimental não pode corroborar ou refutar esse modelo teorizado.

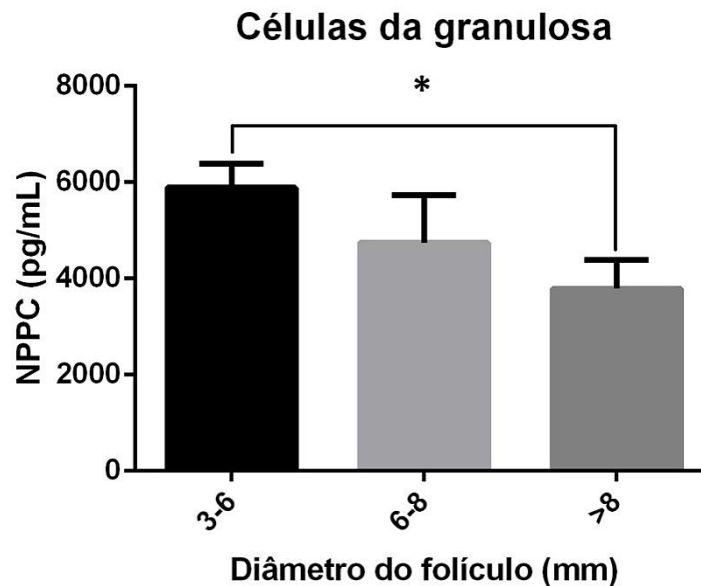


Figura 3. Concentração do NPPC nas amostras de células da granulosa de acordo com os diâmetros foliculares.

Nas amostras de FF não houve diferença significativa entre os três diâmetros foliculares analisados (Figura 4). Apesar de não haver diferença, não podemos excluir essa possibilidade, pois o número de réplicas foi pequeno (4 replicatas) para seguramente excluir um potencial efeito biológico. Entretanto, ainda que apenas fosse considerado o valor absoluto, podemos inferir que a menor concentração de NPPC foi detectada no grupo de folículos com >8 mm de diâmetro.

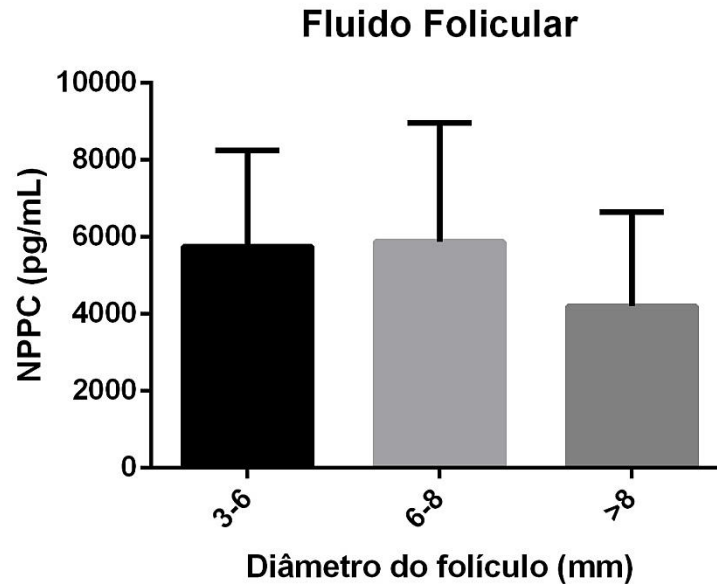


Figura 4. Concentração do NPPC nas amostras de fluido folicular de acordo com os diâmetros foliculares.

Apesar das VEC possuírem a maior concentração de NPPC, quando comparadas com as outras amostras, também não houve diferença significativa entre as categorias de diâmetro folicular analisadas (Figura 5).

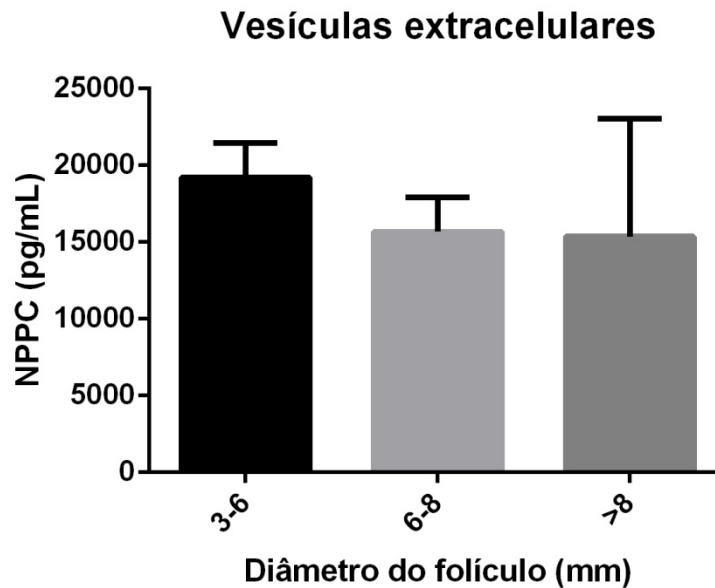


Figura 5. Concentração do NPPC nas amostras de vesículas extracelulares de acordo com os diâmetros foliculares.

Em estudo recente na espécie bovina, apesar da proteína não ter sido investigada no folículo antral, esta foi adicionada de forma exógena em uma pré-maturação *in vitro* (6 a 8 horas). A utilização do NPPC sustentou o bloqueio meiótico do oócito quando avaliado por meio da manutenção da abertura das junções *gap*. Porém, não houve diferença significativa na taxa de produção de blastocisto quando comparado ao grupo controle [19].

Em camundongos, o NPPC foi quantificado em maior concentração nas células da granulosa, quando comparado com as células do *cumulus* [10]. Assim como nesta espécie, na bovina a proteína também foi detectada nas células da granulosa. Entretanto, no presente trabalho não foram avaliadas as células do *cumulus* e, portanto, não podem ser feitas comparações diretas com as demais publicações. Do mesmo

352 modo, não há citações na literatura (para qualquer espécie) de trabalhos que utilizaram
353 amostras de fluido folicular e/ou vesículas extracelulares para a quantificação de NPPC,
354 sendo os nossos dados originais neste aspecto.

355 O NPR2 (um dos receptores do NPPC) foi investigado por meio da técnica de
356 imunistoquímica no ovário bovino, a fim de localizar as células do folículo ovariano que
357 expressam esse receptor.

358 Após a imunistoquímica, foi observada a presença de NPR2 no controle positivo (rim
359 bovino; Figura 6A). Não houve marcação quando os cortes foram incubados na
360 ausência de anticorpo primário (Figura 6D e 6F). No ovário bovino, o NPR2 foi
361 detectado predominantemente em CG e em menor intensidade nas células do *cumulus*
362 *oophorus* e no oócito. A marcação foi pouco intensa nas células da teca e nos vasos
363 sanguíneos (Figura 6B, 6C e 6E). É interessante notar que a marcação parece ser mais
364 intensa em folículos antrais iniciais (Figura 6B), porém é muito subjetivo estimar o
365 diâmetro do folículo pelos cortes terem sido realizados de forma aleatória. Outro
366 resultado interessante foi a marcação mais intensa nas CG aderidas à parede do
367 folículo (muraís; Figura 6C e 6E).

368 Esses resultados sugerem a camada de CG como o principal sítio de localização do
369 NPR2 no ovário bovino. Contrariamente à espécie bovina, em camundongos o mRNA
370 do NPR2 foi mais expresso nas células do *cumulus oophorus* em relação às CG [10].
371 Entretanto, cabe ressaltar a diferença das técnicas utilizadas (imunistoquímica e PCR)
372 nos dois trabalhos, as quais detectaram distintos alvos biológicos (epítipo proteico e
373 segmento de mRNA, respectivamente).

De forma similar aos resultados do presente trabalho, em camundongos o mRNA do NPR3 foi mais expresso em CG quando comparado às células do *cumulus* [20].

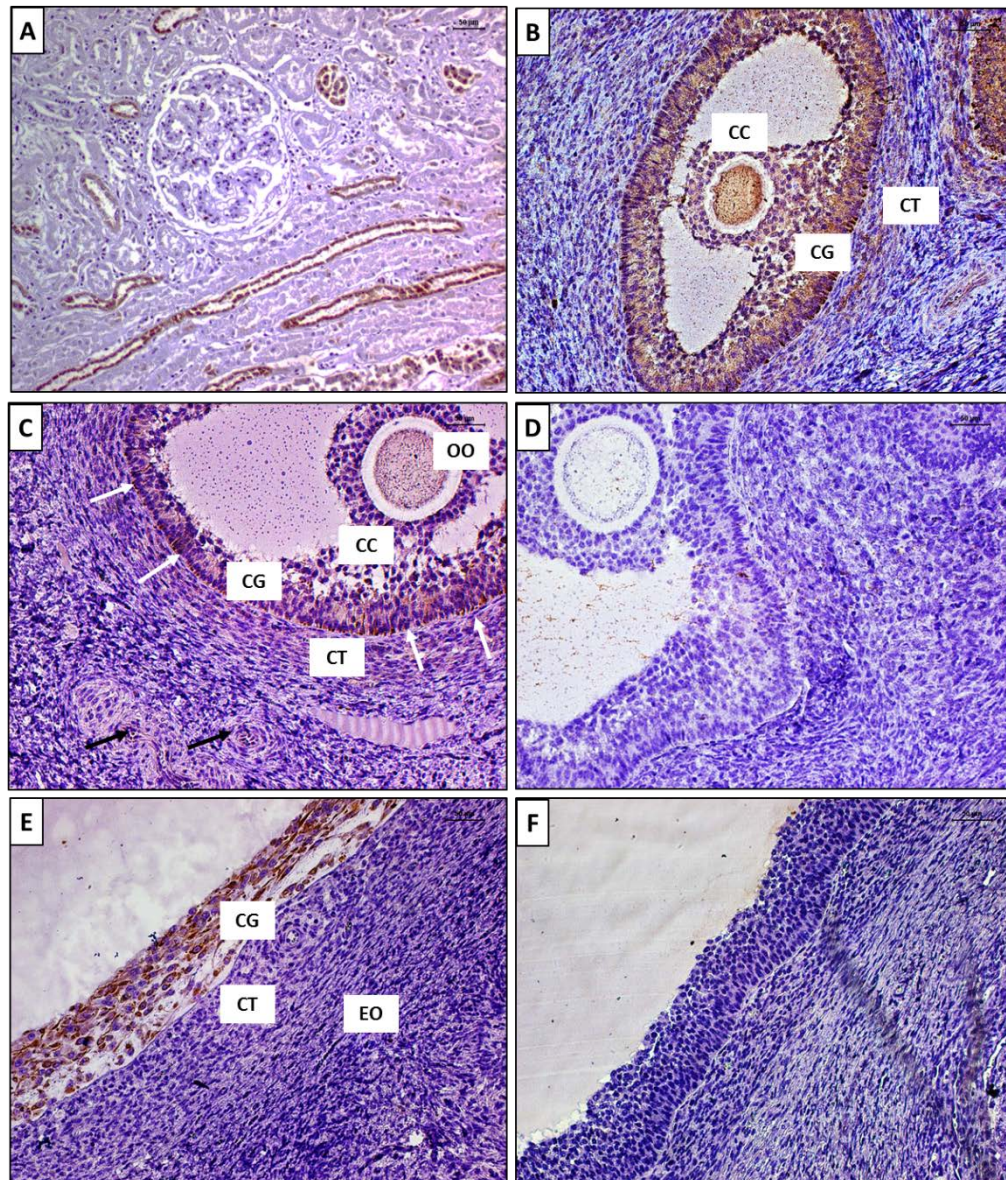


Figura 6. Imunolocalização do NPR2 no ovário da espécie bovina. A – Rim, controle positivo; B – folículo antral inicial; C – oócito e células do *cumulus*; D – controle negativo do oócito (ausência do anticorpo primário); E – Folículo antral; F - controle negativo folículo (ausência do anticorpo primário); Setas claras – marcação mais forte nas CG mural; Setas escuras – marcação mais fraca nos vasos sanguíneos.

