

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 28/02/2021.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DO SISTEMA PRÉ-MIV  
COM NPPC COM MIV SUPLEMENTADA DE MODO  
SEQUENCIAL COM LH SOBRE A PRODUÇÃO *IN VITRO*  
DE EMBRIÕES BOVINOS**

**MICHELI PRONUNCIATE**

**Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação do Instituto de Biociências  
de Botucatu, Universidade Estadual  
Paulista – UNESP, para a obtenção do título  
de Mestre em Farmacologia e  
Biotecnologia.**

Orientador: Marcelo Fábio Gouveia Nogueira

Botucatu-SP

2019

P965e Pronunciate, Micheli  
Efeitos da associação do Sistema pré-MIV com NPPC com MIV suplementada de modo sequencial com LH sobre a produção in vitro de embriões bovinos / Micheli Pronunciate. -- Botucatu, 2019  
67 p. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Botucatu  
Orientador: Marcelo Fábio Gouveia Nogueira

1. Oócito. 2. células do cumulus. 3. AREG. 4. NPPC. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

**Nome da Autora:** Micheli Pronunciate

**Título:** Efeitos da associação do sistema pré-MIV com NPPC com MIV suplementada de modo sequencial com LH sobre a produção *in vitro* de embriões bovinos

**Banca Examinadora**

Profº. Dr. Marcelo Fábio Gouveia Nogueira

Presidente e Orientador

Departamento de Farmacologia/IB

Universidade Estadual Paulista – UNESP Botucatu – SP

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Fernanda da Cruz Landim

Membro Titular

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia– FMVZ – UNESP – Botucatu - SP

Profº Drº Anthony Cesar de Souza Castilho

Membro Titular

Departamento de Farmacologia/IB

Universidade Estadual Paulista-UNESP-Botucatu-SP

**Data da Defesa:** 28/02/2019

**Local da Defesa:** Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, Botucatu – SP

Dedico esse trabalho à minha mãe Leuza  
(*in memoriam*), que permanecer como  
parte de mim, mesmo após sua partida.  
Obrigado por todo o cuidado! Ao meu pai,  
irmãs e aos amigos que sempre me  
apoíaram...

## Agradecimentos

Ao meu orientador, Marcelo Fábio Gouveia Nogueira, por confiar em mim para a execução deste trabalho e por toda a paciência ao longo desses dois anos. Obrigada por me aceitar como orientada mesmo sem me conhecer e por todo aprendizado que adquiri fazendo parte de sua equipe.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e tempo dedicados para enriquecimento deste trabalho.

Ao Prof<sup>o</sup> Luiz Cláudio Di Stasi, por permitir que parte da execução desse projeto fosse realizada nas dependências do Laboratório Multiusuário de Fitomedicamentos, Farmacologia e Biotecnologia (FitoFarmaTec).

À Vitória e Priscila, por toda ajuda e disponibilidade durante os dias e noites de experimento no Laboratório de Micromanipulação Embrionária (LAMEM-ASSIS/SP), também por me acolherem em suas casas durante esses períodos.

À Fernanda, companheira de laboratório, pela paciência em me ensinar todas as técnicas, análises e por me ajudar com todas as dúvidas que surgiram. Agradeço também pelos conselhos, conversas e companheirismo durante meu trajeto até aqui.

À Elisa, pelo suporte, ajuda e insights que contribuíram para a execução deste projeto. Obrigada por sempre estar por perto e disposta a ajudar.

À Patrícia Kubo Fontes, por mediar o contato com meu orientador, pela ajuda prática e intelectual quando requisitada.

À Carol, pelos empréstimos de reagentes e pela ajuda intelectual em momentos de dúvida. Agradeço pela disponibilidade que teve desde o princípio e por todas as dicas, tanto em experimentos quanto para montagem de aulas.

À minha mãe (Leuza, *in memoriam*) por ter me dado a vida, pelo zelo e amor com que me criou, por sonhar meus sonhos comigo e ficar feliz com cada conquista. Agradeço a Deus todos os dias pelo privilégio que foi amá-la e tê-la como mãe e pela possibilidade de estar por perto até o final de sua vida.

Ao meu pai (José) e minhas irmãs (Shirlei e Sirlene) por me apoiarem e acreditarem em mim. Agradeço a vocês por serem meu refúgio e porto seguro em todos os momentos.

