



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

**UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS FOLICULARES OVARIANAS PARA O
APRIMORAMENTO DE TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA E PARA A
COMPREENSÃO DA FALÊNCIA OVARIANA PRECOCE**

Aluno: M.Sc. Diego Duarte Alcoba

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ilma Simoni Brum da Silva

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Helena von Eye Corleta

Porto Alegre, junho de 2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

**UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS FOLICULARES OVARIANAS PARA O
APRIMORAMENTO DE TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA E PARA A
COMPREENSÃO DA FALÊNCIA OVARIANA PRECOCE**

Aluno: M.Sc. Diego Duarte Alcoba

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ilma Simoni Brum da Silva

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Helena von Eye Corleta

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas: Fisiologia.

Porto Alegre, junho de 2016

AGRADECIMENTOS

Em alemão a palavra orientadora é traduzida como “mãe doutora” (*Doktormutter*). Meus maiores agradecimentos são para as minhas “mães doutoras”, que foram, no sentido literal da palavra, mestres e mães para mim ao longo do meu Doutorado. Obrigado Prof^a. Dr^a. Ilma Simoni Brum e Prof^a. Dr^a. Helena von Eye Corleta pelas palavras de apoio e pelos gestos de acolhimento, sempre que precisei. Obrigado pela confiança depositada em mim, pela presença e orientação constantes e, principalmente, por me permitirem traçar e desenvolver as minhas metas e anseios.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, o qual me permitiu grande crescimento acadêmico, profissional e pessoal.

Aos meus eternos Mestres que me iniciaram na caminhada acadêmica e profissional: Dr^a. Anita Mylius Pimentel, Prof. Dr. Alexandre Tavares Duarte de Oliveira e Prof^a. Elisabeth de Castro. Obrigado pelos ensinamentos e pelo laço de amizade que foi criado.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral da UFRGS; em especial ao Gustavo Dias Ferreira, pelos ensinamentos e pela descontração no Laboratório, e às minhas queridas Júlia Schneider, Patrícia Martiny e Amanda Machado, com as quais pude construir um verdadeiro laço de amizade. Obrigado pela ajuda nos experimentos e, principalmente, pela companhia.

Aos meus colegas do Laboratório de Genética da Reprodução (Heidelberg) Bárbara Bug, Birgitta Messmer e Helen Kühn pelo caloroso acolhimento e carinho.

Aos meus amigos Andréia Garcia, David Kvitko e Mariana Rosa, pelas inúmeras acolhidas e momentos de descontração que me permitiram seguir adiante.

Ao meu querido Stefan, pelo companheirismo nesse momento e pela paciência constante.

Por fim agradeço aos corresponsáveis por todas as minhas conquistas: minha mãe, Sandra Souza Duarte, meu pai, Syllas Alcoba Ruiz Júnior, e meu irmão, Rafael Duarte Alcoba. Obrigado por estarem sempre ao meu lado e pelos valores que me foram transmitidos.

RESUMO

A infertilidade é uma condição clínica que acomete até 15% dos casais em idade reprodutiva. Como forma de tratamento para essa parcela da população a Medicina Reprodutiva dispõe de várias técnicas de Reprodução Assistida que visam auxiliar o casal na obtenção da gestação. O primeiro passo para obtenção de sucesso na Medicina Reprodutiva é o correto diagnóstico da infertilidade e, do ponto de vista didático, as causas de infertilidade podem ser classificadas em: feminina, masculina, mista ou desconhecida. A causa feminina de infertilidade apresenta como importante fator o ovariano, representado, principalmente, por alterações no processo de maturação do oócito e/ou no processo de foliculogênese.

Com relação à maturação do oócito, um dos possíveis tratamentos oferecidos pela Medicina Reprodutiva é a aplicação da técnica de maturação *in vitro* (MIV). Infelizmente a MIV não apresenta resultados animadores, e um dos motivos é a falta de um método adequado de seleção dos gametas de humanos que podem ser destinados à ela. No entanto, várias técnicas de seleção de oócticos já foram descritas para espécies animais; dentre elas destaca-se a coloração dos complexos *cumuli*-oócitos com o corante Azul Cresil Brilhante (BCB). A sua aplicação na espécie humana permanece com ressalvas, uma vez que a comunidade científica preocupa-se com os possíveis efeitos tóxicos dessa substância. Nesta Tese, conseguimos demonstrar, através da avaliação de ensaios de viabilidade e de proliferação celular, e da expressão gênica e proteica, a inocuidade dessa substância para o modelo de cultura primária de células foliculares ovarianas luteinizadas, indicando que o protocolo de coloração com BCB é seguro para a espécie

humana. Adicionalmente, conseguimos caracterizar e padronizar o cultivo dessas células, que são amplamente utilizadas em estudos na área da Medicina Reprodutiva.

Com relação ao outro fator ovariano de infertilidade (o processo de foliculogênese), sabe-se que a depleção acelerada dos folículos ovarianos pode provocar falência ovariana precoce (FOP), uma condição clínica que acomete até 1% das mulheres em idade reprodutiva e leva à infertilidade. Uma das causas da FOP é a alteração no gene *Fragile X Mental Retardation 1 (FMR1)* e consequentemente em sua proteína (FMRP). Muito do conhecimento do controle dessa proteína provem de experimentos em neurônios, onde o seu controle já foi elucidado. Nesta Tese, conseguimos demonstrar que o controle dessa proteína nas células ovarianas de humanos é similar ao controle que ocorre nos neurônios, envolvendo a via de sinalização S6K.

Palavras-chave: infertilidade; medicina reprodutiva; reprodução assistida; células foliculares ovarianas; maturação oocitária; foliculogênese.

ABSTRACT

Infertility is a clinical condition that affects up to 15% of couples of reproductive age. Reproductive medicine applies many assisted reproductive technologies (ARTs) in order to help them to achieve pregnancy. The first step for infertility treatment success is the correct infertility diagnosis, which is divided into four categories: female, male, mixed or unknown. Female infertility is chiefly represented by ovarian dysfunctions, which are generally related to oocyte maturation and/or folliculogenesis.

With regard to oocyte maturation, *in vitro* oocyte maturation (IVM) is one ART that can be applied but, unfortunately, nowadays it does not present suitable results, since we do not have an effective method of selecting competent human oocytes. On the other hand, in animal reproduction brilliant cresyl blue (BCB) staining has already been described as an appropriate method for oocyte selection. However its clinical applicability to humans is some way off, owing to concerns about its safety. In this thesis we have demonstrated (through many cellular viability and proliferation assays and gene and protein expression), that BCB staining, applying the correct protocol, seems to be safe for use in humans (using the primary culture of human ovarian follicular cells as an experimental model). Additionally, we have characterized and standardized the primary culture of human ovarian follicular cells, and this experimental model is widely applied in reproductive medicine experiments.

With regard to folliculogenesis, it is well known that premature ovarian failure/insufficiency (POF/POI) is one condition that can be caused by follicle depletion (when folliculogenesis occurs too fast). This condition affects about 1% of females of

reproductive age, causing infertility. Genetic alterations, such as in the *fragile X mental retardation 1 (FMR1)* gene and its protein FMRP, are considered as one cause of POF/POI. Most of our knowledge about FMRP cellular control comes from studies on neurons, and in these cells we have a clue about its control. In this thesis, we have shown that FMRP control on human granulosa cells is similar to its control on neurons, and this involves the S6K pathway.

Keywords: infertility; reproductive medicine; assisted reproductive technologies; ovarian follicular cells; oocyte maturation; folliculogenesis.

SUMÁRIO

1. Lista de abreviaturas e de siglas	10
1.1 Lista de genes citados	13
2. Lista de tabelas	15
3. Lista de figuras	16
4. Introdução	18
4.1 Fisiologia da Reprodução & Infertilidade	18
4.2 Maturação oocitária	20
4.2.1 Métodos de seleção de oócitos competentes	26
4.3 Foliculogênese	51
4.3.1 Foliculogênese & Infertilidade	56
4.4 Métodos de avaliação de células foliculares	65
4.4.1 Ensaios de citotoxicidade	65
4.4.2 Avaliação da expressão gênica	69
5. Objetivos Gerais e Específicos	84
6. Hipóteses	85
7. Resultados	86
7.1 – Artigo 1	86
7.2 – Artigo 2	88
7.3 – Artigo 3	117
7.4 – Artigo 4	124
5.5 – Artigo 5	147
8. Discussão conclusiva	173

9. Perspectivas	178
10. Referências bibliográficas	181
11. Anexos	198

1. Lista de abreviaturas e de siglas

CFA: *antral follicle count* (contagem de folículos antrais)

AMH: *anti-mullerian hormone* (hormônio anti-mulleriano)

BCB: *Brilliant Cresyl Blue* (azul cresil brilhante)

°C: graus Celsius

CC: *cumulus cells* (células do *cumulus oophorus*)

CCO: complexo *cumulus*-oócito

cDNA: *complementary DNA* (DNA complementar)

cfDNA: *cell-free DNA* (DNA livre)

CO₂: dióxido de carbono

CP: corpúsculo polar

Cp: *crossing point* (ciclo de quantificação)

Cq: *quantification cycle* (ciclo de quantificação)

Ct: *threshold cycle* (ciclo de quantificação)

CV: *coefficient of variation* (coeficiente de variação)

DPBS: Dulbecco's PBS

DOR: *diminished ovarian reserve* (diminuição da reserva ovariana)

FIV: fertilização *in vitro*

FOP: falência ovariana precoce

FSH: *follicle stimulating hormone* (hormônio folículo estimulante)

FXPOI: insuficiência ovariana precoce associada ao X frágil

GC: *granulosa cells* (células da granulosa)

GSH: glutationa citoplasmática

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HMV: Hospital Moinhos de Vento

ICSI: *Intracytoplasmic sperm injection* (Injeção intracitoplasmática de espermatozoide)

IOP: insuficiência ovariana precoce

KSOM: *potassium simplex optimized medium*

LaBiMET: Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral

LaGOM: Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular

LH: *luteinizing hormone* (hormônio luteinizante)

NR: normo respondedora

NRU: *neutral red uptake*

M: estabilidade de expressão gênica

MFC: *maximum fold change*

MI: metáfase I

MII: metáfase II

MIV: maturação *in vitro*

mDPBS: *modified DPBS* (DPBS modificado)

mRNA: *messenger* RNA (RNA mensageiro)

MR: má respondedora

mtDNA: DNA mitocondrial

MTT: 3-(4, 5-dimetiltiazol-2)-2, 5-brometo de difeniltetrazólio

PBS: *phosphate buffered saline*

PCR: *polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)

PI: prófase I

PM: placa metafásica

qPCR: *real time* PCR (PCR em tempo real)

QVG: quebra da vesícula germinativa

RES: ensaio de resazurina

RT: *reverse transcription* (transcrição reversa)

RT-qPCR: reação em cadeia da polimerase em tempo real a partir de transcrição reversa

RA: Reprodução Assistida

SRB: Sulforrodamina B

SOP: Síndrome do Ovário Policístico

SXF: Síndrome do X frágil

T_m: *melting curve* (curva de melting/curva de dissociação)

UTR: *untranslated region*

VG: vesícula germinativa

VN: vermelho neutro

1.1 Lista dos genes citados

ANGPTL4: angiopoietin-like 4

AKT: serine/threonine-protein kinase

ATP1A1: ATPase Na⁺/K⁺ transporting alpha 1 polypeptide

B4GAL TI: UDP-galactose:N-acetylglucosamine beta-1,4-galactosyltransferase I

BMP15: bone morphogenic protein 15

CIS: complement component 1

CTSB: cathepsin B

CTSK: cathepsin K

CTSS: cathepsin S

CTSZ: cathepsin Z

COX1: cytochrome c oxidase subunit 1

EEF1A1: eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1

FGF2: fibroblast growth factor 2

FMR1: fragile X mental retardation 1

FSHR: follicle-stimulation hormone receptor

FST: follistatin

G6PDH: glucose 6 phosphate dehydrogenase

GDF9: growth differentiation factor 9

GSTA2: glutathione S-transferase alpha 2

HAS2: hyaluronan synthase 2

IGFBP3: insulin-like-growth factor binding protein 3

IGFBP5: insulin-like-growth factor binding protein 5

IL18R1: interleukin-18 receptor 1

LEPR: leptin receptor

MAPK: mitogen-activated protein kinase

MSX1: Msh homeobox 1

NASP: nuclear autoantigenic sperm

mTOR: mammalian target of rapamycin

PI3K: phosphoinositide 3-kinase

PIK3R1: phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1

PR: progesterone receptor

PTTG1: pituitary tumor-transforming 1

SERPINA1: serpin peptidase inhibitor, clade A member

TGFBR3: transforming growth factor β receptor 3

VCAN: versican

2. Lista de tabelas

Tabela 1 – Variação do protocolo de aplicação do BCB entre espécies.

