

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação Medicina Molecular

JÚLIA ALVES DIAS

**Peptídeo natriurético tipo C (CNP): relação com
o crescimento folicular e a maturação oocitária
em humanos.**

Belo Horizonte

2016

JÚLIA ALVES DIAS

Peptídeo natriurético tipo C (CNP): relação com o crescimento folicular e a maturação oocitária em humanos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof Dr. Fernando Marcos dos Reis.

Co-Orientadora: Prof Dra. Cynthia Dela Cruz

Belo Horizonte

2016

Ao meu querido pai, que me fez chegar até aqui, seu carinho estará eternamente no meu coração.

“Onde você quer chegar?
Ir alto.
Sonhe alto,
Queira o melhor do melhor,
Queira coisas boas para vida.
Pensamentos assim trazem para nós aquilo que
desejamos.”

Paulo Roberto Gaefke

Agradecimentos

Ao meu orientador professor Fernando Marcos dos Reis, por acreditar em mim e por toda dedicação a este projeto. Minha eterna gratidão por essa oportunidade. É realmente uma honra ter sido sua aluna.

À minha co-orientadora Cynthia Dela Cruz, grande professora, pela paciência e carinho infindáveis.

Ao meu querido Rubens, meu companheiro de vida, por ser minha fortaleza, sem seu amor não conseguiria seguir em frente.

À minha linda Alice, por dar sentido a minha vida, meus dias são mais felizes por você.

À minha mãe Vera, minha grande incentivadora, companheira e exemplo de vida. Obrigada por sempre estar do meu lado.

Às minhas irmãs Isabela e Mariana, presentes que ganhei assim que nasci, me ensinaram o significado de amizade verdadeira.

Aos amigos do Laboratório de Reprodução Humana Aroldo Fernando Camargos, pela deliciosa convivência e ajuda imensurável. Em especial **Maria Thereza**, doçura em forma de gente, e **Maíra Casalechi**, pela grande ajuda e risadas.

Aos meus mestres, Dra Claudia Navarro, minha madrinha de coração; **Dr Francisco de Assis**, pessoa mais generosa que já conheci.; **Dra Ines Katerina**, amiga, médica, psicóloga e conselheira, nunca irei conseguir retribuir tanto carinho.

À Profa. Adelina Martha dos Reis, por sua contribuição decisiva para o planejamento deste estudo.

À Dra Flavia Ribeiro, pelo inestimável “empurrãozinho”, sem ele nada disso seria possível.

À toda minha família e amigos, que tanto me apoiam e me divertem, por nunca me deixarem sozinha.

Às pacientes, por serem essenciais para realização desse estudo, e por estarem dispostas a ajudar quando buscavam ajuda.

Ao CNPq pelo apoio financeiro por meio do INCT de Hormônios e Saúde da Mulher.

Resumo

Introdução: O peptídeo natriurético tipo C (CNP) é um membro da família de peptídeos natriuréticos que se liga ao receptor de membrana celular NPR2 atuando através do segundo mensageiro cGMP. Estudos prévios em animais sugeriram que o CNP estimula o crescimento do folículo pré-antral e antral, mas inibe a retomada meiótica dos oócitos. Dados preliminares em seres humanos sugeriram que os níveis de CNP ovariano podem diminuir após o aumento pré-ovulatório de LH. Apesar da evidência em animais que o CNP é um regulador parácrino chave da maturação de oócitos, a sua correlação com a indução da ovulação em seres humanos é desconhecida.

Métodos: Após aprovação do comitê de ética e assinatura do consentimento informado por escrito, amostras de fluidos foliculares foram coletadas prospectivamente em 46 mulheres durante a coleta de oócitos para fertilização *in vitro*. Os níveis de CNP no líquido folicular foram medidos por ensaio imunoenzimático. As células da granulosa luteinizadas também foram coletadas para realização da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) para análise da expressão gênica do precursor do CNP, *NPPC*, e seu receptor *NPR2*. **Resultados:** O CNP foi detectável em todas as amostras de fluidos foliculares, em concentrações que variaram de 0,07 a 0,47 ng/ml. As pacientes com endometriose ou infertilidade sem causa aparente (ISCA) apresentaram níveis significativamente menores de CNP intrafoliculares quando comparados aos demais grupos, assim como as que utilizaram o protocolo curto de indução ovariana. Os níveis de CNP correlacionaram-se diretamente com o número de folículos antrais ($r = 0,454$, $p = 0,002$), folículos pré-ovulatórios ($r = 0,361$, $p = 0,016$) e oócitos recuperados ($r = 0,371$, $p = 0,013$) e inversamente com a proporção de oócitos maduros em metáfase II ($r = -0,386$, $p = 0,035$). Não foi encontrada uma correlação entre o mRNA para *NPPC* e a concentração de CNP no líquido folicular. Já na análise da expressão do *NPR2*, foi encontrada uma correlação inversa entre o CNP intrafolicular e o mRNA do *NPR2* nas células da granulosa ($r = -0,385$, $p = 0,020$). **Conclusões:** Os presentes resultados indicam que o CNP intra-folicular pode se tornar um novo biomarcador da resposta ovariana à estimulação das gonadotropinas e à maturação dos oócitos em seres humanos. Além disso, esses achados corroboram a evidência experimental prévia de um papel crítico do CNP na estimulação parácrina do crescimento folicular, ao mesmo tempo que protege os oócitos da retomada meiótica precoce.

Palavras chave: CNP, NPR2, NPPC, líquido folicular, maturação oocitária

Abstract

Introduction: C-type natriuretic peptide (CNP) is a member of the natriuretic peptide family that binds to the cell membrane receptor NPR2 and signals through the second messenger cGMP. Previous studies in mice suggested that CNP stimulates preantral and antral follicle growth but inhibits meiotic resumption of oocytes. Preliminary data in humans have suggested that ovarian CNP levels may decrease after the preovulatory LH surge. Despite the evidence from animals studies that CNP is a key paracrine regulator of oocyte maturation, its correlation with ovulation induction in humans is unknown.

Methods: Following IRB approval and written informed consent, follicular fluid samples were collected prospectively from 46 women during oocyte retrieval for in vitro fertilization. CNP levels were measured by enzyme immunoassay. The granulosa-lutein cells were also collected and the reverse-transcription polymerase chain reaction analysis for CNP precursor gene, *NPPC*, and its receptor, *NPR2*, was performed.

Results: CNP was detectable in all follicular fluid samples, at concentrations ranging from 0.07 to 0.47 ng/ml. Patients with endometriosis or unexplained infertility presented significantly lower levels of intrafollicular CNP when compared to the other groups, as well as those using the short protocol of ovarian induction. CNP levels correlated directly with the number of antral follicles ($r = 0.454$, $p = 0.002$), preovulatory follicles ($r = 0.361$, $p = 0.016$) and the number of oocytes retrieved ($r = 0.371$, $p = 0.013$) and inversely with the proportion of mature oocytes at metaphase II ($r = -0.386$, $p = 0.035$). No correlation was found between *NPPC* mRNA and CNP concentration in follicular fluid. However, in the analysis of the *NPR2* expression, an inverse correlation was found between the intrafollicular CNP and the *NPR2* mRNA in the granulosa cells ($r = -0.385$, $p = 0.020$). **Conclusions:** The present results indicate that intra-follicular CNP could turn in a novel biomarker of ovarian response to gonadotropin stimulation and oocyte maturation in humans. Moreover, these findings corroborate the experimental evidence for a critical role of CNP in the paracrine stimulation of follicle growth, while protecting oocytes from early meiotic resumption.

Key-words: CNP, NPR2, NPPC, follicular fluid, oocyte maturation

Lista de abreviaturas e siglas

ANP: peptídeo natriurético atrial
Areg: amfiregulina
BNP: peptídeo natriurético cerebral
cAMP: monofosfato de adenosina cíclico
CC: células do cumulus
cDNA: DNA complementar
cGMP: monofosfato de guanosina cíclico
CNP: peptídeo natriurético tipo C
DNA: Ácido desoxirribonucleico
DNase: Desoxirribonuclease
DPBS: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EDTA ethylenediaminetetraacetic acid
EGF-like: fatores de crescimento epidermais *like*
EGFR: fatores de crescimento
ELISA: ensaio imunoenzimático
Ereg: epiregulina
FIV: fertilização *in vitro*
FSH: hormônio folículo estimulante
GnRH: hormônio liberador de gonadotrofina
H2O DEPC: água *diethylpyrocarbonate*
HC: hospital das clínicas
hCG: gonadotrofina coriônica humana
HCl: ácido clorídrico
ICSI: injeção intracitoplasmática de espermatozoides
IMC: índice de massa corporal
ISCA: infertilidade sem causa aparente
LH: hormônio luteinizante
LRH: Laboratório de Reprodução Humana
MII: metáfase II
mRNA: Ácido ribonucleico mensageiro
mRNA: RNA-mensageiro
NPPC: precursor do peptídeo natriurético C

NPRA/NPR1: receptor peptídeo natriurético A

NPRB/NPR2: receptor conjugado peptídeo natriurético B

PCR: Reação em cadeia de polimerase

PDE3: fosfodiesterase de cAMP tipo 3

RNA: ácido ribonucleico

RNase: Ribonuclease

RPM: rotações por minuto

RT-PCR: Reação em cadeia de polimerase em tempo real

RT: transcrição reversa

SA-HRP: Streptaridin Horseradish Piroxidase

SHHO: Síndrome de Hiperestímulo Ovariano

TMB: tetrametilbenzidina

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

USTV: Ultra-som endovaginal

Lista de ilustrações

Figura 1: Regulação hormonal do crescimento do folículo pré antral	17
Figura 2: Peptídeos natriuréticos: estrutura, clivagem e degradação	19
Figura 3: Via de sinalização CNP / NPR2 para reativação meiótica de oócitos induzida por estimulação LH	21
Figura 4: O CNP no crescimento do folículo pré-antral e antral e inibição da maturação do oócito	23
Figura 5: Extração de células da granulosa	28
Figura 6: Placa de ELISA	29
Figura 7: Distribuição das concentrações de CNP nas amostras de líquido folicular do estudo (n=64)	35
Figura 8: Concentrações de CNP no líquido folicular de acordo com características clínicas das pacientes: variáveis contínuas. Houve correlação significativa do CNP com a contagem de folículos antrais prévia à estimulação ovariana (painel C, $r = 0,454$, $p = 0,002$)	36
Figura 9: Concentrações de CNP no líquido folicular de acordo com características clínicas das pacientes: variáveis categóricas. Os dados são expressos como medianas e intervalo interquartil. * $p < 0,05$ (ANOVA de Kruskal-Wallis e teste de Dunn)	37
Figura 10: A) Curvas de <i>Melting</i> com picos únicos, comprovando a especificidade dos fragmentos amplificados de mRNA do NPPC; B) Ausência de correlação entre os níveis de CNP no pool de líquido folicular e a expressão do <i>NPPC</i> no pool de células da granulosa	38

Figura 11: Correlação entre os níveis de CNP no líquido folicular e resposta ovariana à estimulação controlada. Há correlação direta do CNP com o número de folículos pré-ovulatórios (>16 mm) (**A**: $r = 0,361$, $p = 0,16$) e com o total de oócitos captados (**B**: $r = 0,374$, $p = 0,12$), e correlação inversa do CNP com a porcentagem de oócitos maduros (metáfase II) (**C**: $r = -0,363$, $p = 0,049$) 39

Figura 12: Concentrações de CNP no líquido folicular de acordo com a ocorrência de gravidez 40

Figura 13: Correlação inversa entre os níveis de CNP no pool de líquido folicular e a expressão do *NPR2* no pool de células da granulosa. ($r = -0,385$, $p = 0,020$) 40

Lista de tabelas

Tabela 1: Composição do coquetel de inibidores da protease	27
Tabela 2: Oligonucleotídeos primers para a reação de PCR em tempo real dos genes alvo do S26, CNP e NPR2	32
Tabela 3: Características da população estudada e parâmetros da FIV	34
Tabela 4: Regressão logística multivariada (método <i>stepwise backward</i>) para definir variáveis independentemente associadas aos níveis intrafoliculares de CNP. A variável dependente dicotômica foi a concentração de CNP maior que a mediana	38

Sumário

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Desenvolvimento folicular ovariano	15
1.2. Peptídeo natriurético tipo C (CNP)	18
1.3. CNP e interrupção da meiose oocitária	19
1.4. CNP e crescimento folicular	22
1.5. Justificativa do estudo e hipótese a testar	24
2. OBJETIVOS	25
2.1. Objetivo geral	25
2.2. Objetivos específicos	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1. Tratamento de reprodução assistida	26
3.2. Preparo da amostra de líquido folicular	27
3.3. Extração das células da granulosa	27
3.4. ELISA (ensaio imunoenzimático)	28
3.5. Reação em cadeia de polimerase (PCR)	30
3.5.1. Extração de RNA total e tratamento com DNase	30
3.5.2. Síntese de cDNA por Transcrição Reversa	31
3.5.3. Oligonucleotídeos específicos	31
3.5.4. Reação em cadeia de polimerase em tempo real	32
3.6. Análise estatística	33
4. RESULTADOS	34
4.1. Características da população estudada	34
4.2. CNP intrafolicular: possíveis origens e fatores que influenciam suas concentrações	35
4.3. CNP intrafolicular: possíveis efeitos e sua relação com desfechos reprodutivos	39
5. DISCUSSÃO	41

6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
8. ANEXO I: ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO	50
9. ANEXO II: FOLHA DE APROVAÇÃO	52

1. Introdução

O perfil hormonal da maturação oocitária vem sendo amplamente estudado nos últimos anos. Entretanto, uma maior elucidação dos mecanismos que interferem no desenvolvimento folicular ainda é necessário visando o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas na abordagem de pacientes portadoras de distúrbios ovulatórios como insuficiência ovariana primária, síndrome de ovários policísticos ou mulheres em idade reprodutiva avançada¹.