Conclusões

- O NPPC foi detectado por ELISA nos três tipos de amostras investigados, fluido folicular (FF), células da granulosa (CG) e vesículas extracelulares (VEC).
- Em relação à CG e o FF, a maior concentração de NPPC (pg/mL) foi detectada na VEC, independente do diâmetro do folículo.
- Analisando o diâmetro folicular nos três tipos de amostras (FF, CG e VEC), as CG de folículos menores (3 a 6 mm) apresentaram maiores concentrações de NPPC que as CG de folículos maiores (>8 mm).
- No ovário bovino, o NPR2 foi detectado predominantemente em CG e em menor intensidade nas células do *cumulus oophorus* e no oócito.

Abreviaturas

NPR2, receptor do peptídeo natriurético tipo 2; NPPC, peptídeo natriurético tipo C; GV, vesícula germinativa; LH, hormônio luteinizante; AMPc, adenosina 3', 5' – monofosfato cíclica; NPPA, peptídeo natriurético tipo A; NPPB, peptídeo natriurético tipo B; NPR1, receptor do peptídeo natriurético tipo 1; GMPc, guanosina monofosfato cíclica; PDE3A, fosfodiesterase tipo 3; FFb, fluido folicular bovino; PIV, produção *in vitro*; CCOs,

419 complexo *cumulus oophorus*; VEC, vesículas extracelulares; CG, células da granulosa;
420 FSH, hormônio folículo estimulante; NPR3, receptor do peptídeo natriurético tipo 3.

421

422 **Conflito de interesses**

423 Os autores declaram que não têm interesses conflitantes.

424

425 **Contribuições dos autores**

426 Delineamento experimental: EMP, MFM e MFGN. Realização dos experimentos de
427 imunoistoquímica: EMP, MFM e RLA. Realização dos ensaios imunoenzimáticos: EMP
428 e AEVQ. Realização do processo de isolamento das vesículas extracelulares: EMP e
429 JCS. Análise dos dados e elaboração do manuscrito: EMP, MFM e MFGN.

430

431 **Agradecimentos**

432 Este trabalho foi apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São
433 Paulo (FAPESP). Processos: 2012/50533-2, 2013/05083-1 e 2013/07730-4.

434

435 **Referências Bibliográficas**

436

437 1. McLaren A: **Germ and somatic cell lineages in the developing gonad.** *Mol Cell*
438 *Endocrinol* 2000, **163**:3-9.

439

2. van den Hurk R, Zhao J: **Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles.** *Theriogenology* 2005, **63(6)**:1717- 51.
3. Sun QY, Miao YL, Schatten H: **Towards a new understanding on the regulation of mammalian oocyte meiosis resumption.** *Cell Cycle* 2009, **8(17)**:2741-7.
4. Edwards RG: **Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes.** *Nature* 1965, **208**:349-351.
5. Pincus G, Enzmann EV: **The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. I. The activation of ovarian eggs.** *J Exp Med* 1935, **62**:665-677.
6. Dekel N, Lawrence T S, Gilula N B, Beers W H: **Modulation of cell-to-cell communication in the *cumulus*-oocyte complex and the regulation of oocyte maturation by LH.** *Dev Bio* 1981, **86**:356-362.
7. Vivarelli E, Conti M, DeFelici M, Siracusa G: **Meiotic resumption and intracellular cAMP levels in mouse oocytes treated with compounds which act on cAMP metabolism.** *Cel Diff* 1983, **12**: 271-276.
8. Atkas H, Wheeler MB, First NL, Leibfried-Rutledge ML: **Maintenance of meiotic arrest by increasing [cAMP] may have physiological relevance in bovine oocytes.** *J Reprod Fertil* 1995, **105**:237-245.
9. Mamo S, Carter F, Lonergan P, Leal CL, Al Naib A, McGettigan P, Mehta JP, Evans AC, Fair T: **Sequential analysis of global gene expression profiles in immature and *in vitro* matured bovine oocytes: potential molecular markers of oocyte maturation.** *BMC Genomics* 2011, **151**:12-16.

10. Zhang M, Su YK, Sugiura K, Xia G, Eppig JJ: **Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes.** *Science* 2010, **330(6002)**:366-369.
11. Suga S, Nakao K, Hosoda K, Mukoyama M, Ogawa Y, Shirakami G, Arai H, Saito Y, Kambayashi Y, Inouye K, Imura H: **Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide.** *Endocrinology* 1992, **130**:229-239.
12. Koller KJ, Lowe DG, Bennett GL, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H, Goeddel DV: **Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP).** *Science* 1991, **252**:120-123.
13. Mehlmann LM: **Stops and starts in mammalian oocytes: Recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation.** *Reproduction* 2004, **130**:791-799.
14. Somfai T, Inaba Y, Watanabe S, Geshi M, Nagai T: **Follicular fluid supplementation during *in vitro* maturation promotes sperm penetration in bovine oocytes by enhancing *cumulus* expansion and increasing mitochondrial activity in oocytes.** *Reprod Fertil Dev* 2012, **24**:743-752.
15. Da Silveira JC, Veeramachaneni DNR, Winger QA, Carnevale EM, Bouma GJ: **Cell-Secreted Vesicles in Equine Ovarian Follicular Fluid Contain miRNAs and Proteins: A Possible New Form of Cell Communication Within the Ovarian Follicle.** *Biology of Reproduction* 2011, **86(3)**:71, 1-10.
16. Hafez ESE, Hafez, B: **Ciclos Reprodutivos.** *Reprodução Animal* 2004, **4**:55-67, 7 Ed.

- 500 17. Fortune JE, Rivera GM, Yang MY: **Follicular development: the role of the**
501 **follicular microenvironment in selection of the dominant follicle.** *Animal*
502 *Reproduction Science* 2004, **82-83**:109-126.
- 503
- 504 18. Ginther OJ, Bergfelt DR, Beg MA, Kot K: **Follicle selection in cattle: role of**
505 **luteinizing hormone.** *Biology of Reproduction* 2001, **64**:197-205.
- 506
- 507 19. Franciosi F, Coticchio G, Lodde V, Tessaro I, Modina SC, Fadini R, Canto MD,
508 Renzini MM, Albertini DF, Luciano AM: **Natriuretic peptide precursor C delays**
509 **meiotic resumption and sustains gap junction-mediated communication in bovine**
510 **cumulus-enclosed oocytes.** *Biology of Reproduction* 2014, **91**:61.
- 511
- 512 20. Lee KB; Zhang M, Sugiura K, Wigglesworth K, Uliasz T, Jaffe LA, Eppig JJ:
513 **Hormonal coordination of natriuretic peptide type C and natriuretic peptide**
514 **receptor 3 expression in mouse granulosa cells.** *Biology of Reproduction* 2013,
515 **88(2)**:42.

CAPÍTULO 2

Efeito do NPPC e de vesículas extracelulares (VEC) na concentração de nucleotídeos cíclicos e do NPPC, VEC e estradiol na expressão gênica da PDE3 em complexos *cumulus*-oócito bovinos

*Este manuscrito está de acordo com as normas para publicação no periódico **Reproductive Biology and Endocrinology**, exceto pela disposição das figuras no texto e pelo idioma.*

Endereço eletrônico: <http://www.rbej.com/authors/instructions/research>

Efeito do NPPC e de vesículas extracelulares (VEC) na concentração de nucleotídeos cíclicos e do NPPC, VEC e estradiol na expressão gênica da PDE3 em complexos *cumulus*-oócito bovinos

Elisa Mariano Pioltine^{1*}

Autor correspondente

Email: elisapioltine@hotmail.com

*Mariana Fernandes Machado*²

Email: marifmach@ibb.unesp.br

*Patricia Kubo Fontes*²

Email: pkfontes@gmail.com

*Ramon Cesar Botigelli*³

Email: ramonbotigelli@gmail.com

*Cláudia Lima Verde Leal*³

Email: clvleal@usp.br

Marcelo Fábio Gouveia Nogueira^{1,2}

Email: marcelo@assis.unesp.com

¹*Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista, Campus Assis.*

²*Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu.*

³*Departamento de Medicina Veterinária, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Campus Pirassununga.*

Resumo

Introdução: Em camundongos, estudos recentes demonstraram que o precursor do peptídeo natriurético tipo C (NPPC) e o seu receptor do tipo 2 (NPR2) são essenciais para a manutenção do bloqueio da meiose no oócito. Com o intuito de aprimorar a maturação *in vitro* na espécie bovina, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do NPPC exógeno, do estradiol e das vesículas extracelulares (VEC) sobre a expressão gênica da PDE3 no oócito bovino e na concentração de nucleotídeos cíclicos nos complexos *cumulus*-oócito (CCOs).

Metodologia: Nos dois experimentos realizados, os CCOs foram maturados por 6 horas e, posteriormente, desnudados para as análises propostas. No Experimento 1 (avaliação dos efeitos do NPPC, do estradiol e das VEC na expressão de *PDE3* oocitária), foi determinada a expressão gênica relativa da PDE3 no oócito mediante RT-PCR em tempo real. No Experimento 2 (avaliação dos efeitos do NPPC e das VEC sobre a concentração de AMPc e de GMPc mensurados, respectivamente, em oócitos e em células do *cumulus*), foram utilizados os kits EIA AMPc, Format A PLUS, Biomol e EIA GMPc, segundo protocolo do fabricante. Os efeitos dos tratamentos, nos dois experimentos, foram testados por meio da ANOVA e as médias comparadas entre si pelo teste de Dunnett.

Resultados: No Experimento 1, o RNAm da PDE3 foi detectado em oócitos imaturos e maturados *in vitro*, e a abundância relativa do transcrito dessa enzima foi semelhante entre os oócitos imaturos e o controle maturado *in vitro* por 6 horas. Em oócitos maturados com estradiol a abundância relativa do RNAm da PDE3 foi menor em

relação ao controle. Houve uma tendência do NPPC ($P=0,052$) e das VEC ($P=0,08$) em diminuir a expressão da PDE3 oocitária. No Experimento 2, as maiores concentrações de AMPc e de GMPc foram detectadas em CCOs imaturos em relação aos maturados *in vitro*. Respectivamente, as VEC e o NPPC propiciaram uma menor degradação de AMPc (no oócito) e de GMPc (nas células do *cumulus*), após 6 horas de MIV.

Conclusão: Nossos resultados reforçam a hipótese de que o NPPC potencialmente atue direta ou indiretamente na manutenção do bloqueio meiótico oocitário.

Palavras chaves: NPPC, vesículas extracelulares, estradiol, maturação *in vitro*, bloqueio meiótico oocitário, *Bos indicus*.

Introdução

In vivo, a retomada da maturação ocorre em resposta ao pico pré-ovulatório de LH [1], momento em que ocorrem diversos eventos citoplasmáticos e nucleares que preparam o oócito para a fertilização e o desenvolvimento subsequente.

O isolamento mecânico do oócito de um folículo antral induz a retomada da maturação espontânea *in vitro*, sem o requerimento de gonadotrofinas [2]. Esse fato deve-se, provavelmente, à incapacidade do oócito em manter as concentrações de adenosina 3',5'-monofosfato cíclica (AMPc), sendo que altas concentrações previnem a retomada meiótica em diversas espécies [3-5].

Em camundongos, estudos recentes demonstraram que o NPPC (produzido pelas células da granulosa muralis) e o NPR2 (expresso predominantemente nas células do *cumulus*) são essenciais para a manutenção do bloqueio da meiose no oócito [6].

A interação do ligante NPPC com seu receptor NPR2, nas células do *cumulus*, estimula a produção de guanosina monofosfato cíclica (GMPc), que é transferida para o oócito através das junções comunicantes tipo *gap*. Este nucleotídeo cíclico impede que as fosfodiesterases (PDE3A) atue na degradação do AMPc intraoocitário mantendo, desta forma, o bloqueio meiótico [6]. O AMPc no oócito é produzido pela ação da enzima adenilatociclase, a qual é ativada via ação de duas proteínas G (GPR3 e GPR12; [7]).

Da mesma forma, estudos com fluido folicular bovino (FFb) obtidos a partir de folículos, com diâmetro médio entre 3 e 8 mm, demonstraram efeito inibitório *in vitro* sobre a retomada meiótica de oócitos bovinos [8].

Na maturação *in vitro* de oócitos bovinos, a suplementação com fluido folicular bovino (FFb), proveniente de folículos menores que 3 mm de diâmetro e contendo células da granulosa mural, foi capaz de inibir a retomada meiótica, o que não ocorreu quando o fluido folicular foi centrifugado [8]. Este fato decorre da presença de um fator inibitório da maturação nuclear, nas células da granulosa mural, demonstrando a importância do ambiente folicular no bloqueio meiótico.