À Janete, funcionária do departamento de Farmacologia, por todos os cafés e conversas que ajudavam a aliviar a tensão. Obrigada por me ouvir e me fazer rir nos momentos de estresse. E a todos os demais funcionários do departamento (Luíz, Cristina, Paulo e Hélio) por toda a atenção e auxílio.

A seção de pós-graduação do Instituto de Biociências de Botucatu.

Aos professores do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu pelo tempo dedicado às disciplinas e por toda atenção disponibilizada.

A CAPES pela concessão de bolsa de mestrado e a FAPESP (processo 2012/50533-2) pelo suporte financeiro para realização deste trabalho.

*"A mente que se abre a uma nova ideia, jamais voltará ao seu tamanho original."*

*Albert Einstein*

## RESUMO

*In vivo*, a maturação oocitária é gonadotrofina-dependente (FSH e LH) e, até haver o devido estímulo, o oócito é mantido em parada meiótica (prófase I) devido à manutenção dos níveis intraoocitários de cAMP. O FSH é o responsável pelo crescimento inicial do folículo antral enquanto o LH promove a maturação final oocitária (no estágio pós-desvio), sinalizando a produção de peptídeos EGF-like (fator de crescimento semelhante ao epidermal) nas células da granulosa. Estes se ligam ao seu receptor (EGFR) nas células do *cumulus* ativando a via da proteína cinase ativadora de mitógeno (MAPK), causando o fechamento das junções comunicantes do tipo GAP e culminando na retomada meiótica. Os peptídeos AREG (Ampirregulina) e EREG (Epirregulina) são utilizados na maturação *in vitro* em diferentes espécies e em substituição ou associação com o FSH. Alguns estudos demonstram que, quando maturados com esses peptídeos, os oócitos desenvolvem embriões de melhor qualidade, com maior número de células da massa celular interna e mais parecidos com aqueles maturados *in vivo*. No entanto, o oócito retirado do microambiente folicular retoma a meiose espontaneamente, de forma precoce e não sincronizada entre o núcleo e o citoplasma. Para melhorar os resultados da maturação *in vitro*, é importante retardar a retomada espontânea meiótica. A literatura descreve a eficácia do precursor do peptídeo natriurético tipo C (NPPC) em manter *in vitro* a concentração de cAMP oocitária similar à fisiológica. Diante disso, neste estudo foi observado o efeito do AREG sobre a abundância de transcritos alvo de oócitos e células do *cumulus*, além do seu efeito em adição às gonadotrofinas (LH ou FSH) quanto à progressão meiótica e a produção de embriões, quando precedida pela pré-MIV com NPPC. Nossos resultados corroboram que o AREG é eficiente tanto quanto o FSH na maturação de complexos *cumulus*-oócito e não altera as taxas de quebra da vesícula germinativa (GVBD) ou oócitos que chegaram a meiose II (MII). No entanto, o perfil dos transcritos alvo estudado apresentou diferença entre ambos, indicando distintas ações celulares do AREG e do FSH. Demonstramos ainda que o LH, sozinho, é ineficiente na maturação e produziu uma alta taxa de GV mesmo após 24 horas. No entanto, quando a maturação foi precedida por pré-MIV utilizando NPPC, a taxa de blastocisto e a abundância dos transcritos alvo, o LH não diferiu dos demais grupos. Em suma, como já descrito na literatura, o AREG foi eficaz para a MIV e não estimulou a expressão de receptores de LH nas células do *cumulus*. Adicionalmente, o uso do NPPC na pré-MIV

foi capaz de retardar a retomada da meiose, por tempo suficiente para que o oócito adquirisse competência para suportar o desenvolvimento embrionário inicial.