1.1 Desenvolvimento folicular ovariano humano

O ovário é um órgão responsável pela diferenciação e maturação oocitária. Além disso, também é órgão produtor de hormônios necessários para o desenvolvimento sexual secundário e a manutenção da gravidez².

A unidade funcional do ovário é o folículo. Cada folículo ovariano possui um ócito envolvido por células da granulosa e outras camadas de células da teca². Existe uma intensa comunicação entre o ócito e as células foliculares circundantes. Em especial, as células referidas como células do cumulus (CC) originam-se como uma subpopulação de células da granulosa assim que o antro é formado no folículo em desenvolvimento. As interações ócito - CC são implementadas através de diferentes modalidades de sinalização e são reconhecidas como um elemento fundamental da maturação do ócito. De fato, as CC suportam uma ampla variedade de funções no ócito em maturação, incluindo o metabolismo, parada e retomada meiótica, e rearranjos do citoesqueleto³.

O desenvolvimento folicular humano se inicia na vida fetal. As células germinativas primordiais chegam na crista gonadal da endoderme do saco vitelino por volta da sétima semana de gestação para se tornarem oogônias, que proliferam por mitose antes de se diferenciar em oócitos primários. Algumas oogônias começam a transformação em oócitos primários e entram nos primeiros estádios da meiose em torno de 11-12 semanas de gestação. O número total de células germinativas atinge um pico em torno de 20 semanas e, após esse período, a taxa de divisão das oogônias declina. Os folículos primordiais são formados na metade da gestação. Após iniciado o crescimento, os folículos primordiais se desenvolvem em primários, secundários e antrais. A maioria dos folículos antrais degeneram por atresia. Apenas alguns, sob estímulo de gonadotrofinas, atingem estágio pré-ovulatório. O número total de folículos

é determinado logo no início da vida intrauterina e a depleção do pool ovariano leva a falência reprodutiva. De um pico de 6 a 7 milhões em 20 semanas de gestação, o número de oócitos cai drasticamente, de modo que ao nascer restam apenas 300.000 a 400.000. No momento da puberdade há uma média de 200.000 folículos no ovário, e esse número continua decrescendo de tal forma que a mulher produzirá cerca de apenas 500 óvulos durante toda a sua vida².

A regulação do desenvolvimento folicular ovariano em nível hipotalâmico é realizada pelo hormônio liberador de gonadotrofina (GnRh) que estimula a hipófise anterior a produzir os hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH). As gonadotropinas estimulam o ovário a produzir hormônios esteróides, estrogênio ou progesterona⁴. Entretanto, vários fatores parácrinos intraovarianos tais como a ativina, folistatina e fatores de crescimento, também são importantes para otimização do crescimento e diferenciação folicular^{5;6}.

Sumariamente, a foliculogênese funciona da seguinte forma: na presença de FSH, os folículos secundários começam a crescer e se transformam em folículos antrais. Sem FSH, os folículos tornam-se atrésicos. No estágio do folículo pré-antral, o folículo é um sistema de duas células (da granulosa e da teca) e duas gonadotrofinas (FSH e LH). A teca, formada no estágio de folículo pré-antral de duas camadas, com exposição a baixos níveis de LH, produz andrógenos que são convertidos em estrogênio através de um membro da superfamília do citocromo P450, CYP19 (aromatase), nas células da granulosa. O FSH induz a proliferação celular, secreção de inibina e ativação da aromatase e pelas células da granulosa. Este último efeito conduz a um microambiente de estrogênio muito elevado. Com um aumento no estrogênio, o folículo antral se desenvolve ainda mais. Esta interação entre as células da granulosa e da teca resulta em altos níveis de estrogênio também dentro do folículo. A elevação gradual do estrogênio e da inibina regula negativamente a liberação de FSH pela hipófise anterior e inicia o processo de seleção de um único folículo dominante. Os folículos que não estão na fase apropriada e não são capazes de manter um microambiente de estrogênio alto sem estimulação do FSH degeneram e se tornam atrésicos. Os níveis muito elevados de estrogênio sinalizam para a hipófise anterior para induzir o aumento do LH, o que acaba por conduzir à ovulação. Durante a ovulação, o oócito é expelido do folículo com o cumulus de células granulosa que o rodeia.⁴ (Figura 1).

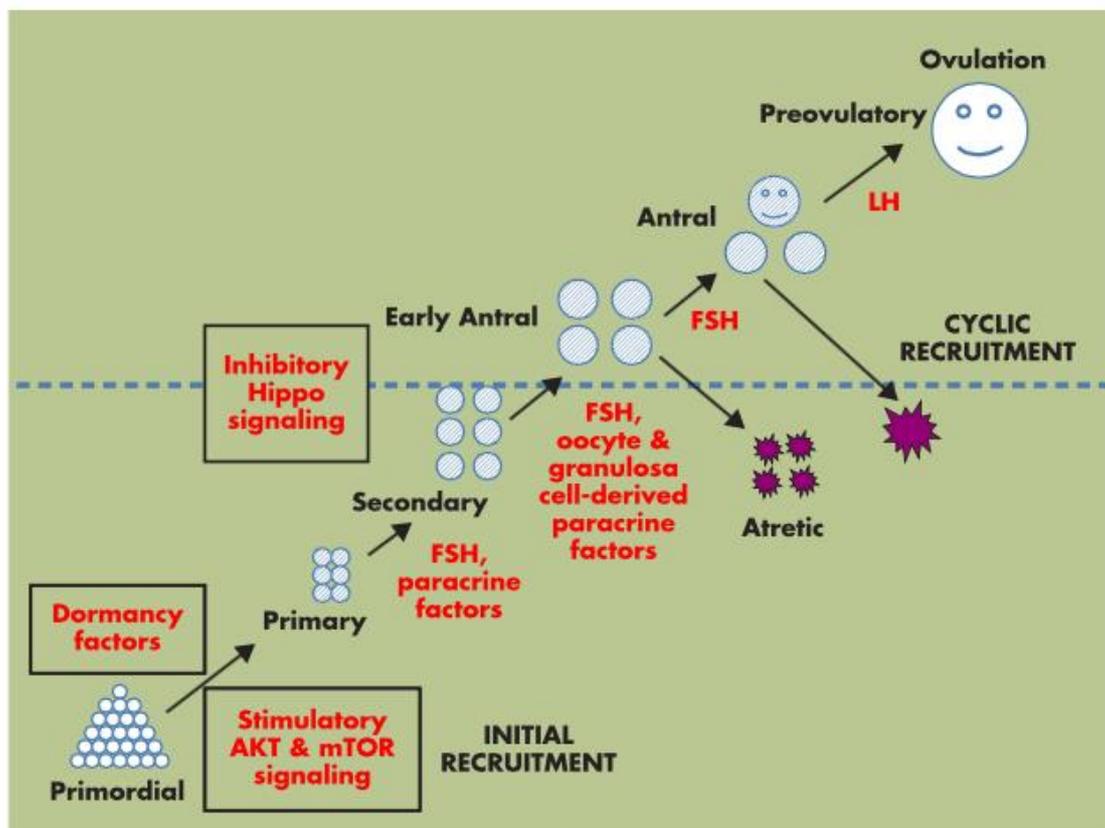


Figura 1: Regulação hormonal do crescimento do folículo pré antral (Fonte: HSUEH, A. J. et al. Intraovarian control of early folliculogenesis. *Endocr Rev*, v. 36, n. 1, p. 1-24, Feb 2015)

A história natural do oócito começa com o início da meiose e formação do folículo primordial ainda na vida fetal. A entrada na meiose é imediatamente seguida pela interrupção da divisão na fase de diplóteno da prófase I e estabelecimento de uma condição de quiescência metabólica relativa. Em tal estado suspenso, o oócito pode permanecer por mais de 40 anos. No entanto, o crescimento do oócito já está finalizado no estágio antral precoce, isto é, significativamente antes do desenvolvimento do folículo ser completado. De fato, embora durante vários dias o folículo antral sofra uma expansão adicional na preparação para a ovulação, não se observa qualquer aumento no tamanho do oócito. Finalmente, estimulado pelo pico de LH no meio do ciclo, o oócito de diplóteno, completamente desenvolvido, retoma a meiose e prossegue para o estágio da metáfase II (MII) atingindo assim a maturidade meiótica. Portanto, o crescimento e a maturação podem ser discernidos como fases temporais e funcionalmente distintas da oogênese³.

Após a ovulação, as células foliculares remanescentes no ovário tornam-se luteinizadas como parte do corpo lúteo, que secreta progesterona. Durante a fase lútea, as células da granulosa dentro do corpo lúteo também produzem a inibina A, que atua como um hormônio endócrino para suprimir o FSH hipofisário, inibindo o crescimento de outros folículos ovarianos. Sem fertilização ou implantação do embrião, o corpo lúteo degenera, possivelmente em resposta aos hemodímeros (β A: β A ou β B: β B) ou heterodímeros (β A: β B) de ativina que compartilham as subunidades β com inibina A e inibina B (α : β B). Quando os níveis de inibina, estradiol e progesterona caem com a regressão do corpo lúteo, o FSH é suprimido. Na transição lútea-folicular, os níveis de FSH aumentam e o próximo ciclo menstrual começa⁴.

1.2 Peptídeo natriurético tipo C (CNP)

Além do FSH, o peptídeo natriurético tipo C (CNP) foi recentemente descoberto como um fator folículo estimulante¹.