Contudo, não se sabe qual fator presente no FFb seja responsável pelo bloqueio meiótico oocitário e qual o papel do sistema NPPC-NPR2 em CCOs bovinos. É possível que o estradiol atue no sistema NPPC-NPR2, uma vez que foi demonstrado que este esteroide estimula o NPR2 nas células do *cumulus* de camundongos [6].

Alternativamente, o NPPC, se presente no fluido folicular e/ou células da granulosa mural, pode influenciar diretamente a maturação quando ligado ao seu receptor nas células do *cumulus*, pelo bloqueio da PDE3A oocitária, mantendo altos níveis de AMPc intraoocitário [6].

Estudos recentes indicaram que a comunicação celular pode ser mediada pela secreção e absorção de pequenas vesículas envolvidas por uma membrana e contendo proteínas e miRNAs em seu interior, denominadas microvesículas e exossomos e, de modo geral, como vesículas extracelulares (VEC). Estas já foram demonstradas estar presentes no fluido folicular ovariano na espécie equina [9]. Estas vesículas também podem estar contidas no fluido folicular ovariano bovino e estar relacionadas com o sistema NPPC-NPR2. Desse modo, estas poderiam conter no seu interior o NPPC ou ainda poderiam atuar de modo alternativo no bloqueio meiótico oocitário.

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos do NPPC exógeno, do estradiol e das VEC sobre a expressão gênica de PDE3 no oócito bovino, bem como avaliar os efeitos do NPPC exógeno e das VEC sobre a concentração de nucleotídeos cíclicos nos CCOs.

Metodologia

Quando não especificado, os produtos químicos e reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

1. Coleta e aspiração dos ovários para obtenção de vesículas extracelulares (VEC)

Ovários bovinos foram coletados em abatedouro e transportados em solução fisiológica em gelo (cerca de 5°C) até o laboratório. Folículos antrais com o diâmetro folicular entre 3 e 6 mm foram aspirados com o auxílio de uma agulha 21G acoplada a seringa de 10 mL. As VEC foram obtidas após centrifugações consecutivas de 8 mL do fluido folicular (FF) aspirado, 300 X g por 10 min, 2000 X g por 10 min e 16500 X g por 30min. Posteriormente, os sobrenadantes resultantes desta separação foram ultracentrifugados a 120000 X g por 70 min, o pellet foi lavado em PBS 1X e ultracentrifugado novamente a 120000 X g por 70 min. O pellet de vesículas resultante foi diluído em 800 µL de PBS para a utilização nos experimentos de maturação *in vitro* [9].

2. Obtenção dos oócitos

Ovários bovinos de fêmeas adultas foram coletados em abatedouro, lavados e transportados em solução fisiológica (cerca de 37°C) até o laboratório, onde se procedeu a aspiração dos folículos com diâmetro entre 3 e 8 mm. O líquido folicular obtido foi depositado em tubo cônico de 15 ml para a sedimentação dos complexos *cumulus*-oócito (CCOs). Após 10 minutos, o sedimento foi transferido para placas de petri 100X20 mm para a busca e recuperação dos CCOs, sob lupa estereomicroscópica com aumento de 25 vezes.

3. Experimento 1 – Efeito do estradiol, do NPPC e de VEC sobre a abundância relativa de RNAm de PDE3 no oócito

Foram utilizados CCOs imaturos como controle da expressão da PDE3 no oócito. Para tanto, grupos de 15 CCOs imaturos foram lavados três vezes em meio de lavagem e desnudados das células do *cumulus* por sucessivas pipetagens em PBS. Em seguida os oócitos foram transferidos para tubos de 1,5 mL acrescidos de 350 µL do Tampão Lise do kit Rneasy Micro Kit® (Qiagen) e armazenados a -80°C até a extração do RNA total.

Em seguida, grupos de 15 CCOs foram maturados em microgotas de 90 µL de meio de maturação de acordo com os grupos experimentais: 1) Grupo Controle - TCM 199 com sais de Earles suplementado com 4 mg/mL de BSA (albumina sérica bovina) livre de ácidos graxos, piruvato (11 µg/µL), amicacina (16,67 µg/µL) e rhFSH (0,1 UI/mL); 2) Estradiol - Meio controle suplementado com 10% de PBS e 17-β-estradiol (100 nM); 3) NPPC - Meio controle suplementado com 10% de PBS e NPPC (100 nM); 4) VEC - Meio controle suplementado com 10% de VEC (vesículas extracelulares diluídas em PBS). As gotas foram cobertas com óleo mineral e a incubação foi feita sob a temperatura de 38,5°C, atmosfera gasosa de 5% de CO₂ em ar e máxima umidade.

Após 6 horas de maturação os oócitos foram desnudados das células do *cumulus* por meio de sucessivas pipetagens e transferidos para tubos de 1,5 mL acrescidos de 350 µL do Tampão Lise do kit Rneasy Micro Kit® (Qiagen) e armazenados a -80°C até a extração do RNA total. Para todos os grupos foram realizadas quatro réplicas experimentais (Figura 1).

3.1. RT-PCR em tempo real

O RNA total de oócitos e células do *cumulus* provenientes de 15 CCOs foi extraído utilizando-se o kit RNeasy Micro Kit® (Qiagen) de acordo com o protocolo do fabricante. Após a purificação, as amostras foram eluídas em 30 µL de água livre de RNase e estocadas a -80°C. As concentrações de RNA total foram mensuradas por espectrofotometria utilizando o NanoDrop ND 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). O total de RNA (100 ng/reação) foi incubado com DNase I® (1 U/mg; Life Technologies) a fim de evitar interferência por contaminação com o DNA genômico. Em seguida, as amostras foram transcritas pela incubação a 25°C por 10 min, 37°C por 2 horas e 85°C por 5 min utilizando-se Oligo-d(T) primer e a enzima High-capacity (Life Technologies). Após a reação de transcrição reversa, os reagentes foram incubados a 37°C durante 60 min e 93°C durante 3 min para inativação da enzima.

A expressão gênica relativa foi realizada por RT-PCR em tempo real utilizando-se o termociclador StepOnePlus e a detecção com Power SybrGreen PCR Master Mix (Life Technologies), utilizando oligonucleotídeos iniciadores da espécie bovina. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação dos genes *PPI-A* (endógeno) e *PDE3* (alvo) estão descritos na tabela 1. As reações foram otimizadas para obter o máximo de eficiência de amplificação para cada gene. A expressão relativa de *PDE3* foi calculada utilizando o método $\Delta\Delta C_t$ corrigido pela eficiência de amplificação da reação utilizando-se a equação descrita por Pfaffl [10]. O valores médios de eficiência para cada gene foram calculados pelo perfil de amplificação de amostras individualmente pelo programa LinRegPCR [11]. O gene peptidilisomerase A (*PPIA*) foi utilizado para a normalização dos dados.

184 Tabela 1. Detalhes dos oligonucleotídeos iniciadores específicos para a espécie bovina.

Gene	Sequência	Fragmento (pb)	Anelamento (°C)	Referência
PPI-A	S: 5' GCCATGGAGCGCTTTGG 3'	65	60	[12]
	A: 5' CCACAGTCAGCAATGGTGATCT 3'			
PDE3A	S: 5' GCCGTATTCTTAGTCAGGTATC 3'	120	60	XM_002687752.2
	A: 5' CCCTATAGCCAATCTCCAAAG 3'			

185 S, primer sense; A, primer antisense

186

187 **4. Experimento 2 – Efeito do NPPC e de VEC na concentração de AMPc no**
188 **oócito e de GMPc nas células do cumulus**

189 Foram utilizados CCOs imaturos como controle dos níveis de AMPc no oócito e GMPc
190 nas células do *cumulus*. Para tanto, grupos de 25 CCOs imaturos homogêneos quanto
191 ao tamanho (com quantidade semelhante de camadas de células do *cumulus*) foram
192 lavados três vezes em meio de lavagem e desnudos das células do *cumulus* por
193 sucessivas pipetagens em gotas de PBS. As gotas contendo células do *cumulus* foram
194 transferidas para tubos de 1,5 mL e submetidas a centrifugação a 300 X g por 3 min
195 para recuperação das células e os oócitos desnudos foram colocados em tubos 1,5 mL.
196 Grupos de 40 CCOs homogêneos quanto ao tamanho (com quantidade semelhante de
197 camadas de células do *cumulus*) foram maturados em microgotas de 90 µL de meio de
198 maturação de acordo com os grupos experimentais: 1) Grupo Controle – TCM 199 com
199 sais de Earles suplementado com 4 mg/mL de BSA (albumina sérica bovina) livre de
200 ácidos graxos, piruvato (11 µg/µL), amicacina (16,67 µg/µL) e rhFSH (0,1 UI/mL); 2)
201 NPPC - Meio controle suplementado com 10% de PBS e NPPC (100 nM); 3) VEC -

Meio controle suplementado com 10% de VEC (vesículas extracelulares diluídas em PBS). As gotas foram cobertas com óleo mineral e a incubação foi feita sob a temperatura de 38,5°C, atmosfera gasosa de 5% de CO₂ em ar e máxima umidade.

Após 6 horas de maturação os oócitos foram desnudos das células do *cumulus* por sucessivas pipetagens em gotas de PBS. As gotas contendo células do *cumulus* foram transferidas para tubos de 1,5 mL e submetidas a centrifugação a 300 X g por 3 min para recuperação das células e os oócitos desnudos foram colocados em tubos 1,5 mL. Para todos os grupos foram realizadas quatro réplicas experimentais (Figura 1).

4.1. Mensuração da concentração dos nucleotídeos AMPc e GMPc

Os níveis de AMPc e GMPc foram mensurados respectivamente em oócitos (pool de 25) e células do *cumulus* (provenientes de 40 CCOs). Acrescentou-se às amostras 200 µL de solução 0,1N HCl para a lise celular por 20 min, em seguida as amostras foram centrifugadas a 12000 X g por 5 min. O líquido sobrenadante obtido após a lise e centrifugação foi transferido para novos tubos de 1,5 mL e armazenado a -20°C. As mensurações foram realizadas utilizando-se os kits EIA AMPc, Format A PLUS, Biomol e EIA GMPc, segundo protocolo do fabricante.

5. Análise Estatística

Os efeitos dos tratamentos sobre as concentrações de nucleotídeos cíclicos e sobre a abundância de RNAm de PDE3 foram testados por ANOVA e as médias comparadas com o controle pelo teste de Dunnett. Os dados são apresentados como média $\pm$ E.P.M. As análises foram realizadas no Programa JMP software (SAS Institute, Cary, NC, USA). Foram consideradas diferenças significativas quando $P < 0,05$ e valores de P entre 0,05 e 0,10 foram considerados como tendência.