Tabela 2 – Comparação entre a composição química da solução salina utilizada nas técnicas de Reprodução Assistida.

Tabela 3 – Domínios de ligação aos mRNA presentes na FMRP.

3. Lista de Figuras

Figura 1 – Sincronia entre os processos de foliculogênese (acima) e de maturação do oócito (abaixo).

Figura 2 – Processo de maturação de oócitos de humanos.

Figura 3 – Número de publicações na plataforma *PubMed* ao procurar pelo tema “*oocyte in vitro maturation*”.

Figura 4 – Ilustração da unidade funcional do ovário: o folículo ovariano.

Figura 5 – Relação entre a atividade (A) e a atividade específica (B) da enzima G6PDH de acordo com o diâmetro de oócitos de murinos.

Figura 6 – Princípio teórico de seleção de oócitos de mamíferos através da utilização do corante BCB.

Figura 7 – Observação microscópica de oócitos de humanos após exposição ao corante BCB.

Figura 8 – Foliculogênese: alterações morfológicas e moleculares que ocorrem nas células foliculares

Figura 9 – Ilustração das projeções transzonais que permitem a comunicação das células foliculares com o oócito.

Figura 10 – Localização cromossômica dos possíveis genes relacionados com a insuficiência ovariana precoce.

Figura 11 – Classificação alélica de acordo com o número de repetições CGG na região promotora do gene *FMR1*.

Figura 12 – Mecanismo de ação da FMRP.

Figura 13 – Estrutura linear (em cima) e tridimensional (embaixo) da FMRP, ressaltando seus domínios de ligação com mRNA.

Figura 14 – Avaliação da densidade celular através da aplicação do corante azul de Tripán.

Figura 15 – Princípio molecular de funcionamento do MTT.

Figura 16 – *Two-step* RT-qPCR.

Figura 17 – Princípio molecular de funcionamento das sondas *TaqMan*[®].

Figura 18 – Princípio molecular de funcionamento das sondas SYBR[®] *Green*.

Figura 19 – Estratégias de normalização para experimentos com RT-qPCR (as setas negras indicam as estratégias que podem ser utilizadas).

4. Introdução

4.1 Fisiologia da Reprodução & Infertilidade

A infertilidade apresenta implicações econômicas e sociais bastante significativas (UYAR A et al., 2013), uma vez que o perfil de fertilidade da população diminuiu nas últimas décadas, tornando-se um tema de grande repercussão para a sociedade (SPIRA e MULTIGNER, 1998). A estimativa mundial é de que 8 a 15% dos casais em idade reprodutiva apresentem algum fator de infertilidade. Em nosso País, estima-se que mais de 278 mil casais apresentem dificuldade em gerar prole (http://portal.saude.gov.br/portal/sas/mac/area.cfm?id_area=832), embora estes dados estejam, provavelmente, subestimados. Como forma de tratamento da infertilidade, a Medicina Reprodutiva, através de técnicas de reprodução assistida (RA), pode permitir ao casal infértil a obtenção da gestação. No Brasil, entre os anos de 1990 e 2011, aproximadamente 51 mil crianças (50.775) nasceram como fruto das técnicas de RA (*Red Latinoamericana de Reproducción Asistida*). Contudo, apesar do grande avanço da Medicina Reprodutiva nas últimas décadas, o insucesso dos tratamentos de infertilidade ainda é muito presente (DUMESIC D, 2015), demonstrando a importância de pesquisas nessa área a fim de elucidar a fisiologia da reprodução e de aprimorar as técnicas de RA.

As causas de infertilidade podem ser classificadas, didaticamente, em masculinas, femininas, mistas ou desconhecidas - chamada de infertilidade sem causa aparente (DZIK A et al., 2010). Dentre essas, destaco a causa feminina, uma vez que a qualidade do gameta feminino, o ócito, é o principal fator para o sucesso das técnicas de RA, sendo

considerado o maior determinante para as taxas de gestação (JIANG J et al. 2010). Embora a gestação seja determinada por uma série de fatores como a qualidade do espermatozoide e do endométrio, acredita-se que o oócito seja o fator mais importante para o resultado clínico de gestação (LI Y et al., 2014).

É notável que as mulheres estão cada vez mais postergando a maternidade e, como consequência, observamos maior dificuldade na obtenção da gestação, relacionado ao envelhecimento ovariano fisiológico e à diminuição da qualidade do gameta feminino (SUNKARA S et al., 2012). No ovário de mamíferos, os folículos ovarianos, estruturas funcionais, encontram-se em estado de dormência e a depleção desses folículos, com o passar dos anos, irá provocar a menopausa, um processo fisiológico (REDDY P et al., 2008).

Dentre as causas femininas de infertilidade, destaca-se o fator ovariano, representado pelos distúrbios no processo de ovulação devido a alterações na maturação do oócito e/ou distúrbios no processo da foliculogênese.

A foliculogênese e a maturação do oócito ocorrem de forma sincronizada, devido à constante troca de moléculas entre o oócito e as células somáticas ao seu redor, no sentido bidirecional (DUMESIC D, 2015). Ambos os processos estão ilustrados na Figura 1 e serão descritos a seguir.

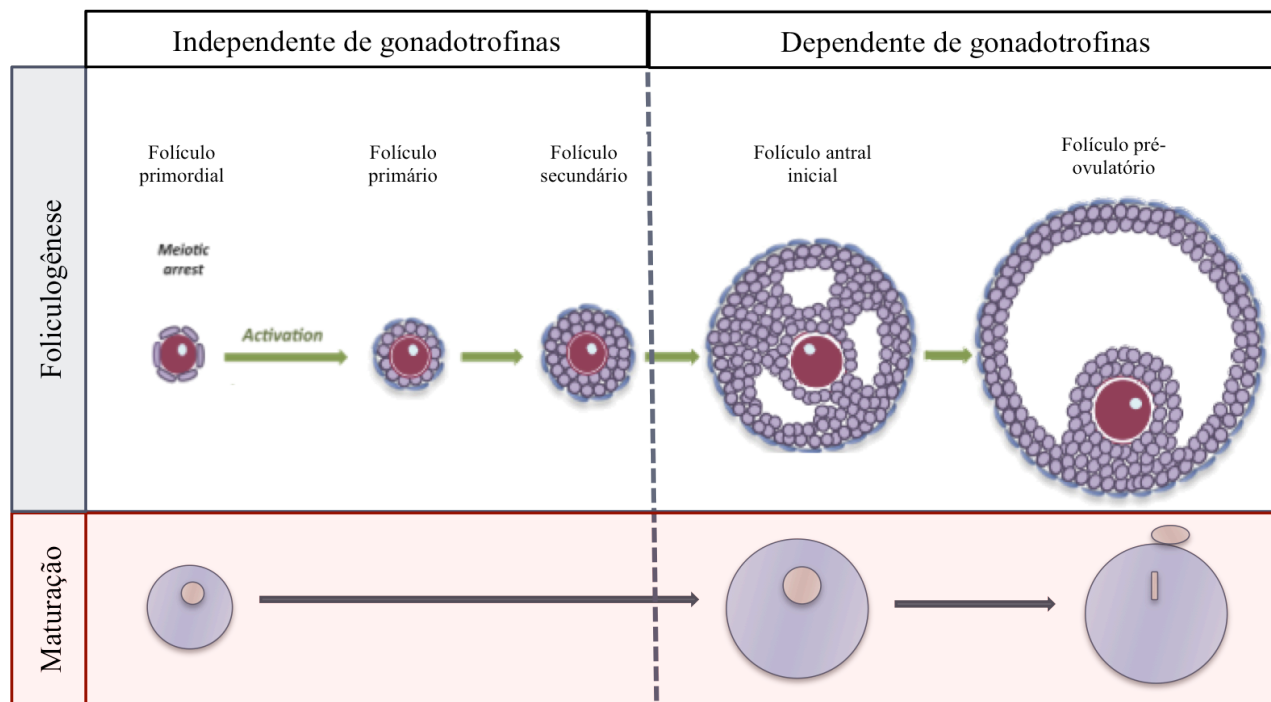


Figura 1 – Sincronia entre os processos de foliculogênese (acima) e de maturação do oócito (abaixo). Adaptado de SÁNCHEZ F *et al.*, 2012.

4.2 Maturação oocitária

O processo de maturação oocitária está intrinsecamente relacionado à primeira divisão meiótica do gameta, a qual foi interrompida no momento do nascimento, sendo retomada e concluída (processo chamado de maturação nuclear) após a puberdade, devido às oscilações hormonais, que culminam na ovulação de um oócito maduro a cada ciclo menstrual (DEKEL N, 1995).

A maturação do oócito ocorre fisiologicamente após o pico de hormônio luteinizante (LH), quando o oócito retoma a meiose e passa pelas modificações finais que o tornam apto a ser fecundado (ADONA P *et al.*, 2008). O início da meiose dos gametas femininos de humanos ocorre durante o período fetal, de forma incompleta, pois o oócito cessa o seu processo de divisão celular (parada da meiose em prófase I -

PI), havendo retomada da meiose apenas após a puberdade, com a estimulação do LH. Até a puberdade, o material genético dos oócitos é contido dentro de uma estrutura denominada vesícula germinativa (VG). À medida que se iniciam as oscilações das gonadotrofinas (hormônio folículo estimulante, FSH, e LH) ocorre a retomada da meiose dos oócitos que estavam no estágio de PI. A retomada da meiose é caracterizada pela quebra da vesícula germinativa (QVG) seguida da formação da placa metafásica (PM), indicando que o oócito completou a fase de PI e iniciou a fase de metáfase I (MI). Apesar de haver retomado a meiose, esse oócito ainda é considerado imaturo, pois não concluiu a primeira divisão do seu material genético. A seguir, coordenado pelas gonadotrofinas, o oócito finaliza a sua primeira divisão meiótica, extruindo metade do seu conteúdo genético em estrutura denominada de corpúsculo polar (CP) e inicia a segunda meiose. Esta terá seu processo divisional interrompido em metáfase II (MII) até que ocorra a fecundação. A sequência de eventos que inicia com a QVG e culmina na extrusão do CP torna o oócito apto a ser fecundado, ou seja, um oócito maduro. Todas essas etapas de divisão do material genético são denominadas coletivamente de maturação nuclear oocitária (DEKEL N, 1995; CHA e CHIAN, 1998; SATHANANTHAN A et al., 2000; CHIAN R et al., 2004a; ADONA P et al., 2008; XU X et al., 2015). A Figura 2, a seguir, ilustra o processo de maturação do oócito.