Os peptídeos natriuréticos compreendem uma família de três estruturas moleculares: o peptídeo natriurético atrial (ANP), o peptídeo natriurético cerebral (BNP) e o CNP⁷. O gene do precursor do CNP é expresso em diversos tipos de células, inclusive nas células da granulosa. O precursor do peptídeo natriurético C (NPPC) é clivado e dá origem ao CNP biologicamente ativo, um peptídeo de 22 aminoácidos^{1; 8; 9}. O CNP ativa seu receptor de peptídeo natriurético B (NPRB), também conhecido como NPR2 ou guanilil ciclase B, enquanto ANP e BNP estimulam o receptor de peptídeo natriurético A (NPRA), também conhecido como NPR1 ou guanilil ciclase A¹⁰. Os dois receptores são enzimas guanilil ciclase ancoradas à membrana plasmática, que sinalizam via produção do segundo mensageiro monofosfato de guanosina cíclico (cGMP) e submetem-se a dessensibilização homóloga e heteróloga, refletida pela desfosforilação de locais específicos no domínio de homologia da quinase¹¹. (Figura 2)

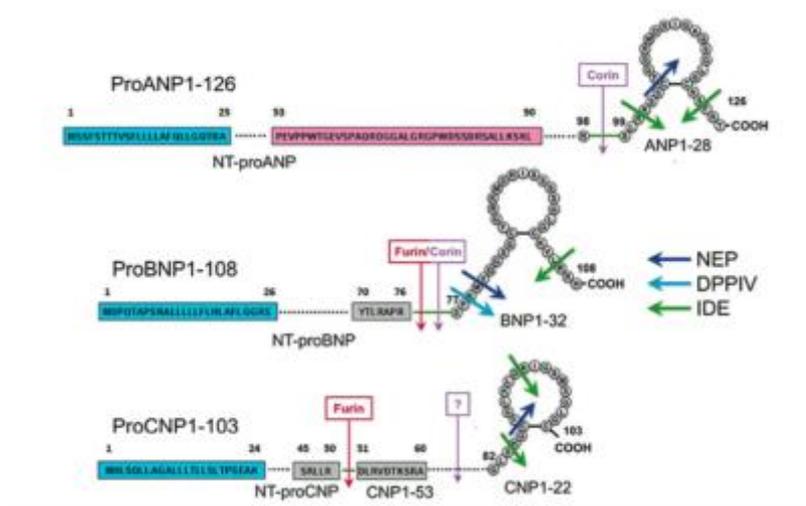


Figura 2: Peptídeos natriuréticos: estrutura, clivagem e degradação. (Fonte: VOLPE *et al.*, Natriuretic peptides in cardiovascular diseases: current use and perspectives. *Eur Heart J*, v. 35, n. 7, p. 419-25, Feb 2014)

ANP e BNP agem como hormônios endócrinos para regular a pressão sanguínea e inibir a hipertrofia cardíaca. Já o CNP atua de forma autócrina/parácrina na indução do crescimento ósseo e melhora do vasorelaxamento¹.

Estudos reportaram expressão ovariana do *NPPC* e *NPRB* e sua regulação pelas gonadotrofinas^{12; 13}. E também mostraram que transcrição para os dois é expressa nas células da granulosa e cumulus de folículos antrais e pré ovulatórios^{1; 13; 14; 15; 16}.

1.3 CNP e interrupção da meiose oocitária

Ao contrário das células germinativas masculinas que entram na meiose somente na puberdade, o desenvolvimento do oócito é caracterizado por duas fases consecutivas de progressão e parada meiótica que abrangem a vida embrionária, fetal, puberal e adulta. Na maioria das espécies de mamíferos, a primeira divisão meiótica é iniciada durante a vida pré-natal ou logo após o nascimento¹⁷. Como citado anteriormente, os oócitos em estágio de folículos antrais têm sua meiose interrompida em diplóteno da prófase I, e são mantidos como vesícula germinal por meses ou anos, até que ocorra o pico do LH antes da ovulação¹⁴. Sabe-se que a parada meiótica dos oócitos é mantida por efeitos inibitórios da retomada da meiose por células somáticas circundantes, uma vez que a competência meiótica é adquirida numa fase antral

precoce¹⁵. Entretanto, um dos principais problemas não resolvidos na biologia reprodutiva é a compreensão dos sinais envolvidos no controle dessa parada e maturação dos oócitos¹⁸.

Desde 1987 já foi demonstrado que um nível elevado de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) nos oócitos é essencial para a manutenção da parada meiótica oocitária^{3; 15; 17; 18; 19}. Algumas evidências comprovam essa afirmação: a onda pré ovulatória do LH é precedida por uma redução dos níveis de cAMP, a retomada meiótica *in vitro* também coincide com essa redução e análogos de cAMP ou inibidores da fosfodiesterase de cAMP tipo 3 (PDE3), específica do oócito, enzima pela qual o cAMP é hidrolisado, evitam a retomada espontânea da meiose *in vitro*³. Acredita-se que a concentração intracelular de cAMP seja regulada por um equilíbrio entre a sua síntese e degradação, que dependem da adenilil ciclase e da fosfodiesterase, respectivamente¹⁵. E foi constatado que a via do cAMP é estimulada pelo FSH⁵.

Estudos posteriores mostraram que outro nucleotídeo cíclico, o cGMP, também inibe a retomada meiótica em complexos cumulus-oocitários isolados de hamsters e em oócitos desnudados de ratos^{20; 21}. Além disso, estudo recente mostrou que, pela presença de junções próximas entre cumulus e oócitos, o cGMP das células somáticas circundantes difunde-se pelos oócitos e eleva a concentração de cAMP através da inibição da atividade de PDE3, sugerindo que níveis mais elevados de cGMP em células somáticas contribuem para a parada meiótica de oócitos em decorrência de aumento de cAMP nos oócitos²². Inversamente, níveis mais baixos de cGMP em células somáticas diminuem os níveis de cAMP de oócitos durante a retomada meiótica induzida pelo LH.

No momento da ovulação o LH provoca alterações nas células da granulosa produzindo fatores de crescimento similares ao fator de crescimento epidermal (EGF-like), como a amfiregulina (Areg), a epiregulina (Ereg) e a betacelulina, com ativação do receptor de EGF (EGFR)^{8; 23}. A ativação de quinases por esses fatores provoca o fechamento das junções *gap* e diminuição da disseminação do cGMP. Portanto, o LH agiria tanto através da ligação a um receptor acoplado a proteína G cuja função é gerar cAMP quanto pela diminuição da permeabilidade da junção *gap* com redução da difusão do cGMP entre os compartimentos somático/oócito. Além disso, o LH também provoca uma diminuição do cGMP no folículo; entretanto, o mecanismo para exercer essa função é apenas parcialmente conhecido. A diminuição da atividade da guanilil ciclase, o aumento na degradação do cGMP e a diminuição do CNP são hipóteses

plausíveis⁸. Estes dados indicam fortemente a importância do cGMP no mecanismo dependente de células somáticas que regula a interrupção e reativação meiótica dos oócitos^{3; 15}.

Em contrapartida, o receptor para CNP, NPR2, tem um domínio guanilil ciclase e medeia sinais produzindo cGMP intracelular¹⁵. Além dos efeitos do CNP sobre o crescimento ósseo, foi relatado recentemente que o NPPC é expresso em células da granulosa de ratos e inibe a retomada meiótica espontânea de oócitos em camundongos²⁴. Semelhante aos estudos em camundongos, nos modelos de porcos²⁵, vacas²⁶ e cabras²⁷, também verificou-se que os genes *NPPC* e *NPR2* eram preferencialmente expressos nas células da granulosa e cumulus, respectivamente. Em tais animais, o NPPC também inibiu a retomada meiótica espontânea, sugerindo que o sistema NPPC / NPR2 é compartilhado entre várias espécies de mamíferos³ (Figura 3).

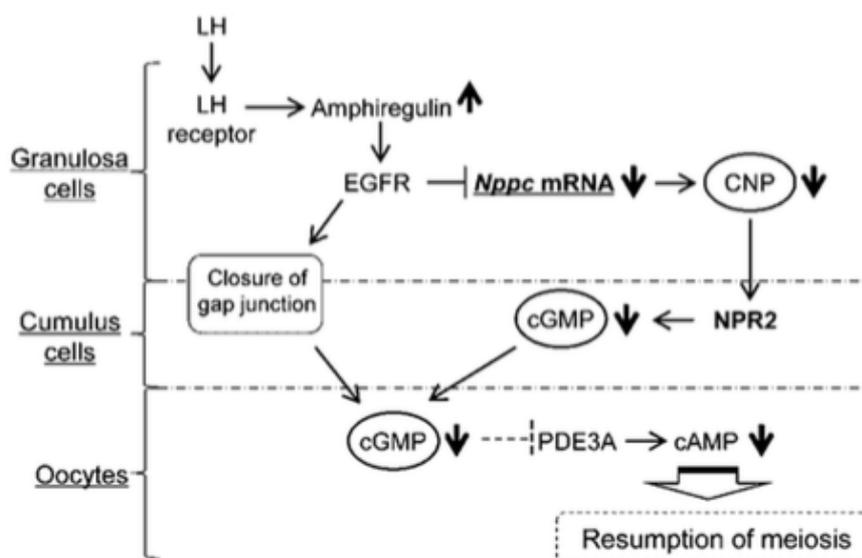


Figura 3: Via de sinalização CNP / NPR2 para reativação meiótica de oócitos induzida por estimulação LH (Fonte: TSUJI, T. et al. CNP/NPR2 signaling maintains oocyte meiotic arrest in early antral follicles and is suppressed by EGFR-mediated signaling in preovulatory follicles. *Mol Reprod Dev*, v. 79, n. 11, p. 795-802, Nov 2012)

Portanto, as ações do FSH são predominantemente mediadas pelo cAMP, enquanto as ações do CNP são exclusivamente mediadas pelo cGMP⁵.

Camundongos mutantes com CNP ou NPR2 defeituosos mostraram reativação meiótica precoce em folículos antrais tardios^{16; 24}. Estes resultados indicam que o CNP funciona como um fator inibitório derivado de células somáticas que mantém a parada meiótica de oócitos em folículos antrais tardios através da produção de cGMP, quando NPR2 é ativado por CNP. Outro estudo mostrou que a sinalização CNP/NPR2 funciona como um fator derivado de células somáticas que inibe a retomada meiótica de oócitos não apenas nos folículos antrais tardios, como relatado anteriormente, mas também nos folículos antrais precoces, e que é essa via é essencial na prevenção da retomada precoce da meiose quando os oócitos adquirem competência meiótica¹⁵.

Um estudo que utilizou o tratamento de complexos cumulus-oocitários com CNP mostrou a estimulação da produção de cGMP nas células do cumulus e inibição da retomada da meiose dos oócitos²⁴. Assim, foi possível concluir que o CNP de origem da granulosa e cumulus estimulam a produção do cGMP agindo em seu receptor nas células do cumulus¹.

Antes do pico do LH, altos níveis de CNP intraovariano previnem a maturação prematura do oócito, enquanto o pico do LH diminui os níveis de CNP, permitindo a divisão da vesícula germinal dos oócitos e a finalização da divisão meiótica²⁸.

Apesar de nanismo e morte precoce terem sido descritos em ratos com NPPC não funcionante e, como consequência, deficientes de CNP, não só desordens esqueléticas foram encontradas, mas também foram observados folículos ovarianos estacionados no segundo estágio de desenvolvimento^{29; 30}. Em ratos com NPPC ou NPRB mutantes hipofuncionantes, a interrupção da meiose não foi mantida na maioria dos folículos pré ovulatórios, ocorrendo precocemente^{16; 24}.

1.4 CNP e crescimento folicular

Mc Gee *et al.* mostraram a capacidade de análogos do cGMP em promover o desenvolvimento de folículos pré antrais de ratos em cultivo³¹. Outro estudo mais recente testou a habilidade do CNP em promover o crescimento folicular, e a análise do RT-PCR indicou um aumento da transcrição do *NPPC* e *NPRB* no início da foliculogênese de camundongos, associado com aumento de CNP ovariano. Em cultura de células somáticas obtidas de ovários infantis de camundongos e células da granulosa de animais pré-púberes, o tratamento com CNP estimulou a produção de cGMP, mas

não a de cAMP. Além disso, o tratamento com CNP em cultura de folículos pré-antrais estimulou o crescimento folicular, enquanto o tratamento de culturas de amostras de ovários de camundongos infantis com CNP aumentou o ganho de peso ovariano, o que é associado com o desenvolvimento de folículos primários e secundários precoces para o estágio de folículo secundário tardio, semelhante ao efeito do FSH. Importante observar que o tratamento com FSH provocou o aumento dos níveis de NPRB, mas não de NPRB em amostras ovarianas, sugerindo que o CNP corrobora com o FSH no desenvolvimento folicular⁵. (Figura 4)

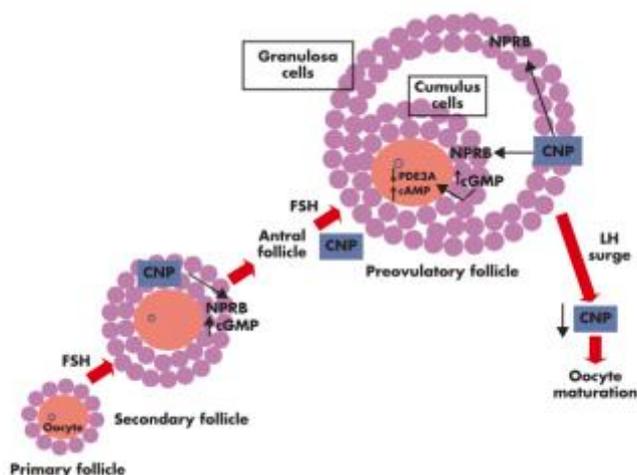


Figura 4: O CNP é um fator intraovariano importante para o crescimento do folículo pré-antral e antral, bem como para a inibição da maturação do oócito. (Fonte: HSUEH, A. J. et al. Intraovarian control of early folliculogenesis. *Endocr Rev*, v. 36, n. 1, p. 1-24, Feb 2015)

O estudo *in vivo* também confirmou a habilidade do CNP em promover o crescimento de folículos pré-antrais. Injeções diárias de CNP em ratas pré-púberes provocaram crescimento ovariano, permitindo sucesso na estimulação ovariana com gonadotrofinas. Mais uma vez reforçando a hipótese de que o CNP age na mesma direção que o FSH, o tratamento com CNP em camundongos pré-púberes, sem FSH exógeno, mostrou o crescimento de folículo antral para o estágio pré-ovulatório⁵.