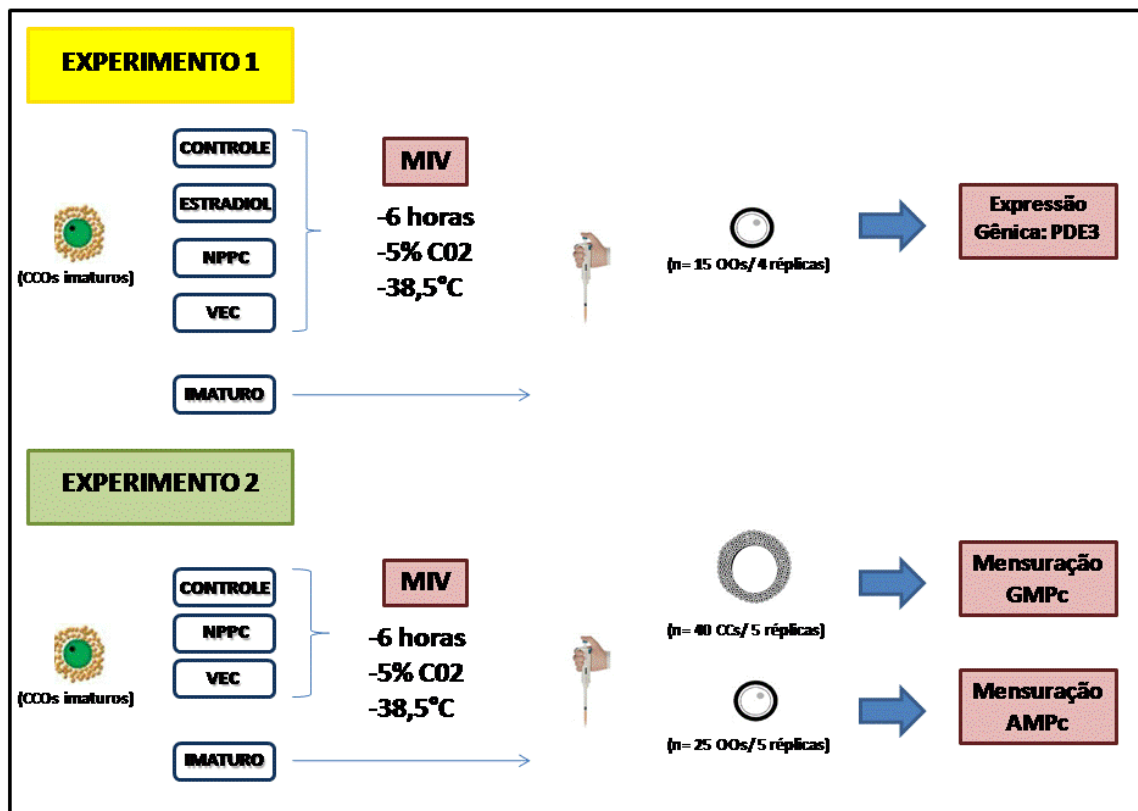


Figura 1 – Imagem ilustrativa do delineamento experimental. Experimento 1: Efeito do Estradiol, do NPPC e de VEC sobre a abundância de RNAm de PDE3 no oócito. Experimento 2: Efeito do NPPC e de VEC na concentração de AMPc no oócito e de GMPc nas células do *cumulus*.

Resultados e Discussão

Experimento 1 – Efeito do estradiol, do NPPC e de VEC sobre a expressão de PDE3 no oócito

O RNAm da PDE3 foi detectado em oócitos imaturos e maturados *in vitro* e a expressão dessa enzima em oócitos imaturos foi semelhante ao controle maturado *in vitro* por 6 horas. A escolha do momento de coleta das amostras, para investigar a expressão gênica da PDE3, foi baseada em um trabalho recente na espécie bovina [13]. Os resultados desse trabalho demonstraram que a suplementação com NPPC exógeno bloqueou a progressão da meiose até 6 a 8 horas de MIV. Após esse período, houve um aumento da quebra da vesícula germinativa, portanto supõe-se que as mudanças na expressão gênica da PDE3 ocorreriam até as 6 horas de maturação [13]. Os oócitos imaturos foram utilizados como controle da expressão da PDE3 e não foram incluídos como grupo experimental. Resultados anteriores confirmam a expressão da PDE3 em oócitos bovinos [14; 15]. Além disso, a PDE3 parece ser a fosfodiesterase mais ativa em oócitos bovinos, uma vez que a atividade de PDE dependente de AMPc foi inibida em 80% quando utilizado um inibidor específico da PDE3, isto é, a cilostamida [15].

A abundância relativa do RNAm da PDE3 foi menor em oócitos maturados com estradiol em relação ao controle (Figura 2). As fosfodiesterases são um grupo de enzimas que catalizam a transformação de nucleotídeos cíclicos em sua forma inativa [16]. Dessa forma, o presente resultado sugere a participação do estradiol – ainda que apenas em nível transcricional - no bloqueio meiótico, uma vez que a menor

abundância de transcritos da PDE3 oocitária minimizaria a degradação do AMPc que, em altas concentrações, é o responsável por sustentar o bloqueio meiótico oocitário [6].

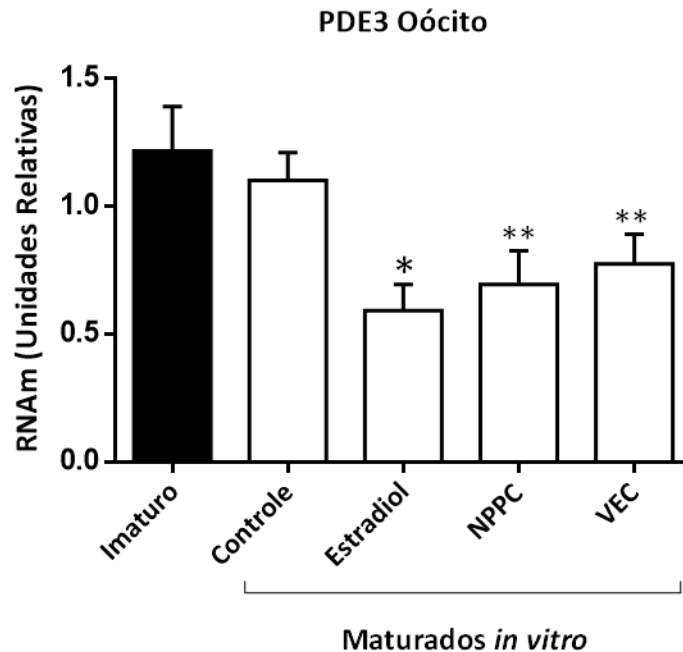


Figura 2 - Efeitos do 17- β -estradiol (100 nM; $P=0,02$), do NPPC (100 nM; $P=0,052$) e das VEC (10% v/v; $P=0,08$) na abundância relativa de RNAm da PDE3 em oócitos bovinos imaturos e maturados *in vitro* por 6 horas (pool de 15 oócitos; $n= 4$ réplicas). Dados são apresentados como média $\pm$ EPM e foram consideradas diferenças significativas quando $P<0,05$ (*) e tendência quando $P>0,05<0,10$ (**).

Dados obtidos em camundongos confirmam o papel direto do estradiol no bloqueio meiótico oocitário pela diminuição da taxa de quebra da vesícula germinativa (GVBD) após 24 horas de maturação *in vitro* [17]. Além do efeito direto do estradiol sobre a PDE3, é possível que esse hormônio influencie indiretamente no bloqueio meiótico por sinergismo com o sistema NPPC-NPR2, pois uma menor taxa de GVBD foi observada quando oócitos de camundongo foram maturados com estradiol associado ao NPPC

[18]. Confirmando essa hipótese, demonstrou-se no mesmo trabalho que o estradiol estimula a expressão do receptor NPR2 nas células do *cumulus* [18].

Apesar do resultado promissor, faltam dados funcionais sobre a participação direta do estradiol na maturação nuclear e indireta via a expressão do NPR2 em células do *cumulus* para confirmar tal hipótese para a espécie bovina.

Além do efeito do estradiol, houve uma tendência do NPPC ($P=0,052$) e das VEC ($P=0,08$) em diminuir a expressão da PDE3 no oócito após 6 horas de maturação *in vitro* (Figura 2). Apesar de ser uma tendência, não podemos descartar um efeito biológico do NPPC e das VEC (contendo NPPC) uma vez que recentes trabalhos confirmam a participação do NPPC no bloqueio meiótico oocitário em diversas espécies [6; 13; 17; 19].

Em camundongos, o modelo proposto confirma que a interação do ligante NPPC com seu receptor NPR2, nas células do *cumulus*, estimula a produção de GMPc, que é transferida ao oócito através das projeções transzonais e junções comunicantes tipo *gap*. Este nucleotídeo cíclico impede que a PDE3A atue na degradação do AMPc intraoocitário mantendo, desta forma, o bloqueio meiótico [6]. Com relação à espécie bovina, foi observada uma maior taxa de oócitos em vesícula germinativa ao final da maturação na presença de NPPC, quando comparado ao grupo controle [13]. Além disso, no mesmo trabalho, o tratamento com NPPC sustentou 60% da funcionalidade das junções *gap* por até 8 horas de MIV, mantendo a transferência do GMPc para o oócito e, conseqüentemente, o bloqueio meiótico. Em suínos, também foi demonstrado que o NPPC atua como inibidor da progressão da meiose oocitária (via NPR2, expresso

nas células do *cumulus*), por manter os oócitos parados por mais tempo em VG. Porém, até o presente momento, nenhum trabalho demonstrou a participação direta do sistema NPPC-NPR2 na inibição da expressão/atividade da PDE3, somente indiretamente pela influência desse sistema na concentração de GMPc que, conseqüentemente, modula a atividade da PDE3 oocitária bloqueando, dessa forma, a retomada da meiose em camundongos [6].

Dessa forma, nossos resultados de expressão gênica da PDE3, em oócitos maturados com NPPC, são inéditos e reforçam a hipótese de que o NPPC atua no bloqueio meiótico em oócitos bovinos. Entretanto, dados de progressão da meiose são necessários para confirmar a relação entre a expressão da *PDE3* observada e o efetivo atraso na retomada espontânea da meiose. Além disso, a própria atividade da enzima PDE3 não foi avaliada. Disso decorre que a relação direta entre a expressão gênica diminuída (estradiol, NPPC e VEC) e a diminuição da atividade desta enzima não pode ser intuitivamente inferida.

Experimento 2 - Efeito do NPPC e de VEC na concentração de AMPc no oócito e de GMPc nas células do *cumulus*

Foram observadas maiores concentrações de AMPc em oócitos imaturos quando comparados com aqueles maturados *in vitro* (Figura 3) [20;21]. Os oócitos imaturos foram utilizados como controle da concentração de AMPc, uma vez que a manutenção da parada em prófase I exige altas concentrações deste [22;23]. As concentrações de AMPc observadas no oócito imaturo bovino (910 fmol/oócito; Figura 3), foram bem

superiores ao descrito para oócitos de camundongo (2,1 fmol/oócito) e, de modo semelhante ao observado em camundongos, esses valores caem significativamente após um período de 2 horas de cultivo [21].

As VEC estimularam uma menor degradação na concentração de AMPc oocitário, quando comparado com o controle (Figura 3). Porém, esta concentração foi inferior àquela do oócito imaturo. Assim, a utilização das VEC foi incapaz de manter a concentração alta de AMPc (detectada em oócitos imaturos) durante as primeiras 6 horas de maturação *in vitro*. Quando comparado ao controle, o NPPC não alterou as concentrações de AMPc no oócito bovino após 6 horas de maturação *in vitro* (Figura 3).

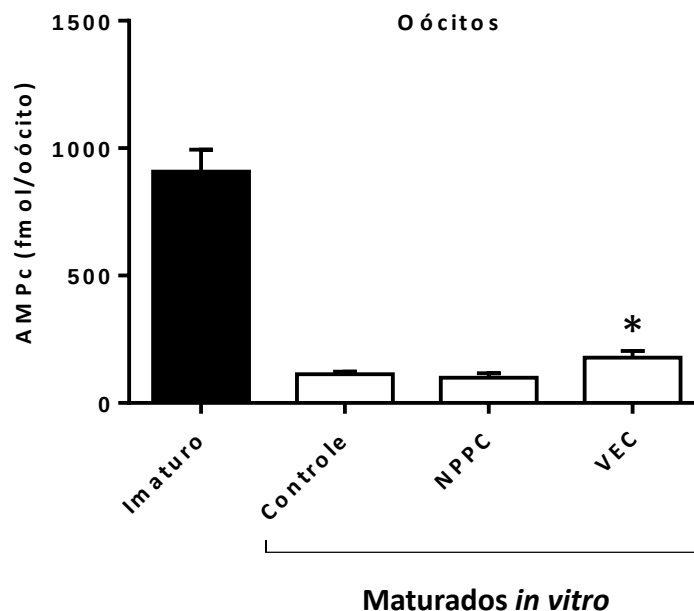


Figura 3 - Efeitos do NPPC (100 nM) e das VEC (10% v/v; $P=0,03$) sobre a concentração de AMPc em oócitos bovinos imaturos e maturados *in vitro* por 6 horas (pool de 25 oócitos; $n=4$ réplicas). Dados são apresentados como média $\pm$ EPM e foram consideradas significativas as diferenças com $P < 0,05$.