## ABSTRACT

*In vivo*, the oocyte maturation is gonadotropin-dependent (LH and FSH) and, until there is a due stimulation, the oocyte is maintained in meiotic arrest (prophase I) due to the maintenance of intra-oocyte levels of cAMP. The FSH is responsible for initial growth of the antral follicle while the LH promotes final oocyte maturation (post-deviation), signaling the production of EGF-like (Epidermal Growth Factor-like) peptides in the granulosa cells. They bind to their receptor (EGFR) on *cumulus* cells activating the mitogen-activating protein kinase (MAPK) pathway causing closure of Gap Junctions culminating in meiosis resumption. The AREG (amphiregulin) and EREG (epiregulin) peptides are used *in vitro* maturation in different species and in substitution or association with FSH. Same studies shown that when mature with these peptide, oocytes develop better-quality embryos, with more cells in the inner cell mass, and more similar to those *in vivo*. However, the oocyte removed from the follicular microenvironment, resumes meiosis spontaneously, early and not synchronized between the cytoplasm and nucleus. To improve the *in vitro* maturation results, it is important delay spontaneous meiotic resumption. The literature describes the efficacy of the C-type natriuretic peptide (NPPC) precursor in maintaining the physiological-like oocyte cAMP concentration *in vitro*. In this study, the effect of AREG on the abundance of oocyte and *cumulus* cell transcript was observed, as well as its effect in addition to gonadotrophins (LH or FSH) on meiotic progression and embryo production, when preceded by pre-IVM with NPPC. Our results corroborate that the AREG is efficient as well as FSH in maturation of *cumulus*-oocyte complex (COC) and does not alter the rates of germinal vesicle breakdown (GVBD) or oocytes that reached meiosis II (MII) However, the target transcript profile showed a difference between the two, indicating distinct cellular actions of the AREG and FSH. We also demonstrate that LH, alone, is inefficient in maturation and produced a high GV rate even after 24 hours. However, when the maturation was preceded by pre-IVM using NPPC, blastocyst rate and abundance of target transcripts in the LH group did not differ from the other groups. In summary as describe in the literature, AREG was effective for IVM and did not stimulate the expression of LH receptor in *cumulus* cells. In addition, the use of NPPC in pre-IVM can postpone the meiosis resumption, long enough for the oocyte to acquire competence to support early embryonic development.

# LISTA DE FIGURAS

## Capítulo 1

**Figura 1.** Esquema do padrão de secreção de FSH, LH e P4 e o padrão de crescimento de folículos durante o ciclo estral na espécie bovina. Adaptado de Forde *et al.*, 2010. *Animal Reproduction Science*, 124 (2011) 164-169.....24

**Figura 2.** Modelo descritivo do papel do NPPC e seu receptor (NPR2), sobre a manutenção do bloqueio meiótico. ADCY (adenilato ciclase); GPR3/12 (receptores acoplados à proteína Gs 3 e 12); ODPF (do inglês *Oocyte-derived paracrine factor*; fatores parácrinos derivados do oócito). Adaptado de Zhang *et al.*, 2010. *Science* 330(6002): 366–369.....28

## Capítulo 2

**Figure 1.** Dispersion graph with the illustrative global gene expression profile of the groups analyzed. The results were obtained from five replicates.....52

**Figure 2.** *Cumulus* cell abundance of target transcripts. Bar charts showing the mRNA abundance in the different treatments. A) target genes NPR1 and ELOVL1 at 9 hours of maturation. B) target genes BDNF and PDE5A at 15 hours of maturation. The results were obtained from five replicates. Different letters mean statistical difference.....53

**Figure 3.** Oocyte abundance of target transcripts. Bar charts showing the mRNA abundance difference among the groups to the genes H1FOO and SLC2A4 from oocyte after 9 and 15 hours, respectively. Different letter means statistical difference among the groups. The results were obtained from five replicates.....54

**Figure 4.** Gene network designed with genes that showed the major number of interactions among them. The genes in the network was differentially expressed at 9, 15 or 24 hours as indicated in the text. The results were obtained from *cumulus* cells in five replicates. Legend:(→) positive action; (●) unspecific action; (−) negative action.....55

**Figure 5.** Meiosis resumption. Bars chart showing the rates of GV (germinal vesicle), GVBD (germinal vesicle breakdown) and MII (metaphase II) after 24 hours of maturation. Bars with asterisk (\*) are different (GV) or bars with different letters indicate a statistical difference among the groups (MII). CTRL: control group (TCM199 plus FSH); AREG group (TCM 199 plus AREG); LH group (TCM199 plus LH); AREG/LH (TCM 199 plus AREG and LH); FSH/LH (TCM 199 plus FSH and LH). The concentrations used were described in the text above.....56

**Figure 6.** Cleavage and blastocyst rates and PLAC8 transcript abundance. A) The cleavage rate on Day 3 of *in vitro* culture; B) The blastocyst rate on day 7 (p=0.0431); C) The hatched blastocyst rate on Day 9; D) mRNA abundance of PLAC8 gene. The results were obtained from four replicates. Different letters above the bars indicate statistical difference.....57