Quanto maiores os defeitos no desenvolvimento folicular observados em camundongos com NPRB não funcional³⁰ quando comparados àqueles com receptor de FSH não funcional³², maior a definição do papel essencial do CNP-NPRB no crescimento de folículos pré-antrais. Essa observação poderia sugerir que o sinal CNP-

NPRB seria suficiente para o crescimento folicular subótimo mesmo na ausência da sinalização pelo receptor de FSH¹.

Os oócitos maduros recuperados após o pré-tratamento com CNP são fertilizáveis e podem desenvolver-se em blastocistos *in vitro*, permitindo a produção de descendentes viáveis. Assim, o CNP secretado por folículos em crescimento é capaz de estimular o crescimento folicular pré-antral e antral. Estes achados levantam a possibilidade de que o CNP possa ser eficaz no tratamento de pacientes inférteis que obtiveram má resposta com FSH. Como a expressão tecidual de NPRB é limitada (áreas cerebrais, adrenais, células endoteliais, pulmão e rim) e o tratamento com CNP feito a curto prazo, é improvável a promoção de alterações cardíacas e renais ou sobre o crescimento esquelético¹. Outra possibilidade seria a utilização do CNP em substituição ao FSH na tentativa de evitar a Síndrome de Hiperestímulo Ovariano (SHHO), dado a menor meia vida do CNP quando comparado ao FSH⁵.

1.5 Justificativa do estudo e hipótese a testar

Apesar de todas as evidências obtidas em camundongos e outras espécies animais, não identificamos nenhum estudo avaliando a relação entre o CNP ovariano e a foliculogênese humana. Considerando a importância de se identificarem novas vias fisiológicas capazes de originar estratégias farmacológicas inovadoras para a estimulação ovariana controlada, torna-se oportuno avaliar pela primeira vez o CNP ovariano no contexto da reprodução humana assistida e verificar se as concentrações desse peptídeo no líquido folicular associam-se aos desfechos reprodutivos.

Nossa hipótese é que os níveis de CNP no líquido folicular obtido após estimulação ovariana relacionam-se diretamente com o número de folículos antrais e inversamente com a proporção de oócitos maduros coletados.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Caracterizar os níveis de CNP no líquido folicular humano após estimulação ovariana controlada para fertilização *in vitro* (FIV) e identificar fatores que influenciam e que são influenciados pelas concentrações intrafoliculares do peptídeo.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a relação entre variáveis clínicas pré-tratamento e os níveis de CNP no líquido folicular.
- Verificar se as células da granulosa murais em suspensão no líquido folicular expressam o mRNA para o precursor do CNP e se esse mRNA relaciona-se quantitativamente com o conteúdo de CNP no líquido folicular.
- Avaliar se existe relação entre os níveis intrafoliculares de CNP e a resposta à indução da ovulação e/ou a ocorrência de gravidez

3. Materiais e métodos

O projeto foi registrado na Plataforma Brasil sob o número 53504516.8.0000.5149 e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (parecer 1.546.123). Todas as pacientes foram orientadas sobre o projeto e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) antes da coleta do material, no dia da coleta ovular.

Foram incluídas todas as pacientes do Laboratório de Reprodução Humana Professor Aroldo Fernando Camargos do Hospital das Clínicas da UFMG em tratamento para infertilidade com indicação de fertilização assistida que concordaram em assinar o TCLE para participar do estudo.

Para ser admitida no programa de fertilização *in vitro*, a paciente deve ter diagnóstico de infertilidade primária ou secundária com indicação de tratamento por FIV ou apresentar algum fator que a impeça de engravidar espontaneamente ou por outros tratamentos de menor complexidade. A paciente deve também apresentar idade inferior a 41 anos no momento de inclusão no programa e índice de massa corporal (IMC) inferior a 30 Kg/m² no momento de início do tratamento.

3.1 Tratamento de reprodução assistida

As pacientes foram submetidas aos protocolos do serviço para indução de ovulação escolhidos por indicação clínica dependendo da causa de infertilidade, idade, níveis de FSH e contagem de folículos antrais de cada uma. Para estimulação ovariana controlada foram utilizadas formulações de gonadotrofinas urinárias ou recombinantes existentes no mercado (Menopur®, Gonal F® e Puregon®), por via subcutânea. O bloqueio ovariano foi realizado com análogos do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRh), antagonistas ou agonistas (Lupron®, Orgalutran®, Cetrotide®), de acordo com protocolo individualizado para cada paciente. Ultrassonografias endovaginais (USTV) seriadas para rastreamento do crescimento folicular foram realizadas a partir do sexto dia de indução, e gonadotrofina coriônica humana (hCG) recombinante (Ovidrel®) foi administrada quando um ou mais folículos apresentavam-se com diâmetro médio maior que 18 mm. A aspiração dos folículos foi feita guiada por ultrassom endovaginal, utilizando-se uma pressão negativa artificial constante de 100 a 200 mmHg, cerca de 34 a 36 horas após a injeção de hCG. O líquido folicular foi coletado em tubos de ensaio estéreis e os oócitos foram imediatamente identificados com o auxílio de uma lupa, em

capela de fluxo laminar para manter o ambiente estéril. A realização de FIV convencional ou injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) seguiu critérios clínicos de cada paciente.

3.2 Preparo da amostra de líquido folicular

Após extração do oócito pela embriologista, a amostra de líquido folicular do primeiro tubo coletado, correspondente aos primeiros folículos puncionados, era imediatamente misturada a um coquetel de inibidores da protease, centrifugada a 4°C por 10 minutos a 3000 rpm e estocada a -80°C.

O coquetel de inibidores da protease era preparado no dia de cada coleta e utilizava a composição especificada na tabela 1. Um volume final de 36 µL era usado para cada 1 ml de amostra. (Tabela 1)

Tabela 1: Composição do coquetel de inibidores da protease

Substância	Volume da solução
Ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), 1mM	12 µL
Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), 1mM	12µL
Pepstatina A, 1mM	12µL

3.3 Extração das células da granulosa

A seguir, todo o líquido folicular que havia sobrado após identificação e extração dos óocitos era encaminhado para o laboratório de pesquisa e centrifugado por 15 minutos a 2000 rpm. O pellet resultante era ressuspensão com 1ml de Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) e a suspensão celular era adicionada a um tubo com 1 ml de Histopaque® 1077 e 1 ml de DPBS. Nova centrifugação a 2000 rpm era realizada por mais 20 minutos. Após esse processo, as células da granulosa ficavam suspensas formando uma nuvem. Essas células eram aspiradas, transferidas para um eppendorff e novamente centrifugadas a 4° C, por 15 minutos, com rotação a 3000 rpm. Após descarte do sobrenadante, as células eram armazenadas em freezer a -80°C (Figura 5).

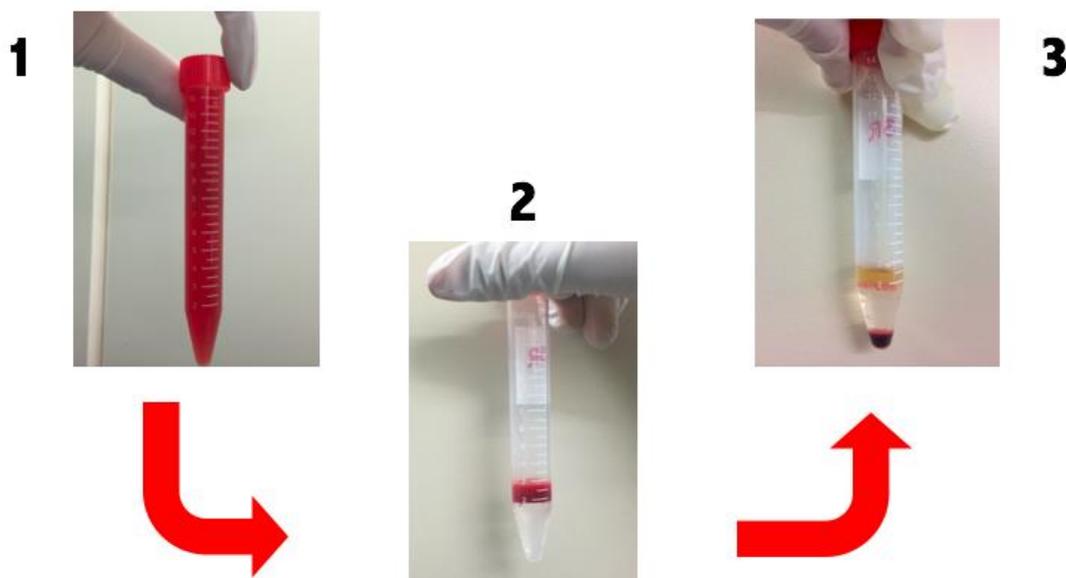


Figura 5: Extração de células da granulosa. **1:** Líquido folicular total após extração dos óocitos **2:** Gradiente histopaque antes da centrifugação **3:** Gradiente histopaque pós centrifugação formando uma nuvem de células da granulosa.

3.4 ELISA (ensaio imunoenzimático)

Os níveis de CNP foram mensurados pela técnica de ELISA, designada para detectar o peptídeo específico baseado no princípio de competitividade imunoenzimática (CNP-22, Phoenix Pharmaceuticals, Inc, Burlingame, CA). A sensibilidade do ensaio é de 0,01 ng/ml e o anticorpo não apresenta reação cruzada com outros peptídeos natriuréticos.

Para preparo dos reagentes, 50 ml do tampão de ensaio concentrado 20X eram diluídos em 950 ml de água destilada. A partir daí o tampão 1X era utilizado para reconstituir todos os reagentes do kit:

- O **anticorpo primário** era reidratado com 1 ml de tampão de ensaio, reservado por cinco a dez minutos, agitado em vórtex, acrescido de mais 4 ml do diluente, reservado novamente por 5 minutos e submetido a um outro vórtex.
- O **peptídeo biotínilado** era reidratado com 1 ml do tampão de ensaio, reservado por cinco a dez minutos e acrescido de mais 4 ml do diluente, incubado por mais cinco minutos, agitado e reservado em temperatura ambiente.

- O **controle positivo** era centrifugado e reidratado com 200 μ l do tampão diluente, incubado por cinco minutos, agitado em vórtex e reservado em temperatura ambiente.
- O reagente Streptavidin Horseradish Peroxidase (SA-HRP) era centrifugado por cinco minutos a 3000 -5000 rpm. A seguir, 12 μ l do SA-HRP eram pipetados em 12 μ l do tampão de ensaio.

Os reagentes eram armazenados em temperatura ambiente por 25 a 45 minutos antes do uso. O peptídeo padrão era centrifugado e diluído com 1 ml de tampão de ensaio. A concentração da solução estoque de 1000ng/ml era mantida por pelo menos dez minutos em temperatura ambiente e centrifugada antes de cada uso.

A distribuição das amostras na placa de ELISA era feita da seguinte forma:

- Poços A1 e A2: vazios (brancos)
- Poços B1 e B2: 50 μ l do diluente tampão, ligação total
- Poços C1 e C2, D1 e D2, E1 e E2, F1 e F2, G1 e G2: 50 μ l dos padrões de 5 a 1
- Poços H1 e H2: 50 μ l do controle positivo
- Nos outros poços: 50 μ l das amostras

Em todos os poços, exceto nos brancos, eram adicionados 25 μ l do anticorpo primário e 25 μ l do peptídeo biotilado (Figura 6).