É possível que as VEC utilizadas contenham uma maior concentração da proteína NPPC (do que o próprio grupo NPPC), ou mesmo, contenham uma proteína mais funcional em seu interior influenciando, precocemente, a concentração de GMPc nas células do *cumulus*. Neste caso, a ação contrária à degradação do AMPc poderia ser detectada às 6 horas de MIV no grupo VEC, o que não ocorreu no grupo NPPC. Essa diferença de funcionalidade entre proteínas - comercialmente disponíveis ou produzidas em laboratório - já foi relatada para a BMP15. A sua forma comercial possui uma região madura que não sofreu a clivagem e, por isso, tem uma eficácia inferior e com diferente cinética quando comparada com sua forma pré-madura [24].

Assim como o AMPc, o GMPc foi mensurado em células do *cumulus* provenientes de CCOs imaturos como controle da concentração desse nucleotídeo cíclico [20]. Altas concentrações de GMPc foram observadas em células do *cumulus* de oócitos imaturos, em relação às células de oócitos maturados *in vitro* (Figura 4). Os dados de AMPc e GMPc em CCOs imaturos corroboram os dados da literatura. Desse modo, o bloqueio meiótico é mantido, no ambiente folicular, por altas concentrações de GMPc (bloqueando a PDE3 oocitária) e, conseqüentemente, mantendo alta a concentração de AMPc [3-5].

361

362

363

364

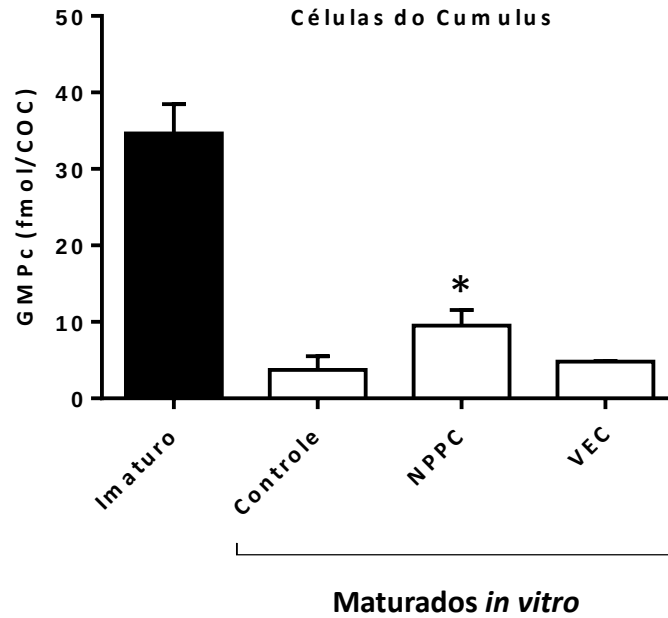


Figura 4 - Efeitos do NPPC (100 nM; $P=0,04$) e das VEC (10% v/v) nas concentrações de GMPc de células do *cumulus* provenientes de 40 CCOs bovinos imaturos ou maturados *in vitro* por 6 horas ($n=4$ réplicas). Dados são apresentados como média $\pm$ EPM e foram consideradas significativas as diferenças com $P < 0,05$.

Nos grupos maturados *in vitro* por 6 horas, a maior concentração de GMPc foi observada nos CCOs maturados na presença de NPPC (Figura 4). Quando comparada ao controle, a adição de VEC não alterou a concentração de GMPc nas células do *cumulus*. A influência do NPPC, no aumento do GMPc, parece sustentar a hipótese de bloqueio meiótico via inibição da PDE3. Contudo, apenas 6 horas de maturação não foram suficientes para demonstrar qualquer inibição na degradação da concentração de AMPc, evento que ocorreria naturalmente após o bloqueio da PDE3 [15]. Além disso e conforme já citado acima, necessitamos de dados funcionais sobre a influência do NPPC sobre a progressão da meiose oocitária.

Em camundongos, o NPPC não alterou as concentrações de GMPc ao final da MIV [18]. Porém, não há como fazer um comparativo direto com o presente trabalho visto que às 6 horas de maturação *in vitro* não avaliaram a concentração de GMPc nas células do *cumulus* [18]. Os nossos dados (maior concentração de GMPc quando os CCOs foram tratados com NPPC) corroboram o achado de que, utilizando a mesma concentração de NPPC na maturação *in vitro* de oócitos bovinos por 6 horas, observou uma menor taxa de progressão meiótica quando comparado ao controle [13].

Conclusões

Dessa forma, nossos resultados reforçam a hipótese de que o NPPC atua direta ou indiretamente na manutenção do bloqueio meiótico oocitário, quer seja pela inibição parcial da expressão gênica de PDE3 oocitária, quer pelo aumento da concentração de GMPc nas células do *cumulus*. Porém, apenas 6 horas de MIV não foram suficientes para que fosse observado um aumento da concentração de AMPc no oócito. Além disso, dados funcionais, como a avaliação da progressão da meiose, são necessários para confirmar essa participação. O efeito do estradiol, na diminuição da expressão de *PDE3*, sugere que ele tenha um papel sobre o bloqueio meiótico em oócitos bovinos, ainda que essa relação não tenha sido avaliada diretamente e de modo funcional. Finalmente, a modulação das VEC, na progressão da meiose oocitária (pela menor degradação do AMPc), pode ser apenas delineada neste trabalho, visto que essas estruturas foram recentemente descritas e pouco ainda se conhece sobre o seu modo de efetuar a resposta celular.

408 **Abreviaturas**

409 NPR2, receptor do peptídeo natriurético tipo 2; NPPC, peptídeo natriurético tipo C; GV,
410 vesícula germinativa; LH, hormônio luteinizante; AMPc, adenosina 3', 5' – monofosfato
411 cíclica; GMPc, guanosina monofosfato cíclica; PDE3A, fosfodiesterase tipo 3; FFb,
412 fluido folicular bovino; PIV, produção *in vitro*; CCOs, complexo *cumulus oophorus*; VEC,
413 vesículas extracelulares; FSH, hormônio folículo estimulante; MIV, maturação *in vitro*.

414

415 **Conflito de interesses**

416 Os autores declaram que não têm interesses conflitantes.

417

418 **Contribuições dos autores**

419 Delineamento experimental: EMP, MFM e MFGN. Realização dos experimentos de RT-
420 PCR em tempo real: EMP e PKF. Mensuração da concentração dos nucleotídeos AMPc
421 e GMPc: EMP, CLVL e RCB. Análise dos dados e elaboração do manuscrito: EMP,
422 MFM e MFGN.

423

424 **Agradecimentos**

425 Este trabalho foi apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São
426 Paulo (FAPESP). Processos: 2012/50533-2, 2013/05083-1 e 2013/07730-4.

Referências Bibliográficas

1. Edwards RG: **Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes.** *Nature* 1965, **208**:349-351.
2. Pincus G, Enzmann EV: **The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. I. The activation of ovarian eggs.** *J Exp Med* 1935, **62**:665-677.
3. Vivarelli E, Conti M, DeFelici M, Siracusa G: **Meiotic resumption and intracellular cAMP levels in mouse oocytes treated with compounds which act on cAMP metabolism.** *Cel Diff* 1983, **12**: 271-276.
4. Atkas H, Wheeler MB, First NL, Leibfried-Rutledge ML: **Maintenance of meiotic arrest by increasing [cAMP] i may have physiological relevance in bovine oocytes.** *J Reprod Fertil* 1995, **105**:237-245.
5. Mamo S, Carter F, Lonergan P, Leal CL, Al Naib A, Mc Gettigan P, Mehta JP, Evans AC, Fair T: **Sequential analysis of global gene expression profiles in immature and *in vitro* matured bovine oocytes: potential molecular markers of oocyte maturation.** *BMC Genomics* 2011, **151**:12-16.
6. Zhang M, Su YK, Sugiura K, Xia G, Eppig JJ: **Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes.** *Science* 2010, **330(6002)**:366-369.
7. Mehlmann LM: **Stops and starts in mammalian oocytes: Recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation.** *Reproduction* 2004, **130**:791-799.
8. Gonçalves P, Emanuelli I, Costa L, Machado M, Oliveira J, Neves J, Farias A. **Mural granulosa cells are responsible for the inhibitory effect of bovine follicular fluid on**

oocyte nuclear maturation. *Abstract in: 34th Annual Meeting, Society for the Study of Reproduction* 2001.

9. Da Silveira JC, Veeramachaneni DNR, Winger QA, Carnevale EM, Bouma GJ: **Cell-Secreted Vesicles in Equine Ovarian Follicular Fluid Contain miRNAs and Proteins: A Possible New Form of Cell Communication Within the Ovarian Follicle.** *Biology of Reproduction* 2011, **86**(3):71, 1-10.

10. Pfaffl MW. **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.** *Nucleic Acids Res.* 2001; **29**:e45.

11. Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH, Moorman AF. **Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data.** *Neurosci Lett* 2003, **339**:62-6.

12. Machado MF, Portela VM, Price CA, Costa IB, Ripamonte P, Amorim RL. **Regulation and action of fibroblast growth factor 17 in bovine follicles.** *J Endocrinol* 2009; **202**:347-53.

13. Franciosi F, Coticchio G, Lodde V, Tessaro I, Modina SC, Fadini R, Canto MD, Renzini MM, Albertini DF, Luciano AM: **Natriuretic peptide precursor C delays meiotic resumption and sustains gap junction-mediated communication in bovine cumulus-enclosed oocytes.** *Biology of Reproduction* 2014, **91**:61.

14. Tsafiriri A, Chun SY, Zhang R, Hsueh AJ & Conti M. **Oocyte maturation involves compartmentalization and opposing changes of cAMP levels in follicular somatic and germ cells: studies using selective phosphodiesterase inhibitors.** *Dev Biol* 1996,**178**:393–402.

- 486 15. Sasseville M, Albuz FK, Côté N, Guillemette C, Gilchrist RB & Richard FJ.
 487 **Characterization of Novel Phosphodiesterases in the Bovine Ovarian Follicle.** *Biol*
 488 *of Reprod* 2009, **81**:415–425.
- 489 16. Conti M, Beavo J. **Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide**
 490 **phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling.** *Annu*
 491 *Rev Biochem* 2007; **76**:481–511.
- 492
- 493 17. Lee KB, Zhang M, Sugiura K, Wigglesworth K, Uliasz T, Jaffe LA, Eppig
 494 JJ. **Hormonal coordination of natriuretic peptide type C and natriuretic peptide**
 495 **receptor 3 expression in mouse granulosa cells.** *Biology of Reproduction* 2014,
 496 **88(2)**:42.
- 497
- 498 18. Zhang M, Su YQ, Sugiura K, Wigglesworth K, Xia G, Eppig JJ.
 499 **Estradiol promotes and maintains cumulus cell expression of natriuretic peptide r**
 500 **eceptor 2 (NPR2) and meiotic arrest in mouse oocytes *in vitro*.** *Endocrinology* 2011,
 501 **152(11)**:4377-85.
- 502
- 503 19. Hiradate Y, Hoshino Y, Tanemura K, Sato E. **C-type natriuretic peptide inhibits**
 504 **porcine oocyte meiotic resumption.** *Zygote* 2014, **22**:372–377.
- 505
- 506 20. Norris RP, Ratzan WJ, Freudzon M, Mehlmann LM, Krall J, Movsesian MA, Wang
 507 H, Ke H, Nikolaev VO, Jaffe LA. **Cyclic GMP from the surrounding somatic cells**
 508 **regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte.** *Development* 2009,
 509 **136(11)**: 1869-78.
- 510
- 511 21. Vivarelli E, Conti M, DeFelici M and Siracusa G. **Meiotic resumption and**
 512 **intracellular cAMP levels in mouse oocytes treated with compounds which act on**
 513 **cAMP metabolism.** *Cell Differ* 1983, **12**:271-276.

- 514 22. Cho WK, Stern S and Biggers JD. **Inhibitory effect of dibutyryl cAMP on mouse**
515 **oocyte maturation *in vitro*.** *J Exp Zool* 1974 **187**:383-386.
516
- 517 23. Masciarelli S, Horner K, Liu C, Park SH, Hinckley M, Hockman S, Nedachi T, Jin C,
518 Conti M and Manganiello V. **Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A-deficient mice**
519 **as a model of female infertility.** *J Clin Invest* 2004, **114**:196-205.
520
- 521 24. Sudiman J, Sutton-McDowall ML, Ritter LJ, White MA, Mottershead DG, Thompson
522 JG, Gilchrist RB. **Bone morphogenetic protein 15 in the pro-mature complex form**
523 **enhances bovine oocyte developmental competence.** *PloS One* 2014, **9(7)**:e103563.