**Figure 7.** The entire network formed with all genes differentially expressed in this work. The results were obtained from 5 replicates of *cumulus* cells samples.....**62**

# LISTA DE TABELAS

## Capítulo 2

<b>Table 1.</b> Definition and functions of genes from the selected assays used to perform transcript array by BioMark platform.....	<b>43</b>
<b>Table 2.</b> Sequence of primers used in the qPCR analyze. F: forward; R: reverse.....	<b>48</b>
<b>Table 3.</b> Percentage of GV, GVBD and MII at 9, 15 and 24 hours after in vitro maturation with FSH or AREG.....	<b>49</b>
<b>Table 4.</b> Genes differently expressed in the time course test at 9, 15 and/or 24 hours after in vitro maturation with FSH or AREG.....	<b>50</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADAM	Desintegrina e Metaloproteinase A
AREG	Ampirregulina
BTC	Betacelulina
cAMP	3'-5' Adenosina Monofosfato Cíclica
CDK	Cinase dependente de Ciclina
cGMP	Guanosina 3', 5'-Monofosfato Cíclica
CNP	Peptídeo Natriurético tipo C
COC	Complexo <i>cumulus</i> -oócito
COX2	Cicloxigenase 2
Cx	Conexina
EGF- <i>like</i>	Fator de Crescimento semelhante ao Epidermal
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidermal
EREG	Epirregulina
ERK1/2	Cinase Regulada por sinal extracelular 1/2
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GDP	Guanosina difosfato
GJ	GAP Junctions (junções comunicantes do tipo GAP)
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
GPCR	Receptor Acoplado à Proteína G
Grb2	Proteína ligada ao receptor do fator de crescimento 2
GTP	Guanosina trifosfato
GV	Vesícula Germinativa (estágio dictiado da prófase I)
GVBD	Quebra da Vesícula Germinativa
LH	Hormônio Luteinizante
LHR	Receptor do Hormônio Luteinizante (ou oficialmente denominado o gene LHCGR)
MAPK	Proteína Cinase Ativadora de Mitógeno
MAS	Esterol Ativado de Meiose
MEK	Família de cinases MAP/ERK
MII	Meiose II

MIV	Maturação <i>in vitro</i>
MPF	Fator Promotor da Maturação, da Meiose ou da Mitose
NPPA	Precursor do Peptídeo Natriurético tipo A (Atrial)
NPPB	Precursor do Peptídeo Natriurético tipo B (Brain)
NPPC	Precursor do Peptídeo Natriurético do tipo C
NPR2	Receptor do Peptídeo Natriurético tipo 2
P4	Progesterona
PDE	Fosfodiesterase
PGF2 $\alpha$	Prostaglandina F2 $\alpha$
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
PKA	Proteína cinase tipo A
PKC	Proteína cinase tipo C
PTGER2	Receptor de prostaglandina E2
PTX3	Pentraxina 3
SH2	Domínio de homologia 2 à Src
TACE	Enzima de Conversão do Fator de Necrose Tumoral Alfa

# SUMÁRIO

<b>PRÓLOGO.....</b>	<b>17</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>CAPÍTULO 1.....</b>	<b>21</b>
<b>1.MATURAÇÃO OOCITÁRIA.....</b>	<b>22</b>
<i>1.1. O papel das gonadotrofinas na maturação oocitária: do crescimento do folículo antral á ovulação.....</i>	<i>22</i>
<i>1.2. O uso dos peptídeos EGF-like na maturação in vitro.....</i>	<i>24</i>
<i>1.3. Regulação da retomada da meiosi: o Sistema NPPC-NPR2.....</i>	<i>26</i>
<b>2. HIPÓTESE.....</b>	<b>29</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
<b>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>30</b>
<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>36</b>
<i>Effects of pre-maturation with NPPC and in vitro maturation with different ligands on cumulus cells transcript abundance and bovine blastocyst production.....</i>	<i>37</i>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>37</b>
<b>BACKGROUND.....</b>	<b>39</b>
<b>METHODS.....</b>	<b>40</b>
<b>RESULTS.....</b>	<b>50</b>
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>57</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>64</b>
<b>REFERENCES.....</b>	<b>64</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>68</b>

## Prólogo

### Participação em eventos

2018-IRRS- *International Ruminants Reproduction Symposium*; setembro/2018- Foz do Iguaçu-PR

2018- II CURSO DE INVERNO DE FARMACOLOGIA E BIOTECNOLOGIA; Julho/2018- Botucatu-SP (Comissão Organizadora)