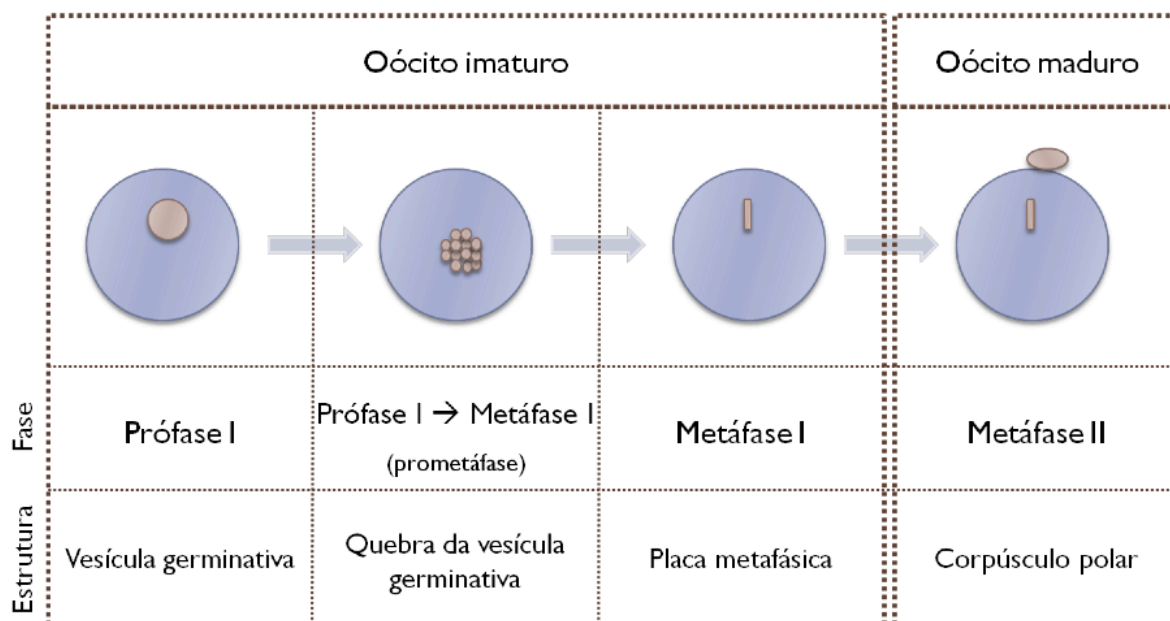


Figura 2 – Processo de maturação de oócitos de humanos.

O processo de maturação do oócito ocorre *in vivo* de acordo com o ciclo menstrual e, a cada mês, geralmente, apenas um oócito torna-se maduro – somente esse (que sofreu o processo de maturação – concluiu sua primeira divisão meiótica) poderá ser fecundado (YANG Y et al., 2009). A quantidade de oócitos maduros recuperados durante ciclos de RA pode, no entanto, ser aumentada com a indução da ovulação utilizando gonadotrofinas exógenas e indutores da maturação oocitária (LE DU A et al., 2005), a fim de otimizar as técnicas de RA.

A hiperestimulação ovariana controlada visa amplificar os picos de gonadotrofinas que ocorrem durante os ciclos naturais da mulher (OLA S et al., 2012), permitindo obtenção de número adequado de gametas para as técnicas de RA. No entanto, mesmo havendo estimulação hormonal, em muitas situações, gametas imaturos são recuperados (EDIRISINGHE W et al., 1997; JAROUDI K et al., 1997; LIU J et al., 1997), devido à assincronia entre o crescimento e a maturação dos oócitos (CHA e CHIAN, 1998; KIM B et al., 2000). Além disso, o tratamento hormonal só pode ser oferecido para

pacientes pós-púberes, além de haver contraindicação para pacientes portadoras da Síndrome do Ovário Policístico (SOP), pela possibilidade do desenvolvimento de um quadro grave denominado hiperestímulo ovariano (CHIAN R et al., 2004b; REVEL A et al., 2009; AGDI M et al., 2010). Adicionalmente, a indução da ovulação é contraindicada em casos oncológicos com neoplasias hormônio dependentes e naquelas situações em que a quimioterapia precisa ser administrada o mais breve possível (REVEL A et al., 2009; HUANG J et al., 2010; SONG Y et al., 2010).

Dessa forma, em algumas situações, a recuperação de quantidade adequada de oócitos maturados *in vivo* é difícil, sendo necessário realizar a maturação *in vitro* (MIV) do oócito. A MIV tem por objetivo maturar, em ambiente artificial, o oócito recuperado ainda imaturo (DZIK A et al., 2010) e é uma técnica de RA bastante promissora e em ascensão, pois pode aumentar as taxas de gestação em muitos casos (EDIRISINGHE W et al., 1997; JAROUDI K et al., 1997; LIU J et al., 1997). Corroborando o crescente interesse da comunidade científica sobre o tema, podemos observar aumento do número de publicações referentes à MIV ao longo dos anos a partir de sua primeira descrição, como representado na Figura 3.

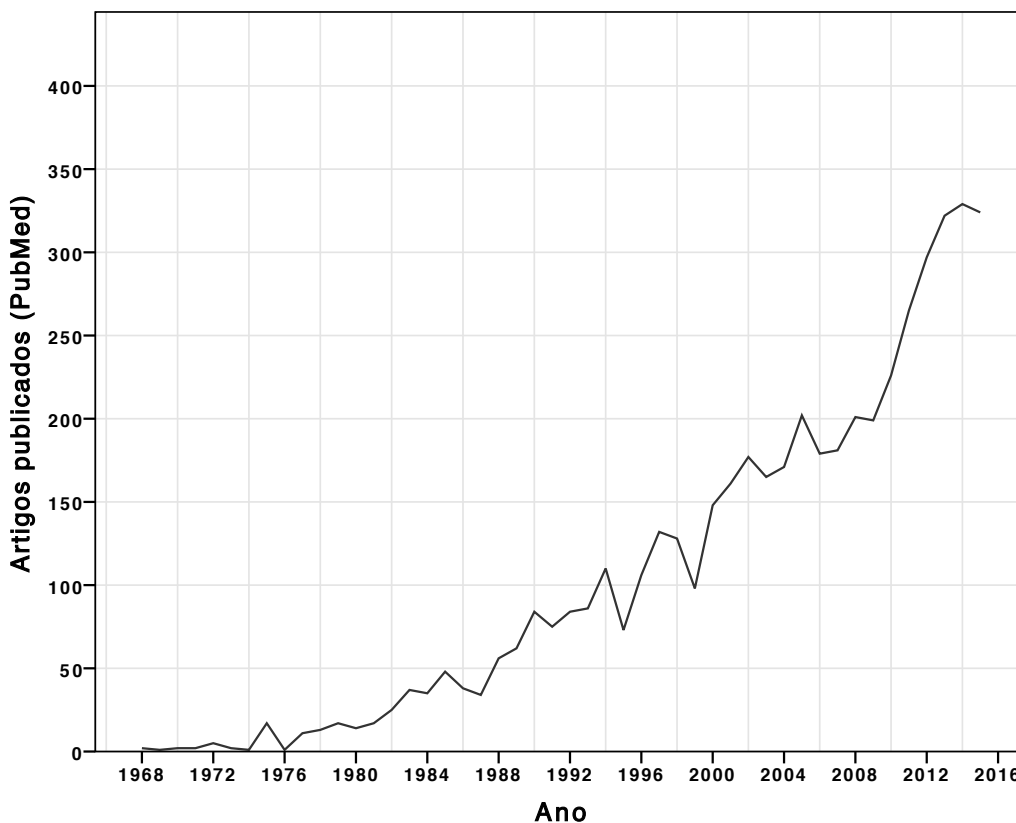


Figura 3 – Número de publicações na plataforma *PubMed* ao procurar pelo tema “*oocyte in vitro maturation*”.

Apesar das inúmeras aplicações da MIV, a heterogeneidade dos gametas femininos recuperados das pacientes é um grande obstáculo para o seu sucesso. Isso reflete nos resultados da taxa de maturação nuclear referentes a esta técnica, os quais são bastante divergentes entre os autores e variam de 36,5% (BEN-AMI et al., 2011) até 72,5% (HUANG J et al., 2010). Além disso, a competência dos oócitos maturados *in vivo* é ainda superior à observada em seus homólogos maturados *in vitro* (WU Y et al., 2007), indicando que não apenas a MIV, mas também possivelmente o método de seleção dos oócitos destinados a essa técnica, apresentam características subótimas.

A heterogeneidade dos oócitos imaturos recuperados está relacionada com o método de recuperação dos gametas (ALM H et al., 2005; GOOVAERTS I et al., 2010),

com a idade da fêmea (PUJOL M et al., 2004; PAWLAK P et al., 2011b), entre inúmeros outros fatores (OPIELA J et al., 2008). Essa disparidade na qualidade dos oócitos recuperados pode ser explicada, em parte, pela existência de um evento chamado de crescimento, capacitação oocitária ou competência biológica do gameta, processo no qual o oócito sofre diversas modificações que o tornarão competente para passar pelo processo de maturação e, posteriormente, formar um embrião (HYTTEL P et al., 1997; RUVOLO G et al., 2013). Dessa forma, até mesmo em uma coorte de folículos antrais encontramos oócitos que já sofreram o processo de capacitação/crescimento (*fully grown*) e, conseqüentemente, são adequados para MIV, e oócitos em estágio de crescimento (*growing*), ou seja, que ainda não são competentes (deveriam ser destinados para outro procedimento). Dessa forma, um dos desafios da Medicina Reprodutiva é estabelecer uma técnica que permita a seleção de um grupo de oócitos homogêneo, que já tenha passado pelo processo de crescimento/capacitação (AZARI-DOLATABAD N et al., 2016), pois uma vez que a falha dos oócitos recuperados em gerar blastocistos pode estar relacionada com a baixa qualidade do oócito recuperado (ALM H et al., 2005), a detecção dos oócitos competentes é essencial para garantir sucesso nas técnicas de MIV e de FIV (ISHIZAKI C et al., 2009).

O desenvolvimento de uma técnica eficaz de seleção de gametas femininos competentes a serem utilizados para as técnicas de RA é de suma importância - sua necessidade foi equiparada ao estabelecimento da injeção intracitoplasmática de espermatozoide - ICSI (MOHAMMADI-SANGCHESHMEH A et al., 2011). Torna-se mais evidente a importância das técnicas de seleção de oócitos se levarmos em conta países em que, por questões político/religiosas, nem todos os gametas coletados das pacientes podem ser fertilizados, como na Itália, onde apenas 1 a 3 oócitos são selecionados para fertilização (EKART J et al., 2013). Além disso, para prevenir gestações múltiplas, a

transferência única de embrião (*single embryo transfer*) está sendo preconizada (PAPLER T et al., 2015). No entanto, a sua utilização encontra resistência pelo fato de ainda não haver um método acurado e eficaz de seleção dos gametas e dos embriões. Dessa forma, inúmeras pesquisas visando identificar o melhor oócito e o melhor espermatozoide, a fim de aumentar o potencial de implantação do embrião, estão sendo desenvolvidas (RUVOLO G et al., 2013).

4.2.1 Métodos de seleção de oócitos competentes

A seleção de oócitos que apresentem potencial para desenvolvimento *in vitro* (melhor capacidade para MIV – oócitos capacitados) parece ser a chave para a obtenção de sucesso nas tecnologias de RA que envolvem MIV (GOOVAERTS I et al., 2010; BOLS J et al., 2012). Adicionalmente, o uso de métodos eficazes de seleção de oócitos permitiria a redução do número de gametas a serem fertilizados e de embriões produzidos (RUVOLO G et al., 2013).