ANEXOS

NORMAS DE PUBLICAÇÃO – REPRODUCTIVE BIOLOGY AND ENDOCRINOLOGY

Disponível em <http://www.rbej.com/authors/instructions/research#formatting-endnotes>

Submission process

Manuscripts must be submitted by one of the authors of the manuscript, and should not be submitted by anyone on their behalf. The submitting author takes responsibility for the article during submission and peer review.

Please note that ***Reproductive Biology and Endocrinology*** levies an article-processing charge on all accepted Research Articles; if the submitting author's institution is a BioMed Central member the cost of the article-processing charge may be covered by the membership (see About page for detail). Please note that the membership is only automatically recognised on submission if the submitting author is based at the member institution.

To facilitate rapid publication and to minimize administrative costs, ***Reproductive Biology and Endocrinology*** prefers online submission.

Files can be submitted as a batch, or one by one. The submission process can be interrupted at any time; when users return to the site, they can carry on where they left off.

See below for examples of word processor and graphics file formats that can be accepted for the main manuscript document by the online submission system. Additional files of any type, such as movies, animations, or original data files, can also be submitted as part of the manuscript.

During submission you will be asked to provide a cover letter. Use this to explain why your manuscript should be published in the journal, to elaborate on any issues relating to our editorial policies in the 'About ***Reproductive Biology and Endocrinology***' page, and to declare any potential competing interests. You will be also asked to provide the contact details (including email addresses) of potential peer reviewers for your manuscript. These should be experts in their field, who will be able to provide an objective assessment of the manuscript. Any suggested peer reviewers should not have published with any of the authors of the manuscript within the past five years, should not be current collaborators, and should not be members of the same research institution. Suggested reviewers will be considered alongside potential reviewers recommended by the Editor-in-Chief and/or Editorial Board members.

Assistance with the process of manuscript preparation and submission is available from BioMed Central customer support team.

We also provide a collection of links to useful tools and resources for scientific authors on our Useful Tools page.

File formats

The following word processor file formats are acceptable for the main manuscript document:

- Microsoft word (DOC, DOCX)
- Rich text format (RTF)
- Portable document format (PDF)
- TeX/LaTeX (use [BioMed Central's TeX template](#))
- DeVice Independent format (DVI)

TeX/LaTeX users: Please use [BioMed Central's TeX template](#) and BibTeXstylefile if you use TeX format. During the TeX submission process, please submit your TeX file as the main manuscript file and your bib/bbl file as a dependent file. Please also convert your TeX file into a PDF and submit this PDF as an additional file with the name 'Reference PDF'. This PDF will be used by internal staff as a reference point to check the layout of the article as the author intended. Please also note that all figures must be coded at the end of the TeX file and not inline.

If you have used another template for your manuscript, or if you do not wish to use BibTeX, then please submit your manuscript as a DVI file. We do not recommend converting to RTF.

For all TeX submissions, all relevant editable source must be submitted during the submission process. Failing to submit these source files will cause unnecessary delays in the publication procedures.

Preparing main manuscript text

General guidelines of the journal's style and language are given below.

Overview of manuscript sections for Research Articles

Manuscripts for Research Articles submitted to ***Reproductive Biology and Endocrinology*** should be divided into the following sections (in this order):

- Title page
- Abstract
- Keywords
- Background
- Methods
- Results and discussion
- Conclusions
- List of abbreviations used (if any)
- Competing interests
- Authors' contributions
- Authors' information
- Acknowledgements
- Endnotes
- References

- Illustrations and figures (if any)
- Tables and captions
- Preparing additional files

The **Accession Numbers** of any nucleic acid sequences, protein sequences or atomic coordinates cited in the manuscript should be provided, in square brackets and include the corresponding database name; for example, [EMBL:AB026295, EMBL:AC137000, DDBJ:AE000812, GenBank:U49845, PDB:1BFM, Swiss-Prot:Q96KQ7, PIR:S66116].

The databases for which we can provide direct links are: EMBL Nucleotide Sequence Database ([EMBL](#)), DNA Data Bank of Japan ([DDBJ](#)), GenBank at the NCBI ([GenBank](#)), Protein Data Bank ([PDB](#)), Protein Information Resource ([PIR](#)) and the Swiss-Prot Protein Database ([Swiss-Prot](#)).

You can [download a template](#) (Mac and Windows compatible; Microsoft Word 98/2000) for your article.

For reporting standards please see the information in the [About](#) section.

Title page

The title page should:

- provide the title of the article
- list the full names, institutional addresses and email addresses for all authors
- indicate the corresponding author

Please note:

- the title should include the study design, for example "A versus B in the treatment of C: a randomized controlled trial X is a risk factor for Y: a case control study"
- abbreviations within the title should be avoided

Abstract

The Abstract of the manuscript should not exceed 350 words and must be structured into separate sections: **Background**, the context and purpose of the study; **Methods**, how the study was performed and statistical tests used; **Results**, the main findings; **Conclusions**, brief summary and potential implications. Please minimize the use of abbreviations and do not cite references in the abstract. **Trial registration**, if your research reports the results of a controlled health care intervention, please list your trial registry, along with the unique identifying number (e.g. **Trial registration**: Current Controlled Trials ISRCTN73824458). Please note that there should be no space between the letters and numbers of your trial registration number. We recommend manuscripts that report randomized controlled trials follow the [CONSORT extension for abstracts](#).

Keywords

Three to ten keywords representing the main content of the article.

Background

The Background section should be written in a way that is accessible to researchers without specialist knowledge in that area and must clearly state - and, if helpful, illustrate - the background to the research and its aims. Reports of clinical research should, where appropriate,

include a summary of a search of the literature to indicate why this study was necessary and what it aimed to contribute to the field. The section should end with a brief statement of what is being reported in the article.

Methods

The methods section should include the design of the study, the setting, the type of participants or materials involved, a clear description of all interventions and comparisons, and the type of analysis used, including a power calculation if appropriate. Generic drug names should generally be used. When proprietary brands are used in research, include the brand names in parentheses in the Methods section.

For studies involving human participants a statement detailing ethical approval and consent should be included in the methods section. For further details of the journal's editorial policies and ethical guidelines see ['About this journal'](#).

For further details of the journal's data-release policy, see the policy section in ['About this journal'](#).

Results and discussion

The Results and discussion may be combined into a single section or presented separately. Results of statistical analysis should include, where appropriate, relative and absolute risks or risk reductions, and confidence intervals. The Results and discussion sections may also be broken into subsections with short, informative headings.

Conclusions

This should state clearly the main conclusions of the research and give a clear explanation of their importance and relevance. Summary illustrations may be included.

List of abbreviations

If abbreviations are used in the text they should be defined in the text at first use, and a list of abbreviations can be provided, which should precede the competing interests and authors' contributions.

Competing interests

A competing interest exists when your interpretation of data or presentation of information may be influenced by your personal or financial relationship with other people or organizations. Authors must disclose any financial competing interests; they should also reveal any non-financial competing interests that may cause them embarrassment were they to become public after the publication of the manuscript.

Authors are required to complete a declaration of competing interests. All competing interests that are declared will be listed at the end of published articles. Where an author gives no competing interests, the listing will read 'The author(s) declare that they have no competing interests'.

When completing your declaration, please consider the following questions:

Financial competing interests

- In the past five years have you received reimbursements, fees, funding, or salary from an organization that may in any way gain or lose financially from the publication of this manuscript, either now or in the future? Is such an organization financing this manuscript (including the article-processing charge)? If so, please specify.
- Do you hold any stocks or shares in an organization that may in any way gain or lose financially from the publication of this manuscript, either now or in the future? If so, please specify.
- Do you hold or are you currently applying for any patents relating to the content of the manuscript? Have you received reimbursements, fees, funding, or salary from an organization that holds or has applied for patents relating to the content of the manuscript? If so, please specify.
- Do you have any other financial competing interests? If so, please specify.

Non-financial competing interests

Are there any non-financial competing interests (political, personal, religious, ideological, academic, intellectual, commercial or any other) to declare in relation to this manuscript? If so, please specify.

If you are unsure as to whether you, or one your co-authors, has a competing interest please discuss it with the editorial office.

Authors' contributions

In order to give appropriate credit to each author of a paper, the individual contributions of authors to the manuscript should be specified in this section.

According to ICMJE guidelines, An 'author' is generally considered to be someone who has made substantive intellectual contributions to a published study. To qualify as an author one should 1) have made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data; 2) have been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content; 3) have given final approval of the version to be published; and 4) agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content. Acquisition of funding, collection of data, or general supervision of the research group, alone, does not justify authorship.

We suggest the following kind of format (please use initials to refer to each author's contribution): AB carried out the molecular genetic studies, participated in the sequence alignment and drafted the manuscript. JY carried out the immunoassays. MT participated in the sequence alignment. ES participated in the design of the study and performed the statistical analysis. FG conceived of the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

All contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person

who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support.

Authors' information

You may choose to use this section to include any relevant information about the author(s) that may aid the reader's interpretation of the article, and understand the standpoint of the author(s). This may include details about the authors' qualifications, current positions they hold at institutions or societies, or any other relevant background information. Please refer to authors using their initials. Note this section should not be used to describe any competing interests.

Acknowledgements

Please acknowledge anyone who contributed towards the article by making substantial contributions to conception, design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data, or who was involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content, but who does not meet the criteria for authorship. Please also include the source(s) of funding for each author, and for the manuscript preparation. Authors must describe the role of the funding body, if any, in design, in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. Please also acknowledge anyone who contributed materials essential for the study. If a language editor has made significant revision of the manuscript, we recommend that you acknowledge the editor by name, where possible.

The role of a scientific (medical) writer must be included in the acknowledgements section, including their source(s) of funding. We suggest wording such as 'We thank Jane Doe who provided medical writing services on behalf of XYZ Pharmaceuticals Ltd.'

Authors should obtain permission to acknowledge from all those mentioned in the Acknowledgements section.

Endnotes

Endnotes should be designated within the text using a superscript lowercase letter and all notes (along with their corresponding letter) should be included in the Endnotes section. Please format this section in a paragraph rather than a list.

References

All references, including URLs, must be numbered consecutively, in square brackets, in the order in which they are cited in the text, followed by any in tables or legends. Each reference must have an individual reference number. Please avoid excessive referencing. If automatic numbering systems are used, the reference numbers must be finalized and the bibliography must be fully formatted before submission.

Only articles, datasets, clinical trial registration records and abstracts that have been published or are in press, or are available through public e-print/preprint servers, may be cited; unpublished abstracts, unpublished data and personal communications should not be included in the reference list, but may be included in the text and referred to as "unpublished

observations" or "personal communications" giving the names of the involved researchers. Obtaining permission to quote personal communications and unpublished data from the cited colleagues is the responsibility of the author. Footnotes are not allowed, but endnotes are permitted. Journal abbreviations follow Index Medicus/MEDLINE. Citations in the reference list should include all named authors, up to the first 30 before adding '*et al.*'..

Any *in press* articles cited within the references and necessary for the reviewers' assessment of the manuscript should be made available if requested by the editorial office.

Style files are available for use with popular bibliographic management software:

- [BibTeX](#)
- [EndNote style file](#)
- [Reference Manager](#)
- [Zotero](#)

Examples of the **Reproductive Biology and Endocrinology** reference style are shown below. Please ensure that the reference style is followed precisely; if the references are not in the correct style they may have to be retyped and carefully proofread.

All web links and URLs, including links to the authors' own websites, should be given a reference number and included in the reference list rather than within the text of the manuscript. They should be provided in full, including both the title of the site and the URL, in the following format: **The Mouse Tumor Biology Database** [http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do]. If an author or group of authors can clearly be associated with a web link, such as for weblogs, then they should be included in the reference.

Examples of the Reproductive Biology and Endocrinology reference style

Article within a journal

Koonin EV, Altschul SF, Bork P: **BRCA1 protein products: functional motifs.** *Nat Genet* 1996,**13**:266-267.

Article within a journal supplement

Orengo CA, Bray JE, Hubbard T, LoConte L, Sillitoe I: **Analysis and assessment of ab initio three-dimensional prediction, secondary structure, and contacts prediction.** *Proteins* 1999, **43**(Suppl 3):149-170.