Figura 6: Placa de ELISA

A seguir, a placa era vedada e incubada por duas horas em temperatura ambiente. Após esse período, o filme era retirado e a placa lavada na lavadora de placas Asys – Atlantis com 350 ml de tampão de ensaio por quatro vezes.

Depois de lavada a placa, 100 µl de SA-HRP eram adicionados em todos os poços. A placa, novamente vedada, era armazenada em temperatura ambiente e incubada.

Após uma hora, o filme era retirado e placa lavada novamente com tampão de ensaio por quatro vezes. Eram adicionados 100 µl do substrato tetrametilbenzidina (TMB) em cada poço, seguido de vedamento com proteção da luz e incubação por mais uma hora.

O filme era então removido e eram adicionados 100 µl de ácido clorídrico (HCl) 2N em cada poço para interromper a reação. A seguir era feita leitura da placa na leitora de ELISA Asys – Expert plus em 450 nm.

3.5 Reação em cadeia de polimerase (PCR)

3.5.1 Extração de RNA total e tratamento com DNase

A expressão do gene *NPPC*, que codifica o precursor do CNP (NPPC) e do gene *NPR2*, que codifica o receptor NPR2, foi avaliada por PCR em tempo real (RT-PCR) após a extração do RNA total e transcrição reversa do mRNA.

Para o processamento, as amostras foram retiradas do freezer -80° C e mantidas em temperatura ambiente até completo descongelamento seguido de homogeneização vigorosa em vórtex. A extração total de RNA foi feita de acordo com o manual de instruções do TRIzol[®] reagente sem modificações: 200 µl de clorofórmio foram adicionados a cada amostra, que foi então suavemente homogeneizada por 15 segundos. Em seguida, as amostras foram incubadas por 3 minutos à temperatura ambiente, sendo então centrifugadas a 2.000 rpm por 15 minutos a 4° C. A fase aquosa formada foi transferida para um novo tubo previamente identificado e o restante foi descartado. 500µl de isopropanol foram adicionados à fase aquosa, seguido de homogeneização vigorosa e incubação por 15 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram novamente submetidas a centrifugação a 2.000 rpm por 10 minutos a 4° C e o sobrenadante formado foi descartado. O pellet formado foi lavado com 1 mL de etanol 75% seguido de centrifugação a 1.500 rpm por 5 minutos a 4° C. O sobrenadante foi descartado e o pellet, formado pelo material de interesse, foi ressuspenso em 20 µl de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC), livre de RNase e DNase (Invitrogen

Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) para biologia molecular.

Para garantir mínima contaminação por ácido desoxirribonucleico (DNA), as amostras de RNA foram submetidas a tratamento com *DNase I Amplification grade* (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Para isso, as amostras foram quantificadas em *NanoDrop* (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, USA) e 1 µg de amostra foi transferido para um novo tubo estéril de 0,5 mL livre de RNase. 2µl de mix, composto por 1µl de enzima *DNase* e 1µl de tampão, e água de alta qualidade em volume suficiente para completar o volume de reação final para 10 µl foram adicionados ao 1µg de amostra. As amostras foram então encubadas por 15 minutos a temperatura ambiente, seguido da adição de 1µl de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e por mais uma incubação a 65° C, e então foram submetidas a requantificação em *NanoDrop*.

3.5.2 Síntese de cDNA (DNA complementar) por Transcrição Reversa

A transcrição reversa (RT) foi executada utilizando o kit de síntese de cDNA High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems) a partir de 800 ng de RNA total das amostras. Foi preparado um mix composto por 2µl de tampão RT 10X, 0,8 µl de 25 X dNTP Mix (100mM), 2µl de 10XRT Random Primers e 1µl de MultiScribe Reverse Transcriptase e água DEPC em volume de 4.2 µl menos o volume da amostra de RNA, perfazendo assim 10 µl de volume total de reação. Esse mix foi adicionado às amostras, que foram então submetidas a incubação por 10 minutos a 25° C, seguido por 120 minutos a 37° C, 5 minutos a 85° C e finalizando com pelo menos 1 minuto a 4° C.

O cDNA sintetizado foi utilizado em seguida na realização de reação em cadeia de polimerase em tempo real.

3.5.3 Oligonucleotídeos específicos

Os *primers* (oligonucleotídeos) iniciadores designados para PCR em tempo real foram estudados e selecionados com base na análise da sequência descrita no *GeneBank*, obtida no Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>). As sequências foram posteriormente analisadas no site da empresa *Integrated DNA Technologies* (IDT) (<http://www.idtdna.com>), que permitiu a elaboração dos primers para as regiões-

alvo de cada gene, de acordo com as nossas especificações para as condições de cada um. Como gene de referência para correção da expressão dos genes-alvo na PCR em tempo real, foi utilizado o gene que codifica a proteína ribossomal S26. As sequências dos oligonucleotídeos sintetizados estão apresentadas na **Tabela 2**.

Tabela 2: Oligonucleotídeos primers para a reação de PCR em tempo real dos genes alvo do S26, CNP e NPR2

Primers	Sequência de nucleotídeos	
	Senso	Anti-senso
S26	AAGGAACAATGGTCGTGCCA	ATCGGGCACAGTTAGTGCAG
CNP (<i>NPPC</i>)	CTCCGTTGTGCTGAGGTCAT	CAGCTGGTGTGTGTATTCCC
NPR2	GATGCTGGAGAAGGAGCTGG	CATACTGTTCCATGCGCAGC

Os primers foram sintetizados pela Invitrogen, recebidos liofilizados e, em seguida, ressuspensos em água DEPC, livre de RNase e DNase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), para concentração final de 100 pmol/ μ L (concentração para estoque). Foram preparadas alíquotas de 5 μ M/ μ L (concentração de uso para a PCR em tempo real), no dia do experimento.

3.5.4 Reação em cadeia de polimerase em tempo real

As amostras de cDNA obtidas na RT foram submetidas a PCR em tempo real a fim de avaliar a expressão dos genes que codificam o precursor do CNP (*NPPC*) e o receptor NPR2. A reação consistiu de 2 μ L de cDNA e 18 μ L de uma solução mix composta por 13 μ L de água para PCR (esterilizada e filtrada), 1 μ L do primer mix (5 μ M) (Invitrogen, Brasil) e por 4 μ L de EVA Green[®] Master Mix (Biotium, Fremont, CA), em volume final de 20 μ L de reação. Cada amostra foi ensaiada em duplicata, inclusive os controles negativos, que tiveram o cDNA substituído pelo produto de reação feita na ausência de transcriptase reversa. As reações de PCR foram realizadas em placa de 96 poços (ABI PRISM[®] 96- Well Optical Reaction Plate with Barcode, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) selada com adesivo óptico (ABI PRISM[®] Optical Adhesive Covers, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). O equipamento utilizado foi o ABI PRISM[®] 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Warrington WA, UK) no seguinte ciclo termal: [estágio 1] um ciclo de 95°C / 10 min.;

[estágio 2] 40 ciclos de 95° C / 15 segundos, 60°C / 15 segundos e 72°C / 20 segundos; [estágio 3] 95°C / 15 segundos, 54°C / 15 segundos e 95° C / 15 segundos. As curvas de *melting* foram realizadas no final de cada ciclo para conferência da especificidade do fragmento amplificado. Os resultados foram corrigidos pela expressão do gene normalizador *s26*.

3.6 Análise estatística e cálculo amostral

A análise estatística foi realizada no programa Prisma 7 para Mac OS, versão 7.0 b (2016). Foi realizado teste de normalidade de D'Agostino-Pearson para todas as variáveis contínuas analisadas. As de distribuição normal foram descritas como média \pm desvio-padrão e as de distribuição não normal foram descritas em mediana e intervalo interquartil.

Os níveis de CNP foram comparados entre dois ou três subgrupos de participantes por meio do teste de Mann-Whitney (dois subgrupos) ou análise de variância de Kruskal-Wallis seguida do teste de comparações múltiplas de Dunn (três subgrupos). As possíveis correlações entre os níveis de CNP no líquido folicular e variáveis contínuas pré-tratamento foram analisadas através do coeficiente de correlação linear não-paramétrico de Spearman. Com base nessas análises univariadas, os fatores que possivelmente influenciam os níveis de CNP foram inseridos em análise de regressão logística multivariada pelo método *stepwise backward*, tendo como variável dependente os níveis de CNP acima da mediana da população estudada.

A relação do CNP intrafolicular com os desfechos reprodutivos foi avaliada por coeficiente de correlação linear de Spearman, para variáveis contínuas, e análise de subgrupos com teste de Mann-Whitney, para a variável dicotômica gravidez.

A amostra de 46 pacientes foi suficiente para análise de subgrupos com mínimo de 10 indivíduos no menor subgrupo, capaz de detectar diferenças maiores que 0,09 ng/ml nos níveis de CNP entre os subgrupos com 80% de poder estatístico para o nível de confiança de 95%. O número de 30 pacientes submetidas a ICSI, das quais se possui a variável porcentagem de oócitos maduros, foi suficiente para detectar correlações lineares com $r > 0,5$ ou $r < -0,5$ com poder estatístico de 82%. O poder estatístico calculado para análises de correlação linear com o mesmo limiar de detecção ($r > 0,5$ ou $r < -0,5$) na amostra completa ($n=46$) foi 95%.

4. Resultados

4.1 Características da população estudada

Foram incluídas no estudo 46 pacientes submetidas à coleta ovular entre Maio e Julho de 2016. Duas amostras de líquido folicular se perderam e não foram dosadas, mas o poder estatístico da amostra não foi reduzido significativamente. A análise da maturidade dos oócitos coletados foi realizada nas 30 amostras cujo tratamento realizado foi ICSI, devido a necessidade de desnudamento dos óocitos para essa definição, o que não é feito na FIV convencional.

As causas de infertilidade envolvidas foram: fator masculino, obstrução tubária, endometriose, infertilidade sem causa aparente e fator ovulatório. Trinta e quatro pacientes apresentavam infertilidade primária e, apenas 12, infertilidade secundária.

A idade mediana das pacientes foi 36 anos, o IMC médio foi 24,8 Kg/m² e o tempo médio de infertilidade 7 anos. A dose mediana de FSH administrada foi 1950 UI, tendo sido utilizado tanto FSH recombinante quanto urinário altamente purificado. Foram coletados uma mediana de 6 oócitos por paciente. O número mediano de oócitos maduros coletados nas pacientes que foram submetidas à ICSI foi 5 (Tabela 3).

Tabela 3: Características da população estudada e parâmetros da FIV

Variáveis	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Distribuição*
Idade	36	36	26	41	Não normal
IMC (Kg/m ²)	24,8	24,2	17,8	30,8	Normal
FSH 3º dia (UI/ml)	7,61	6,92	1,83	17,31	Não normal
Tempo infertilidade (anos)	7	6	1	19	Normal
Folículos antrais	13	12	0	34	Não normal
Dose de FSH (UI)	2030	1950	1200	5025	Não normal
Nº de óvulos coletados	8	6	1	26	Não normal
Nº de óvulos maduros	6	5	1	17	Não normal
Taxa de fertilização	76%	80%	0	100%	Não Normal
Nº de embriões transferidos	2	2	0	3	Não normal

*Realizado teste de normalidade D'Agostino Pearson.

A taxa global de gravidez por paciente foi de 34,7% (n=16). A taxa de gravidez por transferência de embrião fresco foi de 38% considerando que quatro pacientes não tiveram transferência de embrião fresco, três por ausência de embriões viáveis e uma por risco de síndrome de hiperestimulação ovariana.

4.2 CNP intrafolicular: possíveis origens e fatores que influenciam suas concentrações.

Foi detectado CNP em todas as amostras de líquido folicular, em concentrações entre 0,07 a 0,47 ng/ml. As concentrações de CNP no líquido folicular apresentaram distribuição normal na população estudada (teste de D'Agostino-Pearson, $p=0,89$), como mostra o histograma (Figura 7). Entretanto, a distribuição dos valores de CNP divergiu da curva normal em alguns subgrupos analisados, razão pela qual será descrita com estatística não paramétrica.