Idealmente, o método de seleção oocitária deveria cumprir alguns pré-requisitos: ser simples e rápido, de baixo custo e de alta confiabilidade e, acima de tudo, não ser tóxico nem para o oócito nem para as células foliculares que o circundam (GOOVAERTS I et al., 2010; BOLS J et al., 2012). Infelizmente, no momento, nenhuma técnica de seleção de oócitos reúne todos esses pré-requisitos (TORNER H et al., 2008; GOOVAERTS I et al., 2010); além disso, existem poucos marcadores não invasivos para selecionar os oócitos mais adequados à MIV (GOOVAERTS I et al., 2010; BOLS J et al., 2012). A maior dificuldade no estabelecimento de um método de seleção de uma coorte homogênea de oócitos competentes está baseada no fato de que o ambiente ovariano é bastante

influenciado por fatores externos, como tipo de estimulação ovariana, alimentação, hábitos de saúde, condição de cultivo dos gametas/embriões, etc. (OLA S et al., 2012).

Dentre as técnicas de seleção de oócitos descritas como aplicáveis (ou com possível aplicação clínica futura) encontram-se a avaliação morfológica do complexo *cumulus*-oócito (CCO), a quantificação de substâncias no líquido folicular puncionado, assim como a observação de elementos químicos no meio de cultura dos oócitos, a aferição da qualidade das células foliculares e a avaliação do perfil bioquímico do oócito através da aplicação de corantes (GOOVAERTS I et al., 2010; OLA S et al., 2012).

A seleção dos oócitos de acordo com a morfologia do CCO (seleção morfológica) é a técnica mais empregada atualmente e é considerado método rápido e não invasivo (OLA S et al., 2012). No entanto, um grande número de fatores determinantes da qualidade do oócito (como transcrição gênica, tradução proteica, etc.) não é determinado através dessa avaliação (GOOVAERTS I et al., 2010). Além disso, a seleção morfológica é uma aferição bastante subjetiva, necessitando avanços no processo de seleção dos gametas (MOTA G et al., 2010). A falta de eficácia desse método pode ser observada pelo fato de que alguns oócitos com morfologia normal (selecionados como adequados através da seleção morfológica) encontram-se em estado de degeneração (MANJUNATHA B et al., 2007). Cabe salientar que a competência biológica dos gametas não está relacionada diretamente com nenhum parâmetro morfológico. Dessa forma, torna-se de extrema importância a necessidade de utilizar outras técnicas para selecionar os gametas competentes (RUVOLO G et al., 2013).

A avaliação do líquido folicular, como método de indicação do melhor gameta, baseia-se no fato de que o fluido folicular está envolvido na maturação, no crescimento, e na gradual aquisição da competência do oócito. Adicionalmente, o líquido folicular é um subproduto das técnicas de RA, podendo ser utilizado sem interferência sobre o

gameta, sendo, portanto, considerado método não invasivo de seleção de oócitos (SCALICI E et al., 2014). Apesar de não invasiva, a avaliação dos componentes presentes no líquido folicular puncionado apresenta grande variabilidade, uma vez que, juntamente com o líquido folicular, volume variável de sangue é recuperado; do ponto de vista metodológico não temos como quantificar esse volume e, conseqüentemente, não temos como mensurar o quanto os elementos do líquido folicular foram diluídos no sangue (GOOVAERTS I et al., 2010). Adicionalmente, não temos, até o presente momento, o conhecimento completo de quais citocinas e/ou fatores de crescimento (substâncias alvos a serem mensuradas) são as mais relevantes para o desenvolvimento do folículo (DUMESIC D et al., 2015). Portanto, falta-nos ainda informação de qual molécula deve ser alvo de pesquisa no líquido folicular. Atualmente foi proposta a dosagem de ácidos biliares, uma vez que ocorre a formação local dessa substância pelas células foliculares - autores demonstraram correlação entre a concentração de ácidos biliares e a divisão e a fragmentação dos blastômeros. No entanto, foi ressaltada pelos autores a dificuldade da técnica pela presença de traços de sangue na amostra (NAGY R et al., 2015). Outra possibilidade de molécula alvo indicada foi a avaliação de DNA livre (cfDNA – fragmentos de DNA), que, no líquido folicular, é originado, principalmente, da apoptose das células foliculares. Foi demonstrado que quanto maior a concentração de cfDNA no líquido folicular, maior é o grau de fragmentação do embrião, menores são as taxas de formação de blastocisto e de qualidade do embrião (SCALICI E et al., 2014). Novamente a “presença de sangue” foi descrita como viés. Dessa forma, apesar do caráter inovador e de alguns resultados otimistas, a avaliação do líquido folicular como método de indicação da qualidade oocitária ainda não apresenta aplicabilidade clínica (DUMESIC D et al., 2015).

Uma técnica complementar à avaliação morfológica é a aferição molecular e funcional das células foliculares – através de seu transcriptoma e/ou de seu metaboloma, por exemplo (TANGHE S et al., 2002). Tais células somáticas estão distribuídas na parede do folículo ovariano (células murais da granulosa - GC) ou próximas do gameta feminino (células do *cumulus oophorus* - CC). Nos casos de tratamento de infertilidade em que a ICSI é aplicada, essas células somáticas são coletadas e descartadas, visto que não apresentam aplicabilidade para tal técnica (WINTERHAGER E et al., 2015). Uma vez que essas células estão no mesmo microambiente que o gameta feminino, é aceitável afirmar que existe relação entre a qualidade dessas células somáticas e a qualidade do oócito. Por conseguinte, é possível realizar um *screening* de potenciais biomarcadores nas células foliculares a fim de prever qual oócito apresenta maior potencial de desenvolvimento (FRAGOULI E et al., 2014; Li Y et al., 2014; PAPLER T et al., 2015). A Figura 4, a seguir, ilustra o folículo ovariano, demonstrando o microambiente que é compartilhado entre o oócito e as células somáticas que se encontram ao seu redor.

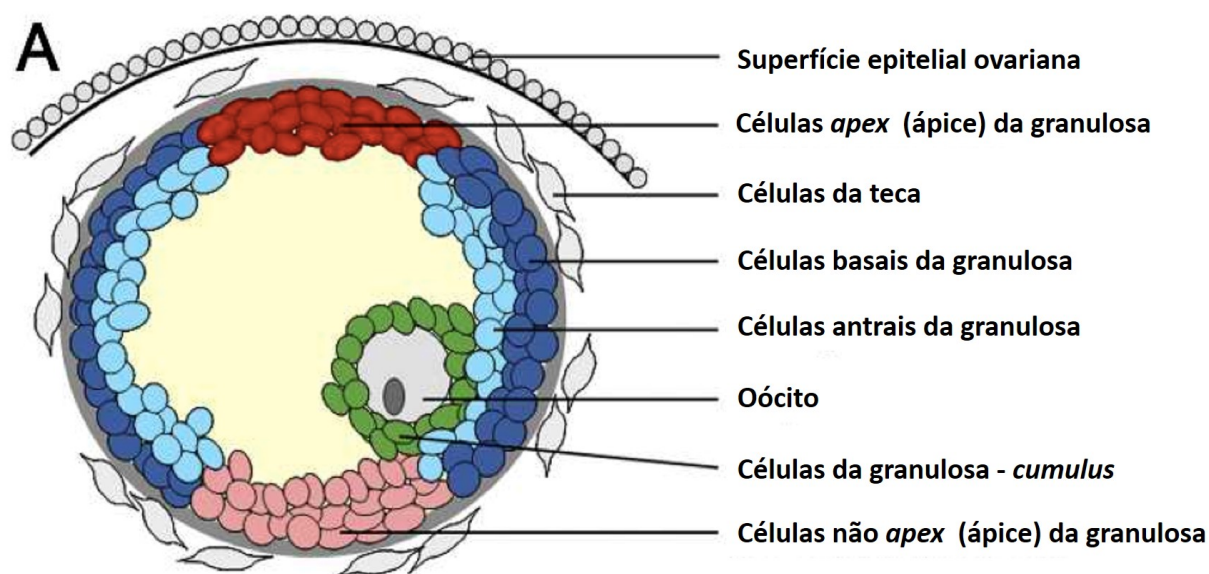


Figura 4 – Ilustração da unidade funcional do ovário: o folículo ovariano. Modificado de HARRIS S et al., 2011.

Corroborando essa ideia, foi demonstrado que, quando o ambiente folicular não é ideal, não apenas o gameta, mas também as células foliculares, apresentam características subótimas (FRAGOULI E et al., 2014). Adicionalmente, existe correlação positiva entre a avaliação do perfil de expressão gênica das células foliculares com as taxas de maturação, de fertilização e de clivagem dos embriões (Li Y et al., 2014), assim como com o potencial de desenvolvimento do embrião - o perfil de expressão gênica de CCs que geram bons embriões é diferente do perfil de expressão gênica de CCs que não apresentam potencial de fertilização. Dentre os genes com diferentes níveis de expressão encontram-se elementos relacionados com o metabolismo de açúcares, com o estresse oxidativo, com a via de sinalização de insulina e com a biogênese ribossomal (XU X et al., 2015). Esses achados confirmam a ideia de que as células foliculares refletem o potencial de desenvolvimento dos oócitos.

Da mesma forma, como a qualidade dos gametas femininos altera-se de acordo com a idade, o perfil de expressão gênica de CCs coletadas de pacientes jovens (menos de 30 anos), com idade intermediária (entre 31 e 34 anos) ou com idade avançada, do ponto de vista reprodutivo (acima de 35 anos), é diferente. CCs coletadas de pacientes com idade avançada apresentam expressão aumentada de genes relacionados com a angiogênese (*ANGPTL4*, *LEPR*, *TGFBR3* e *FGF2*), enquanto que CCs coletadas de pacientes jovens apresentam expressão aumentada de genes relacionados com a resposta de processos inflamatórios (*B4GALTI*, *SERPINAI*, *CIS*, *IL18R1*) e CCs coletadas de pacientes com idade intermediária apresentam expressão aumentada de genes relacionados com a sinalização da insulina (*IGFBP3*, *IGFBP5* e *PIK3R1*) (AL-EDANI T et al., 2014).

Adicionalmente, o perfil de expressão gênica de CCs também se altera de acordo com o grau de maturação do oócito – expressão de *VCAN* e de *HAS2* é menor em CCs de oócitos maduros quando comparado com oócitos imaturos (EKART J et al., 2013), e de

acordo com características físicas da paciente - existe correlação positiva entre a expressão gênica de *GDF9* e de *BMP15* com a idade e com o índice de massa corporal da paciente (Li Y et al., 2014).

Apesar dos resultados positivos de alguns autores citados anteriormente, Papler e colaboradores (2015) não observaram diferença no perfil de expressão gênica entre células foliculares (GCs e CCs) coletadas de oócitos que apresentavam ou não potencial de fertilização. Os autores atribuem esse resultado à presença de muitas variáveis clínicas que afetam o perfil de expressão gênica das células foliculares, dificultando a padronização. Cabe salientar que esse estudo utilizou um número amostral relativamente baixo (41 pacientes).

Além das avaliações moleculares, observações morfológicas das células foliculares também podem auxiliar no processo de seleção do gameta, uma vez que a porcentagem de células foliculares apoptóticas em mulheres que atingem a gestação é consideravelmente inferior quando comparado com a porcentagem observada nas células foliculares de mulheres que apresentaram falha da gestação. Dessa forma, o grau de apoptose das células foliculares foi mencionado como possível método de indicação do melhor folículo ovariano e, conseqüentemente, do melhor oócito (RUVOLO G et al., 2013).

A seleção dos oócitos baseada na qualidade das células foliculares, apesar de ainda não ter aplicação prática e apresentar-se como inviável na atual conjuntura, por motivos metodológicos e econômicos, mostra-se, ainda, como um ramo promissor (DUMESIC D et al., 2015). Autores demonstraram que ao escolher o oócito a ser fertilizado baseado no perfil de expressão gênica de suas CCs aumentamos a chance de seleção de um oócito de boa qualidade em até 80% (EKART J et al., 2013). Até o momento, no entanto, não existe um consenso de quais marcadores moleculares seriam

(são) os melhores bioindicadores da qualidade oocitária (UYAR A et al., 2013; PAPLER T et al., 2015; DUMESIC D et al., 2015).