In press article

Kharitonov SA, Barnes PJ: **Clinical aspects of exhaled nitric oxide.** *EurRespir J*, in press.

Published abstract

Zvaifler NJ, Burger JA, Marinova-Mutafchieva L, Taylor P, Maini RN: **Mesenchymal cells, stromal derived factor-1 and rheumatoid arthritis [abstract].** *Arthritis Rheum* 1999, **42**:s250.

Article within conference proceedings

Jones X: **Zeolites and synthetic mechanisms**. In ***Proceedings of the First National Conference on Porous Sieves: 27-30 June 1996; Baltimore***. Edited by Smith Y. Stoneham: Butterworth-Heinemann; 1996:16-27.

Book chapter, or article within a book

Schnepf E: **From prey via endosymbiont to plastids: comparative studies in dinoflagellates**. In ***Origins of Plastids. Volume 2***. 2nd edition. Edited by Lewin RA. New York: Chapman and Hall; 1993:53-76.

Whole issue of journal

Ponder B, Johnston S, Chodosh L (Eds): **Innovative oncology**. In ***Breast Cancer Res*** 1998, **10**:1-72.

Whole conference proceedings

Smith Y (Ed): ***Proceedings of the First National Conference on Porous Sieves: 27-30 June 1996; Baltimore***. Stoneham: Butterworth-Heinemann; 1996.

Complete book

Margulis L: ***Origin of Eukaryotic Cells***. New Haven: Yale University Press; 1970.

Monograph or book in a series

Hunninghake GW, Gadek JE: **The alveolar macrophage**. In ***Cultured Human Cells and Tissues***. Edited by Harris TJR. New York: Academic Press; 1995:54-56. [Stoner G (Series Editor): ***Methods and Perspectives in Cell Biology***, vol 1.]

Book with institutional author

Advisory Committee on Genetic Modification: ***Annual Report***. London; 1999.

PhD thesis

Kohavi R: **Wrappers for performance enhancement and oblivious decision graphs**. ***PhD thesis***. Stanford University, Computer Science Department; 1995.

Link / URL

The Mouse Tumor Biology Database [<http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>]

Link / URL with author(s)

Corpas M: **The Crowdfunding Genome Project: a personal genomics community with open source values** [<http://blogs.biomedcentral.com/bmcblog/2012/07/16/the-crowdfunding-genome-project-a-personal-genomics-community-with-open-source-values/>]

Dataset with persistent identifier

Zheng, L-Y; Guo, X-S; He, B; Sun, L-J; Peng, Y; Dong, S-S; Liu, T-F; Jiang, S; Ramachandran, S; Liu, C-M; Jing, H-C (2011): **Genome data from sweet and grain sorghum (*Sorghum bicolor*). *Giga Science Database***. <http://dx.doi.org/10.5524/100012>.

Clinical trial registration record with persistent identifier

Mendelow, AD (2006): **Surgical Trial in Lobar Intracerebral Haemorrhage**. Current Controlled Trials. <http://dx.doi.org/10.1186/ISRCTN22153967>

Preparing illustrations and figures

Illustrations should be provided as separate files, not embedded in the text file. Each figure should include a single illustration and should fit on a single page in portrait format. If a figure consists of separate parts, it is important that a single composite illustration file be submitted which contains all parts of the figure. There is no charge for the use of color figures.

Please read our [figure preparation guidelines](#) for detailed instructions on maximising the quality of your [figures](#).

Formats

The following file formats can be accepted:

- PDF (preferred format for diagrams)
- DOCX/DOC (single page only)
- PPTX/PPT (single slide only)
- EPS
- PNG (preferred format for photos or images)
- TIFF
- JPEG
- BMP

Figure legends

The legends should be included in the main manuscript text file at the end of the document, rather than being a part of the figure file. For each figure, the following information should be provided: Figure number (in sequence, using Arabic numerals - i.e. Figure 1, 2, 3etc); short title of figure (maximum 15 words); detailed legend, up to 300 words.

Please note that it is the responsibility of the author(s) to obtain permission from the copyright holder to reproduce figures or tables that have previously been published elsewhere.

Preparing tables

Each table should be numbered and cited in sequence using Arabic numerals (i.e. Table 1, 2, 3 etc.). Tables should also have a title (above the table) that summarizes the whole table; it should be no longer than 15 words. Detailed legends may then follow, but they should be concise. Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

Smaller tables considered to be integral to the manuscript can be pasted into the end of the document text file, in A4 portrait or landscape format. These will be typeset and displayed in the final published form of the article. Such tables should be formatted using the 'Table object' in a word processing program to ensure that columns of data are kept aligned when the file is sent electronically for review; this will not always be the case if columns are generated by simply using tabs to separate text. Columns and rows of data should be made visibly distinct by ensuring that the borders of each cell display as black lines. Commas should not be used to indicate numerical values. Color and shading may not be used; parts of the table can be highlighted using symbols or bold text, the meaning of which should be explained in a table legend. Tables should not be embedded as figures or spreadsheet files.

Larger datasets or tables too wide for a landscape page can be uploaded separately as additional files. Additional files will not be displayed in the final, laid-out PDF of the article, but a link will be provided to the files as supplied by the author.

Tabular data provided as additional files can be uploaded as an Excel spreadsheet (.xls) or comma separated values (.csv). As with all files, please use the standard file extensions.

Preparing additional files

Although ***Reproductive Biology and Endocrinology*** does not restrict the length and quantity of data included in an article, we encourage authors to provide datasets, tables, movies, or other information as additional files.

Please note: All Additional files **will be published** along with the article. Do not include files such as patient consent forms, certificates of language editing, or revised versions of the main manuscript document with tracked changes. Such files should be sent by email to rbej@rbejournal.com, quoting the Manuscript ID number.

Results that would otherwise be indicated as "data not shown" can and should be included as additional files. Since many weblinks and URLs rapidly become broken, **Reproductive Biology and Endocrinology** requires that supporting data are included as additional files, or deposited in a recognized repository. Please do not link to data on a personal/departmental website. The maximum file size for additional files is 20 MB each, and files will be virus-scanned on submission.

Additional files can be in any format, and will be downloadable from the final published article as supplied by the author. We recommend CSV rather than PDF for tabular data.

Certain supported files formats are recognized and can be displayed to the user in the browser. These include most movie formats (for users with the Quicktime plugin), mini-websites prepared according to our guidelines, chemical structure files (MOL, PDB), geographic data files (KML).

If additional material is provided, please list the following information in a separate section of the manuscript text:

- File name (e.g. Additional file 1)
- File format including the correct file extension for example .pdf, .xls, .txt, .pptx (including name and a URL of an appropriate viewer if format is unusual)
- Title of data
- Description of data

Additional files should be named "Additional file 1" and so on and should be referenced explicitly by file name within the body of the article, e.g. 'An additional movie file shows this in more detail [see Additional file 1]'.

Additional file formats

Ideally, file formats for additional files should not be platform-specific, and should be viewable using free or widely available tools. The following are examples of suitable formats.

- Additional documentation
 - PDF (Adobe Acrobat)
- Animations
 - SWF (Shockwave Flash)
- Movies
 - MP4 (MPEG 4)
 - MOV (Quicktime)
- Tabular data
 - XLS, XLSX (Excel Spreadsheet)
 - CSV (Comma separated values)

As with figure files, files should be given the standard file extensions.

Mini-websites

Small self-contained websites can be submitted as additional files, in such a way that they will be browsable from within the full text HTML version of the article. In order to do this, please follow these instructions:

1. Create a folder containing a starting file called index.html (or index.htm) in the root.
2. Put all files necessary for viewing the mini-website within the folder, or sub-folders.
3. Ensure that all links are relative (ie "images/picture.jpg" rather than "/images/picture.jpg" or "http://yourdomain.net/images/picture.jpg" or "C:\Documents and Settings\username\My Documents\mini-website\images\picture.jpg") and no link is longer than 255 characters.
4. Access the index.html file and browse around the mini-website, to ensure that the most commonly used browsers (Internet Explorer and Firefox) are able to view all parts of the mini-website without problems, it is ideal to check this on a different machine.
5. Compress the folder into a ZIP, check the file size is under 20 MB, ensure that index.html is in the root of the ZIP, and that the file has .zip extension, then submit as an additional file with your article.

Style and language

General

Currently, ***Reproductive Biology and Endocrinology*** can only accept manuscripts written in English. Spelling should be US English or British English, but not a mixture.

There is no explicit limit on the length of articles submitted, but authors are encouraged to be concise.

Reproductive Biology and Endocrinology will not edit submitted manuscripts for style or language; reviewers may advise rejection of a manuscript if it is compromised by grammatical errors. Authors are advised to write clearly and simply, and to have their article checked by colleagues before submission. In-house copyediting will be minimal. Non-native speakers of English may choose to make use of a copyediting service.

Help and advice on scientific writing

The abstract is one of the most important parts of a manuscript. For guidance, please visit our page on [Writing titles and abstracts for scientific articles](#).

Tim Albert has produced for BioMed Central a [list of tips](#) for writing a scientific manuscript. [American Scientist](#) also provides a list of resources for science writing. For more detailed guidance on preparing a manuscript and writing in English, please visit the [BioMed Central author academy](#).

Abbreviations

Abbreviations should be used as sparingly as possible. They should be defined when first used and a list of abbreviations can be provided following the main manuscript text.

Typography

- Please use double line spacing.

- Type the text unjustified, without hyphenating words at line breaks.
- Use hard returns only to end headings and paragraphs, not to rearrange lines.
- Capitalize only the first word, and proper nouns, in the title.
- All lines and pages should be numbered. Authors are asked to ensure that line numbering is included in the main text file of their manuscript at the time of submission to facilitate peer-review. Once a manuscript has been accepted, line numbering should be removed from the manuscript before publication. For authors submitting their manuscript in Microsoft Word please do not insert page breaks in your manuscript to ensure page numbering is consistent between your text file and the PDF generated from your submission and used in the review process.
- Use the ***Reproductive Biology and Endocrinology*** reference format.
- Footnotes are not allowed, but endnotes are permitted.
- Please do not format the text in multiple columns.
- Greek and other special characters may be included. If you are unable to reproduce a particular special character, please type out the name of the symbol in full. **Please ensure that all special characters used are embedded in the text, otherwise they will be lost during conversion to PDF.**

Units

SI units should be used throughout (liter and molar are permitted, however).

CONCLUSÕES GERAIS

Conforme os resultados obtidos, apenas a hipótese 1 foi aceita:

1) O NPPC foi detectado, por ELISA, nos três tipos investigados de amostras oriundas do folículo antral bovino, quais sejam, fluido folicular, células da granulosa mural e vesículas extracelulares.

De modo adicional, foi observado que:

- Em relação às células da granulosa e o fluido folicular, a maior concentração de NPPC (pg/mL) foi detectada nas vesículas extracelulares, independente do diâmetro do folículo;
- Analisando o diâmetro folicular nos três tipos de amostras (fluido folicular, células da granulosa e vesículas extracelulares), apenas nas células da granulosa foi observada diferença estatística entre as três classes de diâmetros foliculares. Nas amostras de folículos com diâmetro entre 3e 6 mm foram detectadas as maiores concentrações de NPPC, quando comparadas com àquelas de folículos com diâmetro >8 mm.

Quanto às hipóteses 2, 3 e 4, elas foram refutadas:

2) O receptor NPR2 está presente no folículo antral bovino e está localizado, predominantemente, nas células do *cumulus oophorus*.

Conclusão: No ovário bovino, o NPR2 foi detectado, de forma majoritária, em células da granulosa e, em menor intensidade, nas células do *cumulus oophorus* e no oócito.

3) Quando comparado ao controle, a expressão gênica da PDE3 no oócito é menor quando este é tratado *in vitro* com o NPPC ou com um concentrado de vesículas extracelulares obtido do fluido folicular (VEC).

Conclusão: A abundância relativa do RNAm da PDE3 foi menor em oócitos maturados *in vitro* por 6 horas com estradiol em relação ao controle.

De modo adicional, foi observado que:

- Foi detectado o RNAm da PDE3 em oócitos imaturos e maturados *in vitro* e a expressão gênica dessa enzima, em oócitos imaturos, foi semelhante ao controle maturado *in vitro* por 6 horas.