2018- I WORKSHOP FARMABIOTEC: *in vitro* embryo production; Maio/2018- Botucatu-SP

2018- V WORKSHOP DE TÉCNICAS EXPERIMENTAIS; abril/2018- Botucatu-SP

2018- VII SIMFARTEC- *Simpósio de Farmacologia e Biotecnologia*; março/2018- Botucatu-SP (Comissão Organizadora)

2017-SBTE- XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões; agosto/2017- Cabo de Santo Agostinho-PE

2017- WORKSHOP GIFT- *Como fazer um blastocisto?*; abril/2017- Botucatu-SP

### Resumos em Congressos

**2018- PRONUNCIATE, M.;** PIOLTINE, E.M.; GUILHERME, V.B.; FRANCHI, F.F.; FONTES, P.K.; NOGUEIRA, M.F.G. Transcripts abundance modulation by AREG and FSH treatments during the *in vitro* maturation of bovine *cumulus*-oocyte-complex. In: IRRS (International Ruminants Reproduction Symposium), Setembro/2018; Foz do Iguaçu/PR

**2018- PIOLTINE, E.M.;** SAWA, A.G.; ALMEIDA, A.M.; **PRONUNCIATE, M.;** FRANCHI, F.F.; NOGUEIRA, M.F.G. Gene expression related to the meiosis resumption after associated use of NPPC and rhFSH during *in vitro* prematuration of bovine *cumulus*-oocyte complexes. In IRRS (International Ruminants Reproduction Symposium), Setembro/2018; Foz do Iguaçu/PR

### Artigos Publicados

**2018-** Artificial Intelligence-based grading quality of bovine blastocyst digital images: Direct capture with juxtaposed lenses of SmartPhone camera and Stereomicroscope ocular lens. *Sensors*, 2018.

## INTRODUÇÃO

O Brasil detém o maior rebanho comercial bovino do mundo com mais de 218 milhões de cabeças em todo seu território (IBGE, 2017), número que supera a própria população do país (207 milhões em 2017) sendo ainda o maior exportador de carne bovina (IBGE, 2017). Além disso, é líder mundial na produção *in vitro* de embriões bovinos, responsável por 70% da produção mundial (Ereno, 2015). O programa de produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos começou em 1990, mas somente após 4 anos ocorreram os primeiros nascimentos (Mello, 2016). A PIVE é uma biotecnologia na qual se mimetiza um ou mais processos reprodutivos, tais como maturação e fertilização do oócito e a cultura de embriões por aproximadamente sete dias. Um dos principais processos limitantes para o sucesso dessa técnica é a maturação *in vitro* (MIV).

A maturação oocitária é definida como o processo pelo qual o oócito adquire a capacidade de suportar o desenvolvimento gradual até que o genoma embrionário seja ativado (Ferreira *et al.*, 2009). Assim, quando a maturação é insatisfatória há alterações no desenvolvimento, sobrevivência e implantação embrionária. Embora tenha havido avanços recentes na PIVE, os resultados desta técnica ainda são inferiores quando comparados com o processo *in vivo* (Farin *et al.*, 2007).

Durante a gestação de vacas, por volta do 72° a 82° dias, as oogônias iniciam a meiose I até a primeira parada da meiose no estágio de diplóteno ou vesícula germinativa da prófase I (GV-*germinal vesicle*; Richards 1980; van den Hurk R. Zhao 2005). Ao nascimento, todos os oócitos estão em prófase da primeira divisão meiótica e permanecem no estágio de GV até a retomada da meiose e sua progressão até a meiose II, o que caracteriza a maturação oocitária (Sun *et al.*, 2009). A retomada da meiose ocorre em resposta ao pico pré-ovulatório de LH (Edwards 1965). O estímulo hormonal ativa a via da proteína cinase ativadora de mitógeno –MAPK (Dekel *et al.*, 1981) e de outras como o fator promotor da maturação (MPF, conhecido como complexo proteico CDK/ciclina B; Wu *et al.*, 1997). Logo após, ocorre a quebra da vesícula germinativa (GVBD, *germinal vesicle break down*; Gordon 1994). Estudos sugerem que o LH, através das vias cAMP e proteínas cinases (PKA e PKC), induz a síntese de substâncias parácrinas tais como os fatores semelhantes ao de crescimento epidermal (EGF-*like*) e esterol ativador de meiose (MAS) para regular a GVBD dos oócitos (Sun *et al.* 2009).