Ekart e colaboradores (2013) propuseram que devemos avaliar quatro genes para obtenção de benefício no processo de seleção dos oócitos (*HAS2*, *FSHR*, *VCAN* e *PR*). Xu e colaboradores (2015) corroboram, em parte, os resultados citados anteriormente, afirmando que a expressão de *VCAN* pelas CCs é diferente entre CCOs que geraram ou não bons embriões. Li e colaboradores (2014), no entanto, sugeriram a avaliação dos genes *GDF9* e *BMP15* como preditores de qualidade oocitária e de gestação.

Cabe salientar que, além da discordância entre os autores de qual seria o melhor alvo a ser avaliado, a utilização das células foliculares como indicadores da qualidade oocitária apresenta outro ponto negativo: a necessidade de a avaliação de cada CCO ser feita de forma individual, o que dificulta, ou até mesmo inviabiliza, o processo (JIANG J et al., 2010; EKART J et al., 2013; Li Y et al., 2014). Levando em consideração os pontos de discordância e de dificuldade da técnica citados anteriormente, compreendemos porque a utilização de células foliculares como método de seleção de oócitos não apresenta aplicação clínica até o momento. No entanto, tais estudos nos proporcionam o conhecimento de que respostas nas células foliculares refletem de forma fidedigna processos oocitários. Por conseguinte, concluímos que esse modelo celular poderia ser utilizado como referência de respostas oocitárias.

Tendo em vista que os métodos de seleção oocitária, anteriormente citados, não apresentaram a eficácia desejada (ou são, do ponto de vista prático, muito laboriosos) e que o baixo potencial de desenvolvimento de gametas maturados *in vitro* está relacionado com a qualidade do oócito (WU Y et al., 2007; RODRIGUES B et al., 2009) foi sugerida a combinação dos critérios de seleção morfológica e bioquímica. Sabe-se que, ao longo do crescimento/capacitação do oócito (período anterior ao processo de

maturação no qual o gameta torna-se competente para sofrer os processos de maturação e de fertilização, como afirmado anteriormente) (HYTTEL P et al., 1997), ocorrem modificações metabólicas, havendo alteração da atividade de algumas enzimas chave no metabolismo do gameta (EPSTEIN J et al., 1969; TSUTSUMI O et al., 1992). Dentre tais enzimas, destaca-se a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), que aumenta sua atividade ao longo do crescimento oocitário. Foi demonstrado que existe uma relação linear direta entre o diâmetro do oócito e a atividade da enzima G6PDH. Contudo, esse aumento da atividade enzimática que acompanha o aumento do diâmetro do oócito cessa quando o gameta atinge diâmetro aproximado de 85 μm , ou seja, o oócito continua aumentando de volume enquanto que a atividade da enzima G6PDH atingiu o platô (como representado na Figura 5A). Conseqüentemente, ao avaliar a atividade específica da enzima G6PDH (razão entre a média da atividade enzimática e a média do volume do gameta) foi demonstrado que oócitos que se encontram nas fases finais do crescimento/capacitação (75 - 100 μm) são caracterizados por menor atividade específica da enzima G6PDH em relação aos oócitos que estão em estágios iniciais da fase de crescimento/capacitação (MANGIA e EPSTEIN, 1975), como representado na Figura 5B. Dessa forma, foi sugerido que gametas que ainda não são competentes para o processo de maturação (e demais procedimentos *in vitro*), por se encontrarem em estágios iniciais do crescimento/capacitação, apresentam maior atividade específica da enzima G6PDH, contrastando com gametas que já concluíram o processo de crescimento/capacitação, os quais apresentam atividade específica da enzima G6PDH diminuída (MANGIA e EPSTEIN, 1975; TSUTSUMI O et al., 1992).

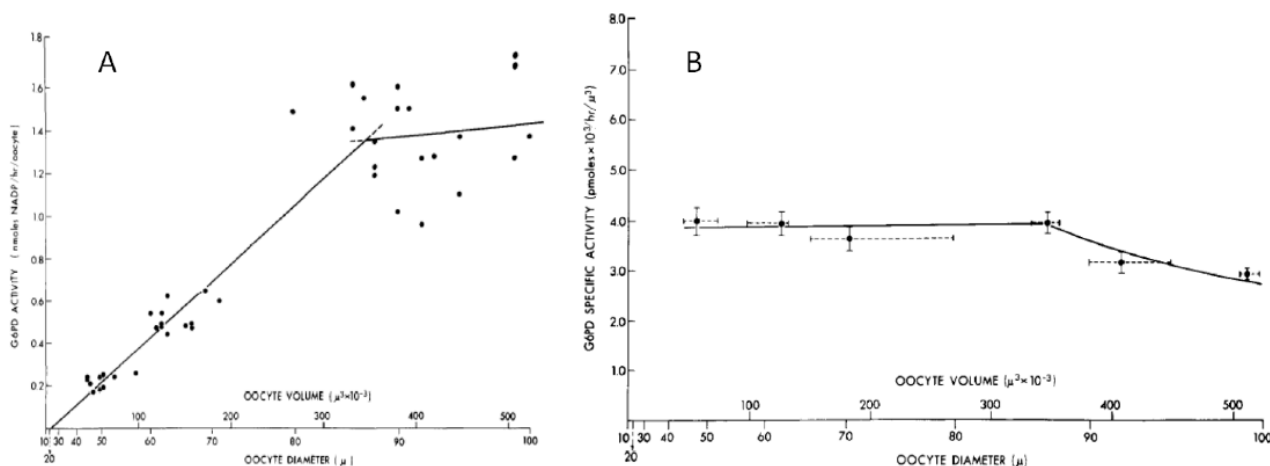


Figura 5 – Relação entre a atividade (A) e a atividade específica (B) da enzima G6PDH de acordo com o diâmetro de oócitos de murinos. Retirado de MANGIA e EPSTEIN, 1975.

Em 1986, foi sugerido que a atividade específica da enzima G6PDH poderia ser aferida, de forma indireta, através da aplicação de um corante de supra-vitalidade chamado Azul Cresil Brilhante (*Brilliant Cresyl Blue* - BCB). Uma vez que esse corante azulado pode ser reduzido a um composto incolor pela G6PDH, concluiu-se que a taxa de redução da coloração azulada corresponderia ao nível de atividade específica da enzima G6PDH (WILLIAMS T, 1986). Inicialmente, no entanto, o BCB foi empregado para realizar sexagem de embriões murinos (WILLIAMS T, 1986) e estimular o consumo de glicose de embriões bovinos (TIFFIN G et al., 1991). Apenas em 1993 foi sugerido o uso do BCB como método de aferição indireta da atividade específica da enzima G6PDH em oócitos de suínos (ERICSSON S et al., 1993). Ericsson e colaboradores (1993) propuseram a utilização do corante BCB como método de seleção dos gametas competentes para o desenvolvimento: oócitos que completaram sua fase de crescimento apresentam menor atividade específica da enzima G6PDH e, conseqüentemente, quando expostos ao BCB, apresentam coloração azulada (sendo classificados como BCB positivo / BCB +), uma vez que o corante não é completamente reduzido pela enzima. Por outro

lado, gametas que ainda estão em fase de crescimento apresentam maior atividade específica da enzima G6PDH, a qual reduz o corante a um composto incolor, impedindo a coloração dos gametas, que permanecem incolores (sendo classificados como BCB negativo / BCB -). A Figura 6 representa, de forma didática, o princípio teórico de aplicação do BCB, enquanto que a Figura 7 ilustra como oócitos humanos são visualizados, sob microscopia óptica, após exposição ao BCB.

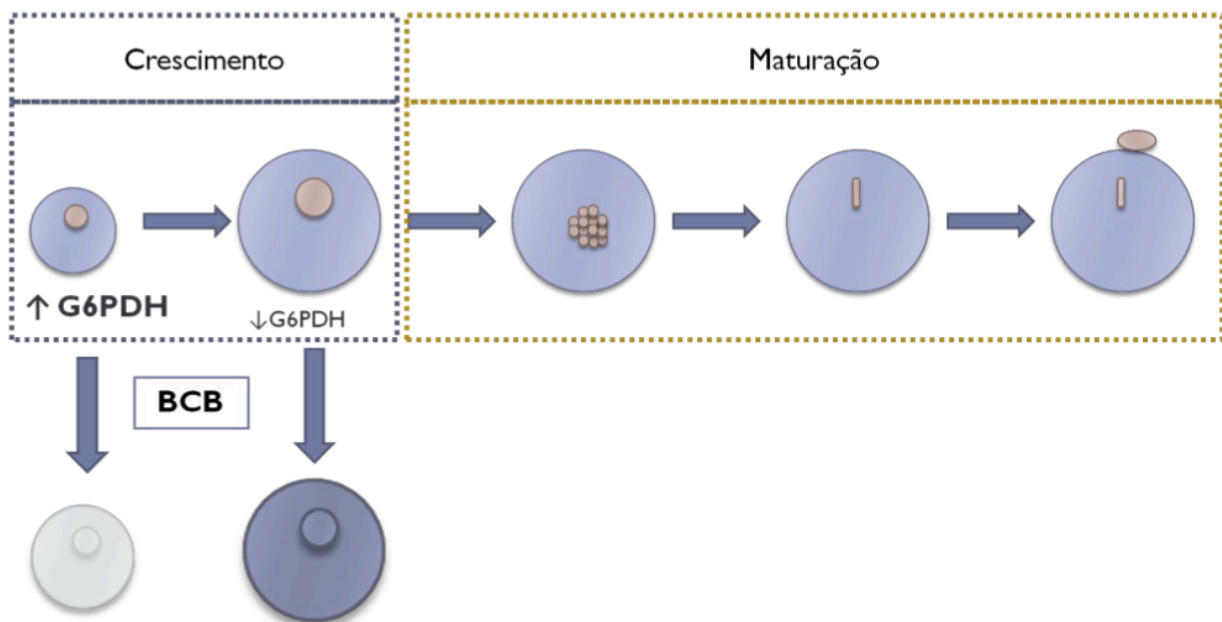


Figura 6 – Princípio teórico de seleção de oócitos de mamíferos através da utilização do corante BCB.

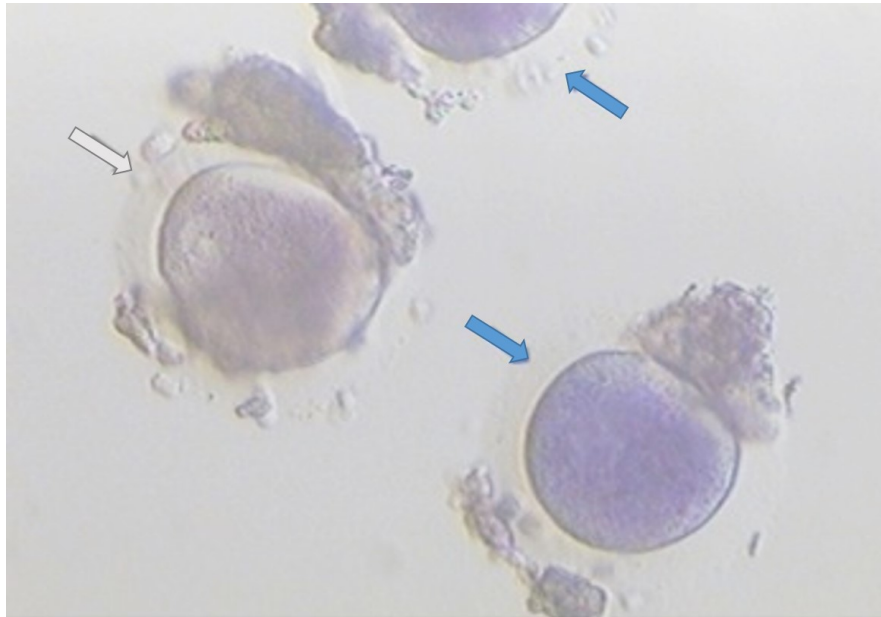


Figura 7 – Observação microscópica de oócitos de humanos após exposição ao corante BCB. As setas azuladas indicam gametas classificados como BCB positivos (oócitos com coloração azulada), enquanto que a seta cinza claro indica oócito incolor (BCB negativo). Retirado de ALCOBA D et al., 2016 (dados ainda não publicados).