4) Quando comparado ao controle, a concentração do AMPc e do GMPc, respectivamente no oócito e nas células do *cumulus*, é maior quando houver o tratamento *in vitro* com o NPPC ou com as vesículas extracelulares.

Conclusão: As vesículas extracelulares e o NPPC, respectivamente, propiciaram uma menor degradação de AMPc (no oócito) e de GMPc (nas células do *cumulus*).

De modo adicional, foi observado que:

- As maiores concentrações de AMPc e de GMPc foram detectadas em CCOs imaturos em relação aos maturados *in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albuz, F.K., Sasseville, M., Lane, M., Armstrong, D.T., Thompson, J.G., and Gilchrist, R.B. Simulate dphysiological oocyte maturation (SPOM): A novel *in vitro* maturation system that substantially improves embryo ield and pregnancy out comes. **Hum. Reprod.** 25:2999-3011, 2010.

Atkas H., Wheeler M.B., First N.L., Leibfried-Rutledge M.L. Maintenance of meiotic arrest by increasing [cAMP] i may have physiological relevance in bovine oocytes. **J. Reprod. Fertil.** 105:237-245, 1995.

Cho, W. K., Stern, S. and Biggers, J. D. Inhibitory effect of dibutyryl cAMP on mouse oocyte maturation *in vitro*. **J. Exp. Zool.** 187:383-386, 1974.

Conti M., Beavo J. Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. **Annu Rev Biochem.** 76:481–511, 2007.

Da Silveira J.C., Veeramachaneni D.N.R., Winger Q.A., Carnevale E.M., Bouma G.J. Cell-Secreted Vesicles in Equine Ovarian Follicular Fluid Contain miRNAs and Proteins: A possible new form of cell communication within the ovarian follicle. **Biology of Reproduction**, 86(3):71, 1-10, 2012.

Dekel, N., T. S. Lawrence, N. B. Gilula, and W. H. Beers. Modulation of cell-to-cell communication in the *cumulus*-oocyte complex and the regulation of oocyte maturation by LH. **Dev. Biol.** 86:356-362, 1981.

Downs S.M., Humpherson P.G., Martin K.L., Leese H.J. Glucose utilization during gonadotropin-induced meiotic maturation in *cumulus* cell-enclosed mouse oocytes. **Mol. Reprod. Dev.** 44(1):121-31, 1996.

Eberhardt B.G., Satrapa R.A., Capinzaiki C.R., Trinca L.A., Barros C.M. Influence of the breed of bull (*Bos Taurus indicus* vs *Bos Taurus taurus*) and the breed of cow (*Bos Taurus indicus*, *Bos Taurus Taurus* and crossbred) on the resistance of bovine embryos to heat. **Animal Reproduction Science.** 114: 54-61, 2009.

Edwards RG. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. **Nature.** 208:349-351, 1965.

Ferreira, E.M., Vireque, A.A., Adona, P.R., Meirelles, F.V., Ferriani, R.A., and Navarro, P.A. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology.** 71:836-48, 2009b.

Fortune J.E., Rivera G.M., Yang M.Y.: Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Animal Reproduction Science.** 82-83:109-126, 2004.

Franciosi F., Coticchio G., Lodde V., Tessaro I., Modina S.C., Fadini R., Canto M.D., Renzini M.M., Albertini D.F., Luciano A.M.: Natriuretic peptide precursor C delays meiotic resumption and sustains gap junction-mediated communication in bovine *cumulus*-enclosed oocytes. **Biology of Reproduction.** 91:61, 2014.

Gilchrist R.B., Ritter L.J., Myllymaa S., Kaivo-Oja N., Dragovic R.A., Hickey T.E., Ritvos O., Mottershead D.G. Molecular basis of oocyte-paracrine signalling that promotes granulosa cell proliferation. **J. Cell Sci.** 119: 3811-3821, 2006.

Ginther O.J., Bergfelt D.R., Beg M.A., Kot K.: Follicle selection in cattle: role of luteinizing hormone. **Biology of Reproduction**. 64:197-205, 2001.

Gonçalves P., Emanuelli I., Costa L., Machado M., Oliveira J., Neves J., Farias A. Mural granulosa cells are responsible for the inhibitory effect of bovine follicular fluid on oocyte nuclear maturation. Abstract in: 34th Annual Meeting, Society for the Study of Reproduction, 2001.

Gordon I. Laboratory Production of Cattle Embryo. CAB International, University Press, Cambridge, 640p, 1994.

Hafez E.S.E., Hafez, B.: Ciclos Reprodutivos. **Reprodução Animal**. 4:55-67, 7 Ed. 2004.

Hiradate Y., Hoshino Y., Tanemura K., Sato E. C-type natriuretic peptide inhibits porcine oocyte meiotic resumption. **Zygote**. 22:372–377, 2014.

Hussein T.S., Sutton-McDowall M.L., Gilchris R.B., and Thompson J.G. Temporal effects of exogenous oocyte-secreted factors on bovine oocyte developmental competence during IVM. **Reprod. Fertil. Dev.** 23:576-84, Australia, 2011.

Hussein T.S., Thompson J.G., and Gilchrist R.B. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. **Dev. Biol.** 296(2):514-21, 2006.

Khurana N.K., and Niemann H. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived *in vitro* or *in vivo*. **Biol. Reprod.** 62(4):847-56, 2000.

Koller K.J., Lowe D.G., Bennett G.L., Minamino N., Kangawa K., Matsuo H., Goeddel D.V. Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP). **Science**. 252:120-123, 1991.

Larsen W.J., Wert S.E., Brunner G.D. Differential modulation of rat follicle cell gap junction populations at ovulation. **Dev. Biol.** 122(1):61-71, 1987.

Lee K.B., Zhang M., Sugiura K., Wigglesworth K., Uliasz T., Jaffe L.A., Eppig J.J. Hormonal coordination of natriuretic peptide type C and natriuretic peptide receptor 3 expression in mouse granulosa cells. **Biology of Reproduction**. 88(2):42, 2014.

Machado M.F., Portela V.M., Price C.A., Costa I.B., Ripamonte P., Amorim R.L. Regulation and action of fibroblast growth factor 17 in bovine follicles. **J Endocrinol**. 202:347-53, 2009.

Mayes M.A., Sirard M.A. Effect of type 3 and type 4 phosphodiesterase inhibitors on the maintenance of bovine oocytes in meiotic arrest. **Biology of Reproduction**. 66:180-184, 2002.

Mamo S., Carter F., Lonergan P., Leal C.L., Al Naib A., McGettigan P., Mehta J.P., Evans A.C., Fair T. Sequential analysis of global gene expression profiles in immature and *in vitro* matured bovine oocytes: potential molecular markers of oocyte maturation. **BMC Genomics**. 15:12-16, 2011.

Masciarelli, S., Horner, K., Liu, C., Park, S. H., Hinckley, M., Hockman, S., Nedachi, T., Jin, C., Conti, M. and Manganiello, V. Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A-deficient mice as a model of female infertility. **J. Clin. Invest.** 114:196-205, 2014.

McLaren, A. Germ and somatic cell lineages in the developing gonad. **Mol Cell Endocrinol.** 163:3-9, 2000.

Mehlmann LM. Stops and starts in mammalian oocytes: Recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. **Reproduction.** 130:791-799, 2004.

Norris R.P., Ratzan W.J., Freudzon M., Mehlmann L.M., Krall J., Movsesian M.A., Wang H., Ke H., Nikolaev V.O., Jaffe L.A. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. **Development.** 136(11):1869-78, 2009.

Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res.** 29:e45, 2001.

Pincus G, Enzmann EV. The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. I. The activation of ovarian eggs. **J. Exp. Med.** 62:665-677, 1935.

Ramakers C., Ruijter J.M., Deprez R.H., Moorman A.F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neurosci Lett.** 339:62-6, 2003.

Richards J.S. Maturation of ovarian follicles: Actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. **Physiol Rev.** 60:51-89, 1980.

Sasseville M., Albuz F.K., Cote N., Guillemette C., Gilchrist R.B., Richard F.J. Characterization of novel phosphodiesterases in the bovine ovarian follicle. **Biology of Reproduction**. 81:415-425, 2009.

Sirard M.A., First N.L. *In vitro* inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. **Biology of Reproduction**. 39:229-234, 1988.

Somfai T., Inaba Y., Watanabe S., Geshi M., Nagai T. Follicular fluid supplementation during *in vitro* maturation promotes sperm penetration in bovine oocytes by enhancing *cumulus* expansion and increasing mitochondrial activity in oocytes. **Reprod. Fertil. Dev.** 24:743-752, 2012.

Su Y.Q., Wu X., O'Brien M.J., Pendola F.L., Denegre J.N., Matzuk M.M., and Eppig J.J. Synergistic roles of BMP15 and GDF9 in the development and function of the oocyte-*cumulus* cell complex in mice: genetic evidence for an oocyte-granulosa cell regulatory loop. **Dev. Biol.** 276:64-73, United States, 2004.

Sudiman J., Sutton-McDowall M.L., Ritter L.J., White M.A., Mottershead D.G., Thompson J.G., Gilchrist R.B. Bone morphogenetic protein 15 in the pro-mature complex form enhances bovine oocyte developmental competence. **PloS One**. 9(7):e103563, 2014.

Suga S., Nakao K., Hosoda K., Mukoyama M., Ogawa Y., Shirakami G., Arai H., Saito Y., Kambayashi Y., Inouye K., Imura H. Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide. **Endocrinology**. 130:229-239, 1992.

Sun Q.Y., Miao Y.L., Schatten H. Towards a new understanding on the regulation of mammalian oocyte meiosis resumption. **Cell Cycle**. 8(17):2741-7, 2009.

Sutton-McDowall M.L., Mottershead D.G., Gardner D.K., Gilchrist R.B., and Thompson J.G. Metabolic differences in bovine *cumulus*-oocyte complexes matured *in vitro* in the presence or absence of follicle-stimulating hormone and bone morphogenetic protein 15. **Biology of Reproduction**. 87:87, United States, 2012.

Thomas R.E., Armstrong D.T., Gilchrist R.B. Bovine *cumulus* cell-oocyte gap junctional communication during *in vitro* maturation in response to manipulation of cell-specific cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels. **Biology of Reproduction**. 70:548- 556, 2004a.

Thomas, R.E., Thompson, J.G., Armstrong, D.T., and Gilchrist, R.B. Effect of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors during *in vitro* maturation of bovine oocytes on meiotic and developmental capacity. **Biology of Reproduction**. 71:1142-9, 2004b.

Tsafriri A., Chun S-Y., Zhang R., Hsueh A.J.W., Conti M. Oocyte maturation involves compartmentalization and opposing changes of cAMP levels in follicular somatic and germ cells: Studies using selective phosphodiesterase inhibitors. **Dev. Biol.** 178:393-402, 1996.

Tsafriri A., Chun S.Y., Zhang R., Hsueh A.J. & Conti M. Oocyte maturation involves compartmentalization and opposing changes of cAMP levels in follicular somatic and germ cells: studies using selective phosphodiesterase inhibitors. **Dev Biol.** 178:393–402, 1996.

van den Hurk R. Zhao J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**. 63(6):1717- 51, 2005.

Vivarelli E., Conti M., DeFelici M., Siracusa G. Meiotic resumption and intracellular cAMP levels in mouse oocytes treated with compounds which act on cAMP metabolism. **Cel Diff**. 12: 271-276, 1983.

Wu B., Ignatz G., Currie W.B., Yang X. Dynamics of maturation-promoting factor and its constituent proteins during *in vitro* maturation of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**. 56(1):253-9, 1997.

Wu Y.T., Wang T.T., Chen X.J., Zhu X.M., Dong M.Y., Sheng J.Z., Xu C.M., Huang H.F. Bone morphogenetic protein-15 in follicle fluid combined with age may differentiate between successful and unsuccessful poor ovarian responders. **Reprod. Biol. Endocrinol**. 26:10-116, 2012.

Zhang M., Su Y.K., Sugiura K., Xia G., Eppig J.J. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. **Science**. 330(6002):366-369, 2010.

Zhang M., Su Y.Q., Sugiura K., Wigglesworth K., Xia G., Eppig J.J. Estradiol promotes and maintains *cumulus* cell expression of natriuretic peptide receptor 2 (NPR2) and meiotic arrest in mouse oocytes *in vitro*. **Endocrinology**. 152(11):4377-85, 2011.