*In vitro*, o isolamento do oócito do seu ambiente folicular desencadeia a retomada espontânea da meiose sem o estímulo gonadotrófico (Pincus e Enzmann, 1935; Franciosi

*et al.*, 2014). Este fato é baseado na incapacidade do oócito em manter a concentração de cAMP alta, o que previne a retomada da meiose (Dekel *et al.*, 1981; Vivarelli *et al.*, 1983; Aktas *et al.*, 1995; Mamo, 2011). O cAMP tem a função de segundo mensageiro e é sintetizado pelo oócito mediante um receptor acoplado à proteína-G e também é fornecido ao ooplasma por meio das comunicações tipo gap. A concentração intraocitária de cAMP é regulada por fosfodiesterases (PDE; Conti e Beavo, 2007; Franciosi, 2014), enzimas que degradam o cAMP. A principal PDE no oócito é a PDE3A, cuja atividade é inibida pela guanosina 3', 5'-monofosfato cíclico (cGMP; Tornell *et al.*, 1991; Norris *et al.*, 2009; Franciosi *et al.*, 2014).

Dados da literatura demonstram que essa limitação pode ser contornada com a regulação artificial da retomada da meiose através do aumento dos níveis de cAMP intraocitário (Luciano *et al.*, 2004; Zeng *et al.*, 2013). Existem duas abordagens: utilizar na MIV inibidores específicos de PDE para evitar a degradação e consequente queda das concentrações presentes de cAMP ou o cultivo com fármacos que aumentam a concentração de cAMP em COCs, tais como o forskolin ou dibutilil-cAMP (dbcAMP; Richani *et al.*, 2014).

Dentre os inibidores indiretos de PDE, podemos citar o precursor do peptídeo natriurético do tipo C (NPPC), sintetizado pelas células da granulosa (Zhang *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011). Quando ligado ao seu receptor nas células do cumulus (NPR2) estimula a síntese de cGMP. Este, quando transportado para o oócito pelas TZP e GJ inibe a PDE3A, dessa forma mantendo a parada meiótica (Richard *et al.*, 2014; Franciosi *et al.*, 2014).

Apesar da retomada espontânea da meiose, o processo *in vitro* necessita de fatores (hormônios, peptídeos, entre outros) que estimulem a maturação citoplasmática e nuclear de forma sincronizada. Assim, o uso de gonadotrofinas como o FSH se tornou comum, já que na maturação *in vitro*, as células da granulosa não estão presentes e as células do cumulus não respondem diretamente ao LH. Recentemente, têm-se aceito a ideia do uso de peptídeos EGF-like em substituição às gonadotrofinas, principalmente o AREG. Ele faz parte da cascata de sinalização *in vivo* promovida pelo pico pré-ovulatório de LH e quando ele se liga com seu receptor, presente nas células do cumulus, há o estímulo da ativação de genes de remodelagem da matriz extracelular, melhorando a expansão.

O ambiente folicular, garante ao oócito todo o suprimento e regulação endócrina para que este se desenvolva e adquira competência para os processos reprodutivos. Competência oocitária é definida como a capacidade do oócito em suportar os processos

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em seu conceito inicial, esse trabalho foi delineado para esclarecer a informação não consensual da presença de receptores de LH (LHR) nas células do *cumulus* e que sua expressão poderia ser induzida em algum momento da maturação *in vitro* utilizando o peptídeo ampirregulina (AREG), o que foi refutado pelos dados de expressão gênica. Esperávamos ainda que o perfil de expressão de genes relacionados a apoptose, metabolismo lipídico, retomada meiótica, entre outros fosse distinto entre AREG e FSH sendo isto corroborado pelos dados deste trabalho.

Como não houve expressão que indicasse em que horário o LHR é expresso nas células do *cumulus*, testamos sua eficácia na maturação e em associação com AREG ou FSH. As taxas de maturação para o LH sozinho, foram baixas e reforçam os dados da literatura. No entanto, quando utilizamos um sistema de pré-maturação (NPPC), o meio contendo apenas LH foi capaz de gerar embriões que eclodiram até o 9º dia de cultivo. Esses dados nos dão indício de que o LH tem capacidade de fazer com que o oócito conclua a maturação, ainda que de um modo mais lento e menos efetivo do que os demais ligantes testados.