A partir dos primeiros experimentos de Ericsson e colaboradores (1993) com oócitos de suínos, concluindo que gametas BCB positivo apresentam maiores taxas de maturação nuclear, de penetração de espermatozoide e de fertilização (quando comparados com oócitos BCB negativo e com o grupo controle), outros experimentos demonstraram que o corante BCB pode ser utilizado como método eficaz na seleção dos oócitos competentes - mais aptos à MIV. Desde então, a aplicação do BCB tem demonstrado resultados satisfatórios, pois gametas BCB positivo apresentam maiores taxas de maturação nuclear (MIV), de clivagem embrionária e de formação de blastocisto, quando comparados com seus homólogos classificados como BCB negativo (SUGULLE A et al., 2006; TORNER H et al., 2008; ALCOBA D et al., 2013; WANG L et al., 2012).

Confirmando a baixa qualidade dos gametas BCB negativos, ao cultivá-los junto com seus homólogos classificados como positivos (no mesmo microambiente – mesma gota de cultivo), a taxa de formação de blastocisto do grupo BCB positivo diminui, indicando que fatores são secretados pelos gametas BCB negativos e esses afetam a qualidade dos gametas ao seu redor (SALVIANO M et al., 2015). Uma vez que existe dificuldade na obtenção de gametas, propõe-se que os gametas BCB negativos não sejam descartados, mas sim apenas destinados para outro procedimento anteriormente à MIV, a fim de elevar a sua competência. Em recente estudo foi indicado a utilização de um pré-cultivo dos CCOs BCB negativo por 6 horas com agentes que elevam a concentração de AMPc, com o intuito de inibir a maturação espontânea do gameta, permitindo tempo suficiente para todos oócitos adquirirem competência para sofrer o processo de maturação nuclear e citoplasmática. Apesar de os resultados não terem sido muito animadores (no que diz respeito às taxas de clivagem embrionária e de formação de blastocisto), esse trabalho demonstra a importância de desenvolvimento de outra abordagem com os gametas BCB negativos. Adicionalmente, no que diz respeito à qualidade do blastocisto (número de células), os resultados demonstraram que esse pré-cultivo elevou o número de células por blastocisto (AZARI-DOLATABAD N et al., 2016).

É preciso salientar o fato de que a aplicação do BCB apresenta, assim como as outras técnicas de seleção de gametas, desvantagens: ela eleva o custo e o tempo das técnicas de RA (OPIELA J et al., 2013) e, diferente de como imaginado inicialmente, ela não seleciona população completamente homogênea de gametas (FU B et al., 2015).

Apesar das ressalvas feitas, não há dúvidas, baseado na literatura, de que gametas BCB positivos apresentam qualidade superior quando comparados com seus homólogos do grupo BCB negativo. No entanto, a principal comparação deve (ou deveria) ser feita com o grupo controle (PAWLAK P et al., 2014), o qual representa a manipulação

convencional pela qual o CCO passaria. O grupo controle é representado, logicamente, por oócitos tanto BCB positivos quanto BCB negativos (representativo de uma média desses dois grupos); por esse motivo, geralmente, o grupo controle apresenta características intermediárias – resultados inferiores aos observadas no grupo BCB positivo e superiores aos observadas no grupo BCB negativo (FAKRUZZAMAN M et al., 2013). No entanto, a igualdade de resultados entre o grupo BCB positivo e o grupo controle (Anexos 1 & 2), observada em muitos estudos, torna questionável a real aplicabilidade desse corante como método eficaz de seleção.

Idealmente os estudos deveriam apresentar dois grupos controle: um grupo de CCOs que, logo após serem coletados, são destinados diretamente à MIV (controle) e outro grupo que passa pelas mesmas manipulações do grupo tratado (controle-BCB), mas sem exposição à molécula do BCB. Tal abordagem foi realizada por Salviano e colaboradores (2015) que demonstraram que esses dois grupos apresentam as mesmas taxas de clivagem embrionária e de formação de blastocisto (utilizando como modelo experimental CCOs de bovinos). Dessa forma, foi demonstrado que as manipulações extras necessárias para a coloração com o BCB não apresentam efeito negativo sobre o oócito. Corroborando tais achados, nosso grupo de pesquisa demonstrou o mesmo resultado, utilizando como modelo experimental células foliculares ovarianas (ALCOBA D et al., 2016). Dessa forma, concluiu-se que, se a técnica de seleção com BCB apresentar efeitos negativos sobre o CCO, esses efeitos são devidos à molécula do BCB e não às manipulações que a técnica exige.

Na grande maioria das produções científicas, a taxa de MIV (maturação nuclear) é relatada como sendo superior no grupo BCB positivo, quando comparamos com seus homólogos do grupo BCB negativo (Anexo 1). Adicionalmente, a configuração da cromatina dos oócitos BCB positivos é relatada como mais adequada para o processo de

MIV (TORNER H et al., 2008; EGERSEGI I et al., 2010; FU B et al., 2015); no entanto, poucos trabalhos demonstraram diferença entre os grupos BCB positivo e controle, com relação à taxa de MIV, tornando questionável o benefício da aplicação do BCB (Anexo 1).

Identificar a maturidade do gameta feminino é extremamente importante, uma vez que ela é diretamente responsável pela produção *in vitro* de embriões (OPIELA J et al., 2013). Apesar de a maturidade nuclear ser relativamente fácil de definir ainda não existe método completamente eficaz para avaliar a maturação citoplasmática - e essa é muito importante para o gameta. A fim de avaliar a maturação citoplasmática, três técnicas são largamente aplicadas: a observação da distribuição dos grânulos corticais e das mitocôndrias e a concentração de glutathiona citoplasmática (GSH).

A distribuição dos grânulos corticais são indicadores da maturação citoplasmática do gameta. Quando os grânulos corticais localizam-se na região cortical do ooplasma os oócitos são classificados como maduros em relação ao conteúdo citoplasmático, enquanto que a distribuição dispersa dos grânulos é um indicador de imaturidade citoplasmática do oócito. Levando em consideração essa avaliação, oócitos BCB positivos apresentaram maiores taxas de maturação citoplasmática, quando comparados com seus homólogos BCB negativo e até mesmo quando comparados com o grupo controle (SILVA D et al., 2013; FU B et al., 2015).

Da mesma forma, a localização das mitocôndrias altera-se ao longo da maturação citoplasmática: antes de sofrer esse processo as mitocôndrias estão agrupadas na periferia do ooplasma (indicando maior contato com as CCs); após o processo de maturação essas organelas migram para a região central do oócito, apresentando uma redistribuição no ooplasma (PAWLAK P et al., 2014; FU B et al., 2015). Utilizando essa observação, autores demonstraram que gametas BCB positivos apresentam maiores taxas de maturação citoplasmática, quando comparados com seus homólogos BCB

negativos e com o grupo controle (FU B et al., 2015). Adicionalmente o nível de atividade mitocondrial foi relatado como inferior no grupo BCB negativo, quando comparado com o grupo positivo (CATALÁ M et al., 2011), indicando menor competência desses gametas.

Além da localização das mitocôndrias e de sua atividade, o número de cópias de DNA mitocondrial (mtDNA) é um indicador da qualidade oocitária - pode-se pensar que grandes quantidades de mtDNA são desejadas, uma vez que o blastômero formado receberá maior aporte de mitocôndrias e, conseqüentemente, maior acesso à ATP durante o seu desenvolvimento. Levando em consideração a média do número de cópias de mtDNA, o grupo BCB positivo apresentou melhores resultados quando comparado com o grupo negativo (EL SHOURBAGY S et al., 2006; SPIKINGS E et al., 2007). No entanto, foi relatado, por um autor (PAWLAK P et al., 2014) que o grupo controle apresentou resultado superior (após a MIV) quando comparado com o grupo BCB positivo, indicando sua melhor qualidade. Em consonância com tais resultados, oócitos expostos ao BCB (após 44 horas de MIV) apresentaram diminuição do potencial de membrana mitocondrial, assim como diminuição da produção de ATP (SANTOS E et al., 2013), indicando possível efeito negativo do BCB sobre as mitocôndrias oocitárias de suínos.

Apesar da divergência entre alguns autores e dos resultados negativos descritos anteriormente, Opiela e colaboradores (2013) concluíram, em artigo de revisão, que o BCB é um marcador indireto de oócitos que apresentam maquinário mitocondrial com melhor qualidade.

Como terceira forma de avaliação da maturidade citoplasmática, o nível de GSH é utilizado como indicador; essa molécula participa de várias funções celulares, como transporte de aminoácidos, síntese proteica e proteção contra dano oxidativo

(URDANETA A et al., 2003). Autores demonstraram que oócitos de caprinos BCB positivo apresentam maiores níveis de GSH quando comparados com os grupos BCB negativo e controle, indicando maior maturidade citoplasmática (ABAZARI-KIA A et al., 2014). No entanto, tais resultados não encontraram ressonância em oócitos de roedores, onde os níveis de GSH foram similares quando o grupo BCB positivo foi comparado com o grupo BCB negativo (SALIMI M et al., 2014) ou com o grupo controle (WU Y et al., 2007).

Outras formas de mensurar a competência oocitária, além da maturação nuclear e citoplasmática, envolvem a avaliação do seu conteúdo lipídico e do seu perfil de expressão gênica, como mencionado anteriormente nessa Tese.

Autores demonstraram que existe correlação entre o conteúdo lipídico do ooócito e o seu grau de desenvolvimento – quanto maior o conteúdo lipídico intracelular, maiores são as taxas de fertilização, de clivagem embrionária e de formação de blastocisto. Foi demonstrado que gametas BCB negativos apresentam menor conteúdo lipídico, demonstrando o seu baixo potencial de desenvolvimento (CASTANEDA C et al., 2013; MOHAMMADI-SANGCHESHMEH A et al., 2014).

Alguns marcadores de qualidade oocitária, como *GSTA2* (PAWLAK P et al., 2014) e *FST* (ASHRY M et al., 2015), assim como marcadores do crescimento e do desenvolvimento folicular, como a adiponectina e seus receptores (TABANDEH M et al., 2012), já foram citados como mais expressos em oócitos e células foliculares de gametas BCB positivo quando comparado com o grupo controle. Adicionalmente, a expressão gênica de catepsinas (*CTSB*, *CTSK*, *CTSS* e *CTSZ*), características de folículos com menor qualidade (ASHRY M et al., 2015), assim como a expressão de genes relacionados com a atresia folicular (*PTTG1*), com a supressão do crescimento do folículo (*MSX1*) (GHANEM

N et al., 2007) e com a morte celular programada (*Bax*) (SU J et al., 2012), foram relatados como mais expressos em oócitos e/ou células foliculares BCB negativos.