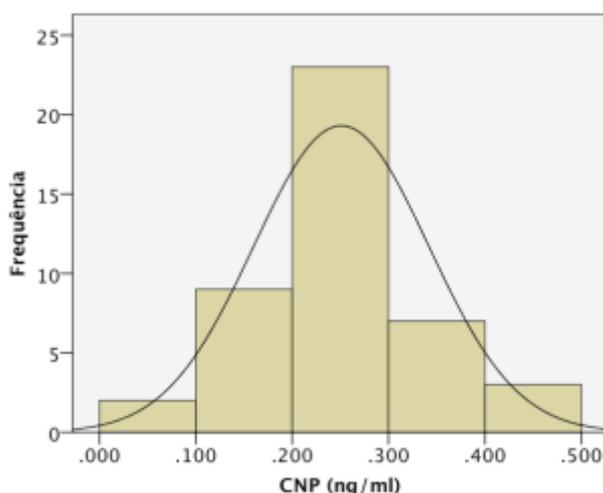


Figura 7: Distribuição das concentrações de CNP nas amostras de líquido folicular do estudo (n=44).

Foi observada uma correlação direta, estatisticamente significativa, entre o número de folículos antrais e os níveis intrafoliculares de CNP ($r = 0,454$, $p = 0,002$). Entretanto, quando analisados a idade da paciente, tempo de infertilidade, FSH basal e dose total de FSH utilizada na estimulação ovariana, não foi encontrada correlação entre nenhuma dessas variáveis com a concentração de CNP no líquido folicular. (Figura 8 A-D).

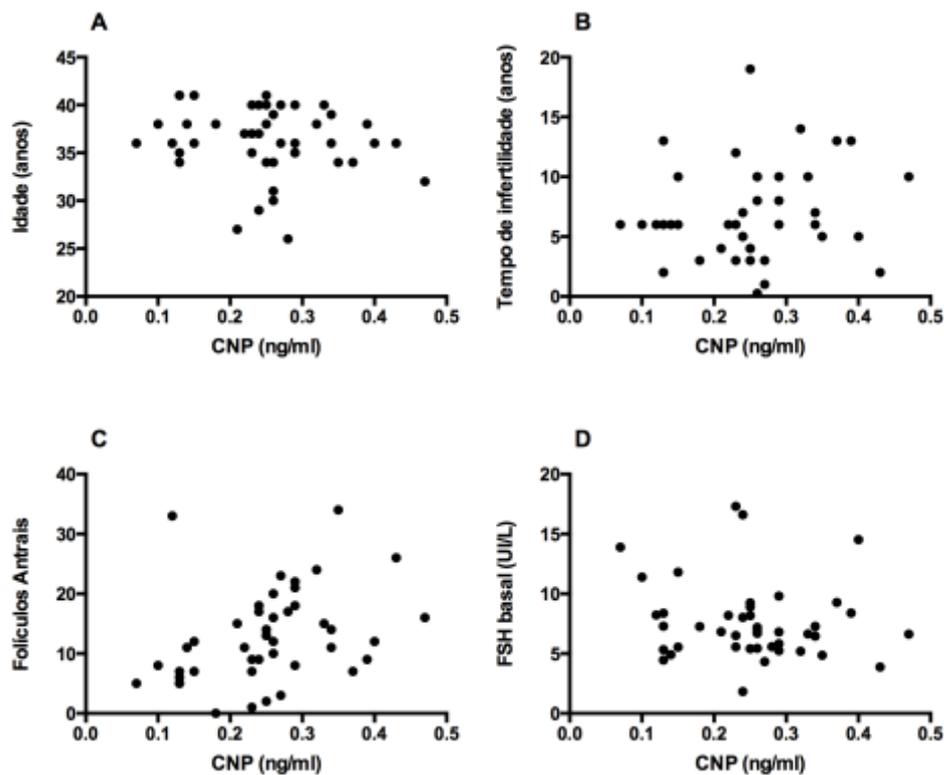


Figura 8: Concentrações de CNP no líquido folicular de acordo com características clínicas das pacientes: variáveis contínuas. Houve correlação significativa do CNP com a contagem de folículos antrais prévia à estimulação ovariana (painel C, $r = 0,454$, $p = 0,002$).

Para análise da influência das causas de infertilidade nos níveis de CNP intrafoliculares, as pacientes foram divididas em três grupos de acordo com a principal indicação clínica para FIV: fator masculino, obstrução tubárea e endometriose ou infertilidade sem causa aparente (ISCA). O grupo das pacientes com endometriose ou ISCA apresentou níveis significativamente menores de CNP intrafoliculares quando comparado aos demais grupos. (Figura 9 A)

Também foram observados níveis mais baixos de CNP nas pacientes que utilizaram o protocolo curto de indução ovariana com agonista de GnRH (*Flare up*), quando comparadas com aquelas submetidas ao protocolo longo com agonista e ao protocolo com antagonista do GnRH (Figura 9 B).

Não foi encontrada diferença significativa nos níveis de CNP entre as pacientes que utilizaram FSH recombinante puro ou FSH com LH (Figura 9 C).

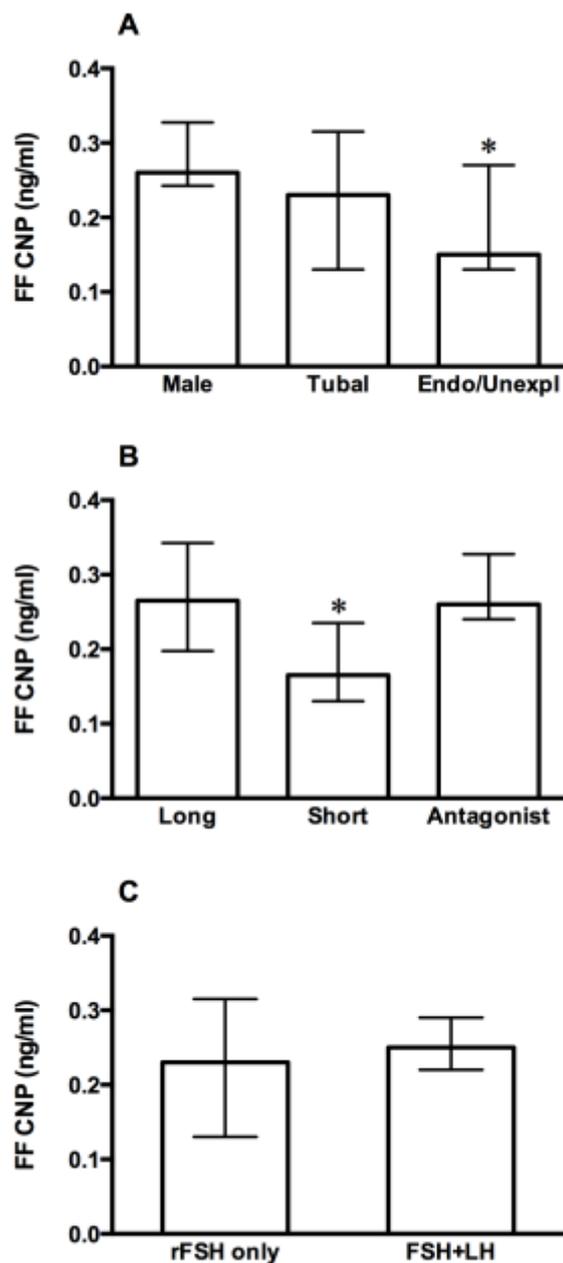


Figura 9: Concentrações de CNP no líquido folicular de acordo com características clínicas das pacientes: variáveis categóricas. Os dados são expressos como medianas e intervalo interquartil. * $p < 0,05$ (ANOVA de Kruskal-Wallis e teste de Dunn).

Na análise multivariada foram encontradas duas variáveis com valor preditivo independente para níveis mais altos de CNP, o número de folículos antrais pré-tratamento e a presença de endometriose ou ISCA (Tabela 4).

Tabela 4: Regressão logística multivariada (método *stepwise backward*) para definir variáveis independentemente associadas aos níveis intrafoliculares de CNP. A variável dependente dicotômica foi a concentração de CNP maior que a mediana.

Variável	Razão de Chances Ajustada	Intervalo de Confiança de 95%
Folículos antrais	1,10	1,01–1,20
Endometriose ou ISCA	0,30	0,14–0,88
Protocolo curto – agonista	Excluído no modelo final	
Tempo de infertilidade	Excluído no modelo final	
Idade da mulher	Excluído no modelo final	

Em 38 amostras foi realizado o PCR em tempo real para verificação da expressão do CNP nas células da granulosa. Oito amostras não foram analisadas por falta de quantidade suficiente de RNA. Os resultados de RT-PCR demonstraram-se homogêneos para amplificação do gene de referência S26. As duplicatas das amostras foram concordantes e a curva de *Melting* apresentou pico único para cada gene-alvo, demonstrando a confiabilidade dos resultados (Figura 10A).

Não foi encontrada uma correlação entre o mRNA para NPPC e a concentração de CNP no líquido folicular (Figura 10 B).

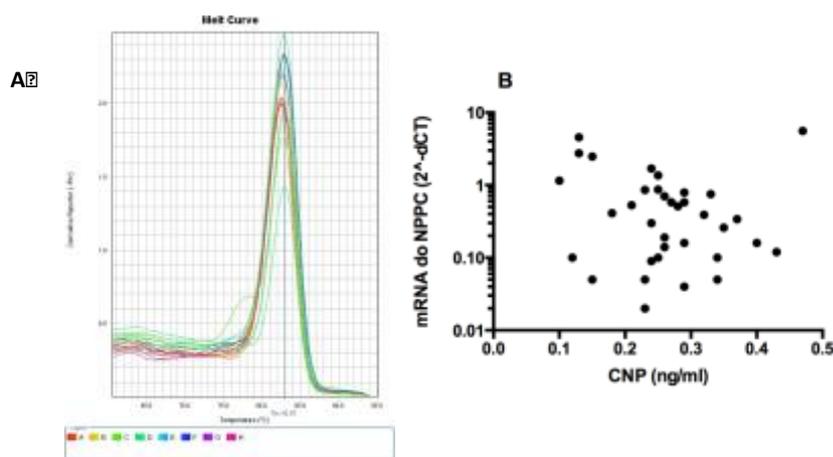


Figura 10: A) Curvas de *Melting* com picos únicos, comprovando a especificidade dos fragmentos amplificados de mRNA do NPPC; B) Ausência de correlação entre os níveis de CNP no pool de líquido folicular e a expressão do *NPPC* no pool de células da granulosa.

4.3 CNP intrafolicular: possíveis efeitos e sua relação com desfechos reprodutivos

Os níveis de CNP se correlacionaram diretamente com o número de folículos com diâmetro médio maior que 16 mm ao USTV no dia da aplicação do hCG recombinante ($r = 0.361$), sendo este resultado estatisticamente significativo ($p = 0.016$) (Figura 11A).

Foi observado também que pacientes com maior número de óocitos coletados apresentaram maiores níveis de CNP ($r = 0.371$, $p = 0.013$) (Figura 11B).

Em contrapartida, os valores obtidos de CNP foram inversamente proporcionais ao número de óocitos maduros em metáfase II ($r = 0.386$, $p = 0.035$) (Figura 11C).