Apesar dos indicativos de diferenças moleculares entre CCOs controle, BCB positivo e negativo, há estudos que demonstram expressão similar de alguns genes entre esses grupos; dentre eles cabe destacar a *MAPK* e *AKT1*, relacionados com a proliferação celular (TORNER H et al., 2008), *COX1* e *ATP1A1*, relacionados com o metabolismo (CATALÁ M et al., 2011) e *NASP* e *EEF1A1*, relacionados com a qualidade oocitária (CATALÁ M et al., 2012). Estudos mais amplos demonstraram que 185 genes são expressos de forma diferente entre oócitos BCB positivo e BCB negativo – os genes mais expressos nos gametas positivos estão relacionados com o controle do ciclo celular, com a transcrição gênica e com a tradução proteica, enquanto que os genes mais expressos nos gametas negativos estão relacionados com o controle da síntese de ATP e com a atividade mitocondrial (TORNER H et al., 2008).

Diante do exposto, conclui-se que o BCB auxilia na seleção de gametas não apenas com relação à atividade específica da enzima G6PDH, mas também, indiretamente, com relação ao perfil de expressão gênica do CCO (MOHAMMADI-SANGCHESHMEH A et al., 2011).

Além das avaliações oocitárias, as avaliações dos embriões oriundos de oócitos submetidos à seleção com BCB são de extrema importância para ponderarmos sua real aplicabilidade. Por conseguinte, resultados referentes às taxas de clivagem embrionária, de formação de blastocisto, assim como a qualidade do blastocisto, apresentam rico caráter científico (Anexos 1 & 2).

Assim como os demais resultados, gametas BCB positivo apresentam maiores taxas de clivagem embrionária, quando comparados com seus homólogos negativos. No entanto, é preciso salientar que alguns estudos não adicionaram o grupo controle em

suas avaliações (MOHAMMADI-SANGCHESHMEH A et al., 2014) ou então demonstraram resultados similares entre os grupos BCB positivo e controle (Anexo 2).

No que diz respeito à taxa de formação de blastocisto, os resultados são mais animadores, uma vez que, na maioria dos trabalhos que avaliaram esse parâmetro, o grupo BCB positivo apresenta resultados superiores não apenas quando comparado como grupo BCB negativo, mas também quando comparado com o grupo controle (Anexo 2). A real aplicabilidade do BCB, no entanto, ainda permanece questionada por alguns autores, que não encontraram diferenças na taxa de formação de blastocisto entre oócitos BCB positivo e controle (FAKRUZZAMAN M et al., 2013; ASHRY M et al., 2015; FU B et al., 2015).

Não apenas a formação do blastocisto, mas, principalmente, a sua qualidade, é de extrema importância para os resultados de RA, uma vez que a morfologia do blastocisto é muito utilizada como indicador de qual deve ser transferido para a fêmea (SADEESH E et al., 2014).

Levando em consideração essa abordagem, a aplicação do BCB mostra-se benéfica, uma vez que o número de células observado nos blastocistos originados de oócitos BCB positivo foi superior ao observado nos demais grupos (BCB negativo e controle) (FAKRUZZAMAN M et al., 2013). Adicionalmente, blastocistos originados de oócitos BCB negativos apresentaram maior taxa de células apoptóticas, quando comparado com os grupos BCB positivo e controle (FU B et al., 2015). Tais resultados indicam que a seleção de gametas competentes através da aplicação do BCB permite a obtenção de blastocistos com melhor qualidade.

Apesar da ampla utilização do corante BCB em espécies animais, ainda existe grande variação entre os protocolos de aplicação do BCB e essa diferença na padronização do BCB dificulta não apenas a comparação dos resultados entre os

autores, como também a sua interpretação (PAWLAK P et al., 2014). Podemos observar variação inter- e intra-espécie, havendo três variáveis que divergem de acordo com os estudos: o veículo utilizado para diluir o corante (o diluente), a concentração do corante e o tempo de exposição dos gametas ao BCB, como representado na Tabela 1.

Tabela 1 – Variação do protocolo de aplicação do BCB entre espécies.

Modelo animal	Estudo	Diluente	Concentração (μM)	Tempo de exposição (minutos)
	Ericsson A, 1993	PBS	13	90
	Roca J, 1998	DPBSm	13	90
	Coy P, 2005	PBS	13	90
	Wongsrikeao P, 2006	PBSm	26	90
	El Shourbagy, 2006	DPBSm	13	90
	Spikings E, 2007	DPBSm	13	90
	Ishizaki C, 2009	DPBS	13	90
Suíno	Egerszegi I, 2010	DPBSm	13	90
	Kempisty B, 2011	DPBSm	13	90
	Pawlak P, 2011 (A)	PBSm	13	90
	Pawlak P, 2011 (B)	PBSm	13	90
	Alvarez G, 2012^A	Meio de MIV	4,8	180
	Santos E, 2013	Meio de MIV	13	60
	Pawlak P, 2014	PBS + BSA	13	90
	Fu B, 2015	DPBS	13	90

Bovino	Pujol M, 2004	PBSm	26	90
	Alm H, 2005	DPBSm	26	90
	Bhojwani S, 2007	DPBSm	26	90
	Ghanem N, 2007	DPBSm	26	90
	Torner H, 2008	DPBSm	26	90
	Opiela J, 2008	DPBS	26	60
	Sugulle A, 2008	DPBS	26	90
	Mota G, 2010	DPBSm	26	60
	Heleil B, 2010	DPBSm	26	90
	Opiela J, 2010	DPBS	26	60
	Hadi H, 2010	DPBSm	26	90
	Koester M, 2011	DPBSm	26	30
	Su J, 2012	PBSm	26	90
	Janowski D, 2012	DPBSm	26	90
	Tabandeh M, 2012	PBSm	26	90
	Castaneda C, 2013	ECU (meio)	26	90
	Fakruzzaman, 2013	DPBS	26	90
	Mirshamsi S, 2013	DPBSm	26	90
	Silva D, 2013	PBSm	26	90
	Shabankareh H, 2014	DPBSm	26	90
Ashry M, 2015	DPBS	26	90	
Salviano M, 2015	PBSm	26	90	
Hajarian H, 2016	DPBSm	26	90	
Ogata Y, 2016	DPBS	52	30	

Caprino	Rodríguez-González E, 2002	DPBSm	13, 26, 39 ou 52 ^B	90
	Rodríguez-González E, 2003	DPBSm	26	90
	Urdaneta A, 2003	PBSm	26	90
	Abazari-Kia A, 2014	PBSm	26	90
Equino	Mlodawska, 2005	PBSm	26	90
	Mohammadi-S A, 2011	PBSm	26	90
	Pereira G, 2013	DPBS	26	90
Bubalino	Manjunatha B, 2007	DPBSm	13, 26 ou 39 ^B	90
	Sadeesh E, 2014	DPBSm	26	90
Ovino	Catalá M, 2011	PBSm	13, 26, 39 e 52 ^C	60
	Mohammadi-S A, 2012	PBSm	26	90
	Wang L, 2012	DPBSm	26 e 52 ^B	90
	Catalá M, 2012	PBSm	26	60
	Karami-Shabankareh, 2012	DPBSm	13, 26 e 39	90
	Mohammadi-S A, 2014	PBSm	26	90
	Azari-Dolatabad, 2016	DPBSm	26	45
Roedor	Alcoba D, 2013	M16	13, 20 e 26	30, 60 e 90 ^D
	Salimi M, 2014	KSOM	26	90
Humano	Alcoba D, 2016^E	DPBS	26	60

^A exposição dos gametas ao BCB após período de MIV;

^B concentração de 26 μ M apresentou melhores resultados;

^C exposição de 13 μ M apresentou melhores resultados;

^D exposição por 60 minutos apresentou melhores resultados;

^E dados ainda não publicados.

Pouco é relatado sobre a importância do correto diluente na utilização do BCB. A Tabela a seguir (Tabela 2), demonstra a diferença da composição química entre os três principais diluentes utilizados (PBS, DPBS e DPBS modificado - DPBSm).

Tabela 2: Comparação entre a composição química da solução salina utilizada nas técnicas de Reprodução Assistida.

PBS	DPBS	mg/L	DPBSm	mg/L
KCl	KCl	200	KCl	200
KH ₂ PO ₄	KH ₂ PO ₄	200	KH ₂ PO ₄	156
NaCl	NaCl	8000	NaCl	8000
Na ₂ HPO ₄	Na ₂ HPO ₄	1150	Na ₂ HPO ₄	1253
-	MgCl ₂ . 6H ₂ O	100	MgCl ₂ . 6H ₂ O	100
-	CaCl ₂	100	CaCl ₂ . 2H ₂ O	132
-	-	-	NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	173
-	-	-	Glicose	1099
-	-	-	Piruvato de sódio	36

Apesar da variabilidade do diluente utilizado nos estudos, sabe-se que devemos suprimir o vermelho de fenol, indicador de pH, pois ele pode interferir na coloração

azulada do BCB (WU Y et al., 2007). Os diluentes mais utilizados nas técnicas de aplicação do BCB são o PBS e DPBS modificados (ALM H et al., 2005; WONGSRIKEAO P et al., 2006; BHOJWANI S et al., 2007; MANJUNATHA B et al., 2007). No entanto, alguns autores utilizam apenas PBS (OPIELA J et al., 2010) ou o próprio meio de cultivo sem o vermelho de fenol, para que não ocorra interação entre a coloração vermelha deste indicador de pH e a coloração azulada do corante (WU Y et al., 2007; ALCOBA D et al., 2013; SALIMI M et al., 2014).

Com relação à concentração, a de 26 μM é a mais aceita e aplicada pelos pesquisadores, como observado na Tabela 1. Foi demonstrado que concentrações superiores, 39 μM (RODRIGUEZ-GONZÁLEZ E et al., 2002; MANJUNATHA B et al., 2007) e 52 μM (RODRIGUEZ-GONZÁLEZ E et al., 2002; WANG L et al., 2012), não apresentam vantagens sobre a concentração de 26 μM . Da mesma forma, concentração inferior (13 μM) não conseguiu selecionar número satisfatório de gametas (RODRIGUEZ-GONZÁLEZ E et al., 2002; MANJUNATHA B et al., 2007; ALCOBA D et al., 2013). No entanto, a concentração de 26 μM ainda é questionada por alguns autores, que demonstraram que a concentração de 13 μM (CATALÁ M et al., 2011) ou que a concentração intermediária entre 13 e 20 μM (ALCOBA D et al., 2013) podem ser mais adequadas. Por conseguinte, foi sugerido que, para cada espécie, seja importante padronizar a concentração do BCB (WANG L et al., 2012).

Da mesma forma, o tempo de exposição ao corante ainda permanece sem protocolo uniforme. Os primeiros estudos utilizaram exposição dos gametas ao BCB por 90 minutos (ERICSSON S et al., 1993; ROCA J et al., 1998) e este período de exposição ainda é utilizado na maioria dos estudos, como observado na Tabela 1. No entanto, estudos mais recentes sugerem que a exposição dos gametas ao BCB por 60 minutos é suficiente (RODRIGUES B et al., 2009; MOTA G et al., 2010; ALCOBA D et al., 2013). O tempo de

exposição dos oócitos ao corante vem sendo discutido, uma vez que esse fator poderia afetar o desenvolvimento oocitário dos gametas selecionados por essa técnica (GOOVAERTS I et al., 2010).

É preciso salientar o fato de que, apesar do conhecimento da interação entre o BCB e a enzima G6PDH, a base bioquímica do metabolismo desse corante ainda não está completamente conhecida (ALM H et al., 2005; SUGULLE A et al., 2008; KEMPISTY B et al., 2011; SILVA D et al., 2013). Foi sugerido que o BCB apresenta papel de acceptor de elétrons durante a oxidação da glicose (ALM H et al., 2005; SILVA D et al., 2013). Diante desse desconhecimento, a comunidade científica preocupa-se com a possibilidade de efeitos tóxicos do BCB sobre o gameta, e, conseqüentemente, a segurança da aplicação do BCB sobre a saúde dos oócitos ainda é questionada (OPIELA J et al., 2013; SANTOS E et al., 2013; PAWLAK P et al., 2014). Por conseguinte, torna-se interessante avaliar, primeiramente, se existem efeitos negativos aos CCOs expostos ao BCB e, em um segundo momento, quais efeitos esse corante pode provocar ao CCO a fim de tentar impedir, ou pelo menos minimizar tal efeito (PAWLAK P et al., 2014).