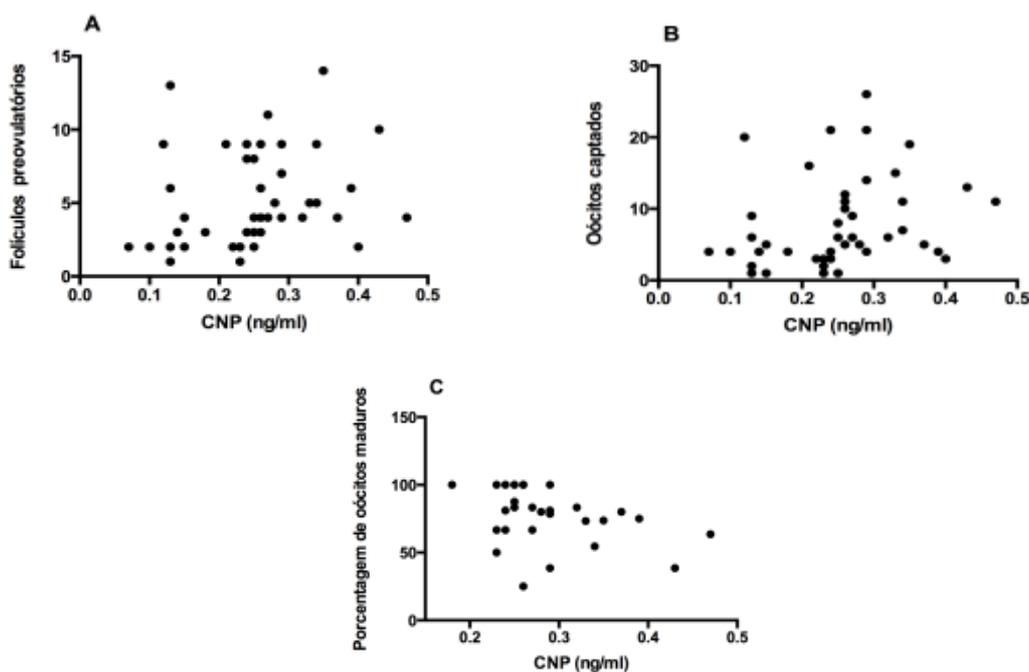


Figura 11: Correlação entre os níveis de CNP no líquido folicular e resposta ovariana à estimulação controlada. Há correlação direta do CNP com o número de folículos pré-ovulatórios (>16 mm) (A: $r = 0,361$, $p = 0,16$) e com o total de óocitos captados (B: $r = 0,374$, $p = 0,12$), e correlação inversa do CNP com a porcentagem de óocitos maduros (metáfase II) (C: $r = -0,363$, $p = 0,049$).

Quanto à ocorrência de gravidez, não houve correlação entre os níveis de CNP no líquido folicular e esse desfecho (Figura 12).

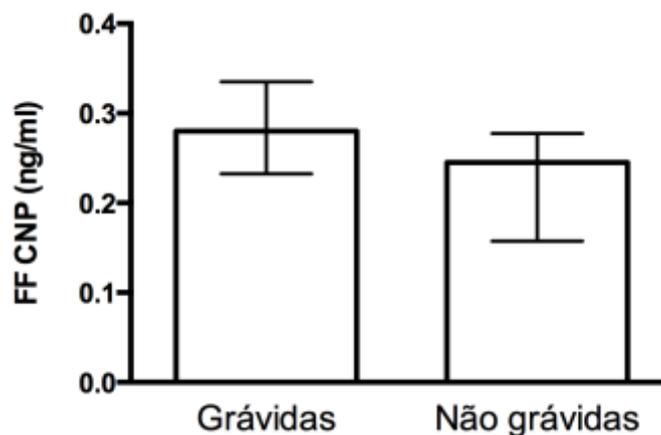


Figura 12: Concentrações de CNP no líquido folicular de acordo com a ocorrência de gravidez.

Já na análise da expressão do *NPR2*, foi encontrada uma correlação inversa entre o CNP intrafolicular e o mRNA do *NPR2* nas células da granulosa ($r = -0,385$, $p = 0,020$) (Figura 13).

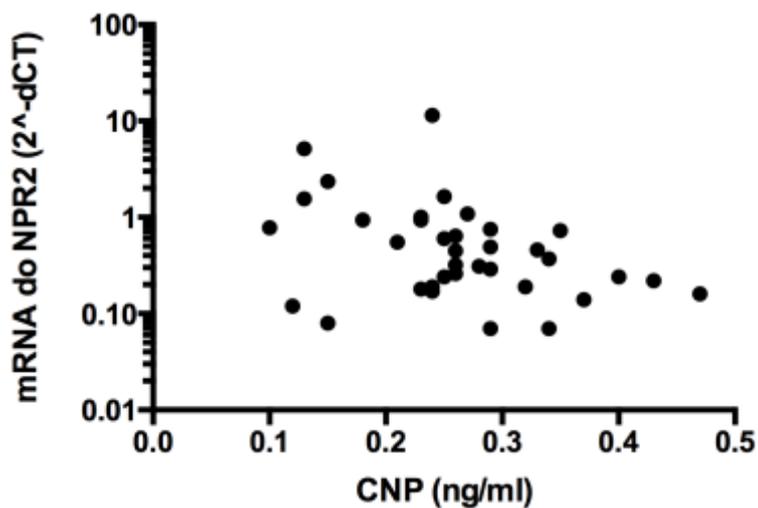


Figura 13: Correlação inversa entre os níveis de CNP no pool de líquido folicular e a expressão do *NPR2* no pool de células da granulosa. ($r = -0,385$, $p = 0,020$)

5. Discussão

O desenvolvimento e maturação oocitários já foram amplamente estudados, mas ainda existem pontos importantes a serem esclarecidos acerca desse processo e suas implicações clínicas.

O CNP tem sido abordado recentemente em modelos animais, tendo sido comprovada a sua importância no crescimento oocitário e o seu papel crucial na interrupção da meiose nos óocitos, até retomada da divisão meiótica na ovulação. Os resultados dos estudos em camundongos^{15; 28}, vacas²⁶ e porcas²⁵ foram coerentes com a definição da atuação do CNP, através da via do cGMP, na redução do cAMP e, por consequência, na interrupção da meiose oocitária. Estudo em camundongos e em células da granulosa de mulheres em tratamento de fertilização assistida mostrou que a maturação oocitária depende de uma redução do cGMP, bem como da redução da permeabilidade nas junções *gap* foliculares para impedir sua difusão, sendo essas ações exercidas pelo LH⁸. Além disso, já foi demonstrado que o CNP secretado por folículos em crescimento é capaz de estimular o crescimento folicular pré-antral e antral, com ação sinérgica ao FSH^{5; 31}.

No presente estudo, foram avaliados pela primeira vez os níveis intrafoliculares de CNP em uma coorte de mulheres submetidas a tratamento de fertilização *in vitro*, no intuito de compreender os fatores relacionados à maturação oocitária, à resposta à estimulação ovariana e aos demais desfechos reprodutivos. Foi observado que o CNP está presente no líquido intrafolicular e que existe expressão gênica do seu precursor, o *NPPC*, bem como do seu receptor, o *NPR2*, nas células da granulosa também em humanos.

Ao analisar os fatores que possivelmente determinam os níveis intraovarianos de CNP, foi encontrado um nível significativamente menor de CNP nas pacientes que foram submetidas ao protocolo curto com agonista de GnRH, ou *flare up*. Uma possível hipótese para explicar esse fato seria a diminuição dos níveis de CNP provocada pelo aumento do LH endógeno característico desse protocolo, quando ocorre o efeito *flare* pelo agonista do GnRh no início do tratamento. A diminuição dos níveis de CNP causada pelo LH já foi descrita anteriormente em animais e sugerida em humanos²⁸. Os mecanismos que controlam em última instância a produção e liberação de CNP no ovário humano são ainda desconhecidos, em grande parte por causa da dificuldade para obtenção de dados sobre os níveis de CNP intrafolicular antes do pico

de LH/ aplicação do hCG, o que requereria um procedimento invasivo sem benefício para a paciente. Em um estudo realizado em humanos, níveis elevados do CNP foram encontrados em amostras de fluidos foliculares antes da onda endógena de LH. Após a aplicação de hCG, esses níveis eram significativamente menores, e os folículos continham oócitos maduros. Entretanto, esse estudo utilizou como grupo controle mulheres submetidas a laparotomia para tratamento cirúrgico de miomatose uterina, visto que a obtenção de amostras de células da granulosa e líquido folicular antes do pico do LH é dificultada devido a aspectos éticos²⁸.

Outra possibilidade que explicaria os níveis reduzidos de CNP nas pacientes que utilizaram o protocolo *flare up* encontrados no presente estudo, vem do fato que esse tratamento normalmente é escolhido para aquelas pacientes com maiores chances de serem más respondedoras, apresentando, portanto, menor número de folículos antrais previamente a indução ovariana. De fato, neste trabalho foi mostrado também que as pacientes com menor número de folículos antrais apresentaram menores concentrações de CNP intrafolicular. Esse dado está de acordo com achados de um estudo em camundongos que demonstrou a produção de CNP pelas células da granulosa de folículos antrais⁵. A ausência de correlação entre a idade da paciente e os níveis intrafoliculares de CNP observada neste estudo poderia parecer uma contradição a esses resultados, entretanto, a redução da reserva ovariana tem origem multifatorial, não sendo a idade, portanto, fator único determinante.

Já os níveis mais baixos de CNP nas pacientes com diagnóstico de endometriose e ISCA encontrados no presente estudo representam um dado novo que merece ser melhor estudado posteriormente.

Outro resultado observado foi que o nível de CNP em líquido folicular de pacientes em tratamento de reprodução assistida foi diretamente proporcional ao número de folículos com diâmetro médio superior a 16 mm vistos ao ultrassom no dia da aplicação do hCG para coleta ovular. Além disso, pacientes com maior número de oócitos captados também apresentaram maiores níveis intrafoliculares de CNP. Esses resultados vão ao encontro de estudo anterior feito em camundongos²⁸, mostrando que o CNP está presente no líquido folicular e tem correlação direta com o número de oócitos e com a resposta à estimulação por gonadotrofinas.

A relação do CNP com crescimento folicular vem sendo comprovada em diversos estudos^{1; 5; 31} e sua atuação segue a via do cGMP, diferentemente do FSH, que atua na modulação do cAMP¹. Desta forma, o CNP tem-se revelado um estimulador

endógeno e fisiológico do crescimento oocitário, agindo na mesma direção do FSH, porém, independente deste. Esses achados sugerem a possibilidade de novas opções terapêuticas para estimulação ovariana controlada em mulheres em tratamento de reprodução assistida e uma alternativa na maturação oocitária *in vitro*. De fato, oócitos maturados *in vitro* na presença de CNP são fertilizáveis e podem desenvolver-se em blastocistos, permitindo a produção de descendentes viáveis⁵.

Em estudos com animais foi demonstrado que o CNP produzido pelas células da granulosa, agindo em seu receptor NPR2, aumenta o nível de cGMP que inibe a ação da PDE3 impedindo a diminuição do cAMP. Os altos níveis desses nucleosídeos cíclicos bloqueiam a retomada da meiose oocitária, mantendo os oócitos em diplóteno da prófase I até a ovulação^{24; 33}. Com o pico do LH ocorre diminuição da permeabilidade das junções *gap* entre oócitos e células somáticas, gerando menor difusão do cGMP para os oócitos, reduzindo os níveis de cAMP, acarretando a retomada da meiose com formação de oócitos maduros^{22; 28; 34}.

No presente estudo foi observada também uma relação inversa entre o número de oócitos maduros e os níveis de CNP. Esse resultado sugere que a diminuição do CNP está relacionada com o retorno da divisão meiótica oocitária e maior número de oócitos maduros, em metáfase II, em conformidade com os estudos experimentais desenvolvidos em animais e estudos preliminares realizados em humanos^{15; 28}. Apesar da limitação inerente ao estudo observacional *in vivo*, que não nos permite manipular experimentalmente os níveis intrafoliculares de CNP, a relação inversa entre o CNP e o número de oócitos imaturos encontrada no presente estudo sugere que esse peptídeo pode ter uma função relevante na maturação oocitária também na espécie humana.

O RT-PCR realizado neste estudo confirmou a presença de expressão gênica do precursor do CNP e do receptor *NPR2* nas células da granulosa, assim como já havia sido descrito em outros trabalhos^{5; 24; 25; 33}. Todavia, os níveis de mRNA do precursor do CNP não se correlacionaram com os níveis de CNP no pool de líquido folicular. Esse fato pode sugerir que as células da granulosa em suspensão no líquido folicular que foram estudadas não são a fonte de produção do CNP. As células do cumulus, que não foram estudadas neste trabalho, poderiam ser as responsáveis pela presença do CNP no líquido folicular, por exemplo. Outra hipótese está relacionada com a regulação da produção do CNP, que envolve mecanismos regulatórios pós-transcrição do mRNA e pós-tradução do peptídeo precursor, como por exemplo a clivagem enzimática do NPPC

Zhang *et al.* mostraram que o CNP produzido nas células da granulosa através da clivagem do seu precursor NPPC ativa seu receptor NPR2 nas células do cumulus, gerando cGMP que age na interrupção da meiose oocitária²⁴. Essa ação do NPR2 na meiose também foi mostrada no estudo de Tsuji *et al* através da observação da retomada da divisão oocitária precoce em folículos pré-antrais de camundongos com mutação do gene do receptor NPR2¹⁵. Neste estudo não foi possível avaliar o NPR2 nos oócitos humanos, já que os mesmos destinavam-se exclusivamente ao tratamento da infertilidade. Entretanto, estudos em animais já demonstraram que há expressão de *NPR2* principalmente nas células do cumulus e em menor quantidade nas células da granulosa periantrais, havendo pouca ou nenhuma expressão desse receptor nos oócitos^{5; 24; 27}. Dessa maneira, os efeitos do NPPC nos níveis de cGMP em oócitos provavelmente resultam da geração de cGMP pelas células do cumulus e a subsequente transferência para oócitos através das junções *gap*.

No presente estudo foi observada pela primeira vez em humanos a presença de mRNA para o NPR2 em células da granulosa luteinizadas, indicando que essas células são não apenas fonte, mas também alvo potencial dos efeitos do CNP. Os resultados obtidos mostram uma correlação inversa dos níveis de CNP no pool de líquido folicular e os níveis de mRNA do NPR2 no pool de células da granulosa em suspensão. Esse achado sugere que altos níveis de CNP poderiam reduzir a expressão gênica do *NPR2* nas células da granulosa, como mecanismo de autorregulação.

Portanto, assim como foi previamente observado em animais^{24; 26; 33}, é possível concluir que o conjunto CNP/NPR2 exerce papel essencial na sincronização da ovulação com a maturação oocitária também em humanos, como mostrado por este trabalho. A ampliação do conhecimento em torno da interrupção da meiose nos oócitos abre diversos caminhos, como por exemplo, a possibilidade de desenvolvimento de novas medicações contraceptivas futuramente.

Este estudo possui algumas limitações. O líquido folicular utilizado era originado de um pool de folículos, dessa forma não foi possível avaliar a relação do CNP com as características individuais dos oócitos. Além disso, não foram analisadas as células do cumulus, e sim uma pequena amostra de células da granulosa murais mais próximas do lúmen antral, ou seja, aquelas células que se encontravam em suspensão. Tendo em vista que as células do cumulus parecem ser a peça chave na produção do CNP para sua atuação sobre o oócito, seria interessante o estudo dessas células em humanos.

6. Conclusões e comentários finais

Em relação aos objetivos deste estudo, nossos resultados permitem concluir que:

- CNP é mensurável no líquido folicular após estimulação ovariana controlada para fertilização *in vitro* (FIV).
- Os níveis intrafoliculares de CNP correlacionam-se diretamente com a contagem de folículos antrais pré-estimulação e são mais baixos em mulheres com endometriose ou infertilidade sem causa aparente, comparadas a outras causas de infertilidade.
- As células da granulosa murais em suspensão no líquido folicular expressam o mRNA para o precursor do CNP, mas esse mRNA não se relaciona quantitativamente com o conteúdo de CNP no líquido folicular.
- O CNP intrafolicular não prediz gravidez. Entretanto, seus níveis correlacionam-se diretamente com o número de folículos pré-ovulatórios pós-estimulação e com o número total de oócitos captados, e inversamente com a porcentagem de oócitos maduros.

Portanto, o CNP intrafolicular pode se tornar um novo biomarcador da resposta ovariana a gonadotropinas e maturação oocitária em humanos. Os resultados encontrados sugerem que, similar ao observado em estudos experimentais em animais, o CNP pode estar relacionado com a interrupção da meiose oocitária em humanos, tendo papel fundamental no desenvolvimento folicular.

Esses achados ajudam a elucidar um pouco mais os fatores envolvidos no desenvolvimento oocitário e abrem caminho para o estudo de novas abordagens terapêuticas para pacientes inférteis com má resposta ao FSH e novos protocolos de maturação oocitária *in vitro*. Além disso, podem vir a representar uma nova alternativa para hiperrespondedoras, diminuindo a frequência da síndrome de hiperestimulação ovariana.

7. Referências bibliográficas

- 1 HSUEH, A. J. et al. Intraovarian control of early folliculogenesis. **Endocr Rev**, v. 36, n. 1, p. 1-24, Feb 2015. ISSN 1945-7189. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25202833> >.
- 2 MCGEE, E. A.; HSUEH, A. J. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. **Endocr Rev**, v. 21, n. 2, p. 200-14, Apr 2000. ISSN 0163-769X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10782364> >.
- 3 COTICCHIO, G. et al. Oocyte maturation: gamete-somatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization. **Hum Reprod Update**, v. 21, n. 4, p. 427-54, 2015 Jul-Aug 2015. ISSN 1460-2369. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25744083> >.
- 4 HAWKINS, S. M.; MATZUK, M. M. The menstrual cycle: basic biology. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1135, p. 10-8, 2008. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18574203> >.
- 5 SATO, Y. et al. C-type natriuretic peptide stimulates ovarian follicle development. **Mol Endocrinol**, v. 26, n. 7, p. 1158-66, Jul 2012. ISSN 1944-9917. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22595960> >.
- 6 VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1717-51, Apr 2005. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15763114> >.
- 7 PENG, J. Y. et al. Identification and gene expression analyses of natriuretic peptide system in the ovary of goat (*Capra hircus*). **Gene**, v. 524, n. 2, p. 105-13, Jul 2013. ISSN 1879-0038. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23644022> >.
- 8 LIU, X. et al. Multiple pathways mediate luteinizing hormone regulation of cGMP signaling in the mouse ovarian follicle. **Biol Reprod**, v. 91, n. 1, p. 9, Jul 2014. ISSN 1529-7268. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24740605> >.
- 9 VOLPE, M.; RUBATTU, S.; BURNETT, J. Natriuretic peptides in cardiovascular diseases: current use and perspectives. **Eur Heart J**, v. 35, n. 7, p. 419-25, Feb 2014. ISSN 1522-9645. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24227810> >.
- 10 TREMBLAY, J. et al. Biochemistry and physiology of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclases. **Mol Cell Biochem**, v. 230, n. 1-2, p. 31-47, Jan 2002. ISSN 0300-8177. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11952095> >.

- 11 SCHULZ, S. C-type natriuretic peptide and guanylyl cyclase B receptor. **Peptides**, v. 26, n. 6, p. 1024-34, Jun 2005. ISSN 0196-9781. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15911070> >.
- 12 GUTKOWSKA, J. et al. Hormonal regulation of natriuretic peptide system during induced ovarian follicular development in the rat. **Biol Reprod**, v. 61, n. 1, p. 162-70, Jul 1999. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10377045> >.
- 13 JANKOWSKI, M. et al. C-type natriuretic peptide and the guanylyl cyclase receptors in the rat ovary are modulated by the estrous cycle. **Biol Reprod**, v. 56, n. 1, p. 59-66, Jan 1997. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9002633> >.
- 14 LEE, K. B. et al. Hormonal coordination of natriuretic peptide type C and natriuretic peptide receptor 3 expression in mouse granulosa cells. **Biol Reprod**, v. 88, n. 2, p. 42, Feb 2013. ISSN 1529-7268. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23255339> >.
- 15 TSUJI, T. et al. CNP/NPR2 signaling maintains oocyte meiotic arrest in early antral follicles and is suppressed by EGFR-mediated signaling in preovulatory follicles. **Mol Reprod Dev**, v. 79, n. 11, p. 795-802, Nov 2012. ISSN 1098-2795. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22987720> >.
- 16 KIYOSU, C. et al. NPPC/NPR2 signaling is essential for oocyte meiotic arrest and cumulus oophorus formation during follicular development in the mouse ovary. **Reproduction**, v. 144, n. 2, p. 187-93, Aug 2012. ISSN 1741-7899. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22696190> >.
- 17 CONTI, M. et al. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. **Mol Cell Endocrinol**, v. 187, n. 1-2, p. 153-9, Feb 2002. ISSN 0303-7207. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11988323> >.
- 18 HORNER, K. et al. Rodent oocytes express an active adenylyl cyclase required for meiotic arrest. **Dev Biol**, v. 258, n. 2, p. 385-96, Jun 2003. ISSN 0012-1606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12798295> >.
- 19 DEKEL, N. Cellular, biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. **Mol Cell Endocrinol**, v. 234, n. 1-2, p. 19-25, Apr 2005. ISSN 0303-7207. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15836949> >.
- 20 TÖRNELL, J.; BILLIG, H.; HILLEN SJÖ, T. Resumption of rat oocyte meiosis is paralleled by a decrease in guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP) and is inhibited by microinjection of cGMP. **Acta Physiol Scand**, v. 139, n. 3, p. 511-7, Jul 1990. ISSN 0001-6772. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2173353> >.
- 21 HUBBARD, C. J.; TERRANOVA, P. F. Inhibitory action of cyclic guanosine 5'-phosphoric acid (GMP) on oocyte maturation: dependence on an intact

- cumulus. **Biol Reprod**, v. 26, n. 4, p. 628-32, May 1982. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6282351> >.
- 22 NORRIS, R. P. et al. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. **Development**, v. 136, n. 11, p. 1869-78, Jun 2009. ISSN 0950-1991. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19429786> >.
- 23 ZHANG, W. et al. Epidermal growth factor-network signaling mediates luteinizing hormone regulation of BNP and CNP and their receptor NPR2 during porcine oocyte meiotic resumption. **Mol Reprod Dev**, v. 81, n. 11, p. 1030-41, Nov 2014. ISSN 1098-2795. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25348585> >.
- 24 ZHANG, M. et al. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. **Science**, v. 330, n. 6002, p. 366-9, Oct 2010. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20947764> >.
- 25 HIRADATE, Y. et al. C-type natriuretic peptide inhibits porcine oocyte meiotic resumption. **Zygote**, v. 22, n. 3, p. 372-7, Aug 2014. ISSN 1469-8730. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23331536> >.
- 26 FRANCIOSI, F. et al. Natriuretic peptide precursor C delays meiotic resumption and sustains gap junction-mediated communication in bovine cumulus-enclosed oocytes. **Biol Reprod**, v. 91, n. 3, p. 61, Sep 2014. ISSN 1529-7268. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25078681> >.
- 27 ZHANG, J. et al. Effect of C-Type Natriuretic Peptide on Maturation and Developmental Competence of Goat Oocytes Matured In Vitro. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. e0132318, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26151446> >.
- 28 KAWAMURA, K. et al. Pre-ovulatory LH/hCG surge decreases C-type natriuretic peptide secretion by ovarian granulosa cells to promote meiotic resumption of pre-ovulatory oocytes. **Hum Reprod**, v. 26, n. 11, p. 3094-101, Nov 2011. ISSN 1460-2350. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21865234> >.
- 29 CHUSHO, H. et al. Dwarfism and early death in mice lacking C-type natriuretic peptide. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 7, p. 4016-21, Mar 2001. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11259675> >.
- 30 TAMURA, N. et al. Critical roles of the guanylyl cyclase B receptor in endochondral ossification and development of female reproductive organs. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 49, p. 17300-5, Dec 2004. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15572448> >.

- 31 MCGEE, E. et al. Preantral ovarian follicles in serum-free culture: suppression of apoptosis after activation of the cyclic guanosine 3',5'-monophosphate pathway and stimulation of growth and differentiation by follicle-stimulating hormone. **Endocrinology**, v. 138, n. 6, p. 2417-24, Jun 1997. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9165031> >.
- 32 ABEL, M. H. et al. The effect of a null mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene on mouse reproduction. **Endocrinology**, v. 141, n. 5, p. 1795-803, May 2000. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10803590> >.
- 33 EGBERT, J. R. et al. Dephosphorylation and inactivation of NPR2 guanylyl cyclase in granulosa cells contributes to the LH-induced decrease in cGMP that causes resumption of meiosis in rat oocytes. **Development**, v. 141, n. 18, p. 3594-604, Sep 2014. ISSN 1477-9129. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25183874> >.
- 34 VACCARI, S. et al. Cyclic GMP signaling is involved in the luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes. **Biol Reprod**, v. 81, n. 3, p. 595-604, Sep 2009. ISSN 1529-7268. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19474061> >.

8. ANEXO I

9. ANEXO II