Abazari-Kia e colaboradores (2014) afirmaram em seu trabalho que, devido à grande variabilidade de resultados encontrados na literatura, ainda é muito precoce a utilização do BCB na espécie humana. Os resultados divergentes da aplicação do BCB talvez estejam relacionados com o método de classificação dos gametas em BCB positivo e negativo (SHABANKAREH H et al., 2014), uma vez que, como mencionado anteriormente, essa técnica não é completamente objetiva.

Até o presente momento, pelo que temos conhecimento baseado na procura de artigos científicos, há apenas um trabalho referindo o uso do BCB na espécie humana – estudo executado pelo nosso grupo de pesquisa (dados ainda não publicados), o qual demonstrou que a exposição de oócitos humanos ao BCB conseguiu indicar dois grupos

de gametas com características diferentes. No entanto, nosso trabalho avaliou apenas a taxa de MIV – dados referentes a possíveis danos causados pela exposição do CCO ao BCB não foram avaliados. Dessa forma, a segurança de sua aplicação ainda permanece questionada para a espécie humana - e um dos grandes objetivos no desenvolvimento de técnicas de seleção de oócitos, como anteriormente afirmado, é permitir que o método seja o menos invasivo possível (GOOVAERTS I et al., 2010). Infelizmente, devido à grande dificuldade de obtenção de oócitos humanos que possam ser destinados à pesquisa, o aprimoramento de técnicas de seleção de gametas ainda permanece, na maioria das vezes, restrito à reprodução animal (CATALÁ M et al., 2012).

Devido à íntima relação entre as células foliculares com o gameta feminino, como afirmado anteriormente, a observação dos efeitos do BCB sobre tais células somáticas permitirá inferir o efeito deste corante sobre o oócito. Além disso, a observação do efeito do BCB sobre as células foliculares é essencial, uma vez que esse corante é aplicado não apenas no oócito, mas sim no CCO como um todo. Qualquer efeito negativo que o BCB proporcione para as células foliculares poderá, conseqüentemente, acarretar em danos na qualidade oocitária.

Dessa forma, torna-se interessante, do ponto de vista experimental, avaliar qual protocolo de aplicação do BCB, dentre os diferentes aplicados nas espécies animais, apresenta menor impacto sobre as células foliculares de humanos, a fim de inferir qual protocolo deve ser testado na espécie humana. Adicionalmente, uma vez tendo o conhecimento de qual o protocolo mais apropriado, torna-se necessária avaliação detalhada da segurança da aplicação do BCB nas células foliculares, a fim de estimular o uso desse corante na espécie humana (uma vez comprovada sua segurança) ou então de alertar sobre os possíveis prejuízos de sua utilização.

4.3 Foliculogênese

A foliculogênese é um complexo processo de crescimento e de diferenciação do folículo ovariano, culminando na formação de um folículo de Graaf, o qual poderá liberar um oócito maduro. Esse processo pode ser dividido, do ponto de vista didático, em três fases, que ocorrem de forma sequencial: ativação e crescimento do folículo primordial (recrutamento dos folículos primordiais que estavam no estado de dormência), crescimento do folículo antral e crescimento periovulatório – fase em que o oócito sofre a maturação nuclear e citoplasmática, formando um oócito maduro (OLA S et al., 2012).

Durante a foliculogênese os folículos passam de um estado de não crescimento (*non-growing* - estado primordial) para estágios de crescimento - folículo primário, (unilaminar), secundário (multilaminar), até atingir o estágio de folículo terciário (WINTERHAGER E et al., 2015). Foi demonstrado que as células foliculares de coelhos se diferenciam no momento da formação do antro, havendo então o aparecimento dos receptores das gonadotrofinas. A partir desse momento, a proliferação e a diferenciação dessas células são reguladas pelas gonadotrofinas (ERICKSON G et al., 1974). Dessa forma, podemos dividir o crescimento folicular em duas fases: dependente e independente de gonadotrofinas. A Figura 8, a seguir, ilustra detalhadamente o mecanismo de foliculogênese, bem como resume os elementos moleculares envolvidos nesse processo.

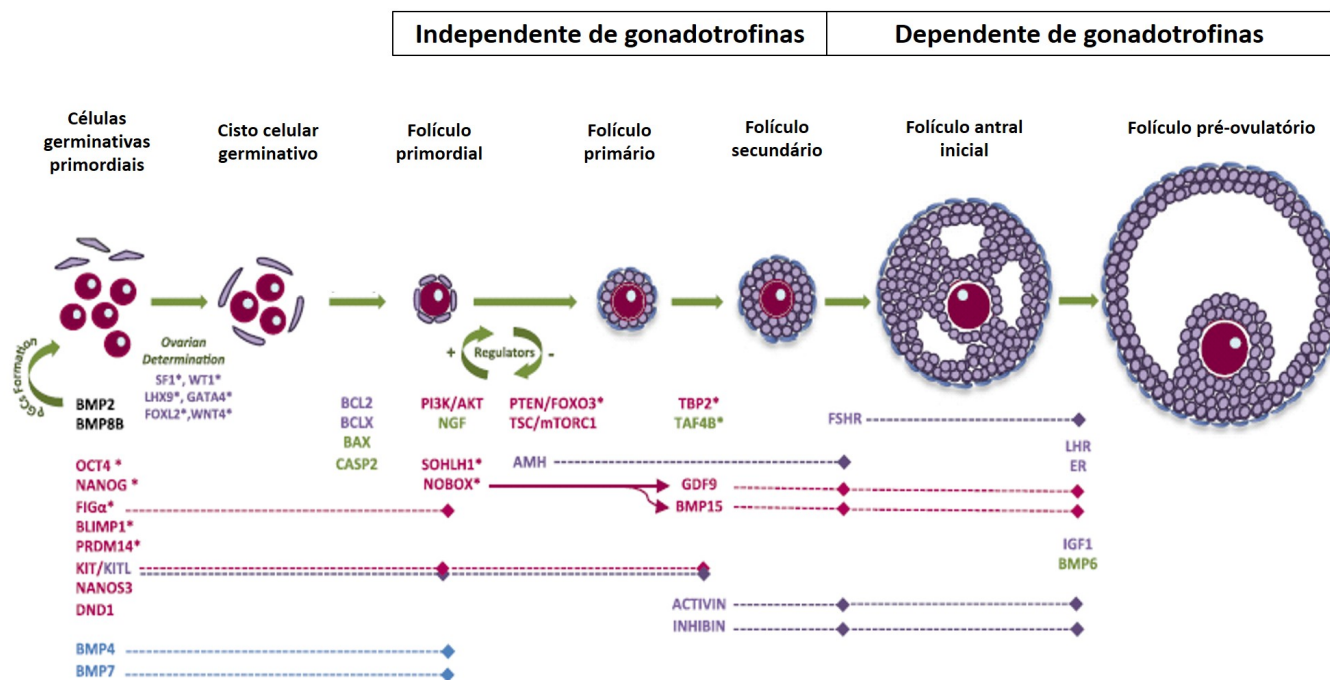


Figura 8 – Folliculogênese: alterações morfológicas e moleculares que ocorrem nas células foliculares. Modificado de SÁNCHEZ e SMITZ, 2012.

O folículo ovariano é formado por um microambiente com múltiplas interações intra-ovarianas e endócrinas que proporcionam um ambiente ótimo tanto para o desenvolvimento do oócito quanto para a proliferação das células foliculares. Esse microambiente é capaz de afetar drasticamente o oócito, tanto em estruturas do seu citoesqueleto como em estruturas do seu material genético (DUMESIC D et al., 2015). A interação entre as células foliculares e o próprio gameta é tão importante a ponto dos oócitos não conseguirem se desenvolver de forma adequada quando isolados dessas células (GOSDEN R et al., 1997).

A folliculogênese requer uma comunicação bidirecional finamente regulada entre o oócito e as células somáticas que o circundam (RUVOLO G et al., 2013; AL-EDANI T et al., 2014). Ao mesmo tempo em que o oócito regula a função das células foliculares, essas controlam o processo de capacitação do oócito (RUVOLO G et al., 2013), assim como os

processos de maturação oocitária e de ovulação; esses processos dependem da contínua comunicação entre as células somáticas e o gameta (GOSDEN R et al., 1997; UYAR A et al., 2013; XU X et al., 2015). Dessa forma, a comunicação criada entre as células é essencial para conduzir e coordenar a correta formação do compartimento somático do folículo ovariano. Essa estrutura, representada ao final do desenvolvimento folicular pelo folículo dominante, é formada por: células da teca, células da granulosa, células do *cumulus oophorus* e oócito (rever Figura 4), e, quando atinge estágio de folículo dominante, deve apresentar vias de sobrevivência celular mais exacerbadas do que as vias apoptóticas (RUVOLO G et al., 2013).

A comunicação entre o oócito e as células foliculares é permitida pela presença de proteínas transmembrana, as quais formam junções comunicantes que permitem a troca de íons inorgânicos e de pequenas moléculas entre as células foliculares e o oócito (WINTERHAGER E et al., 2015). Essas estruturas estão presentes nas microvilosidades do oócito, as quais penetram na zona pelúcida auxiliando diretamente no processo de comunicação entre as células (SATHANANTHAN A et al., 2000).

A Figura 9, a seguir, ilustra algumas das especializações celulares que permitem a comunicação entre as células que formam o folículo ovariano, permitindo que ele atue como estrutura funcional única.

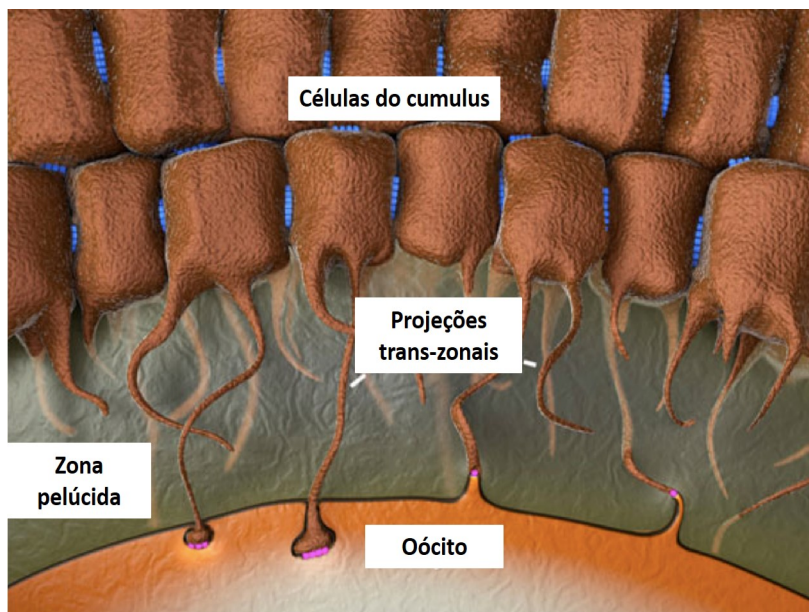


Figura 9 – Ilustração das projeções tranzonais que permitem a comunicação das células foliculares com o oócito. Modificado de WINTERHAGER E et al., 2015.

A importância da comunicação entre as células foliculares e o oócito pode ser ressaltada pelo fato de que existem fatores secretados exclusivamente pelos oócitos que são necessários para o desenvolvimento folicular (UYAR A et al., 2013). Podemos citar como exemplo a molécula de cumulina, um heterodímero formado por GDF9 e BMP15; essas duas moléculas são secretadas pelo oócito e, na matriz extracelular, irão formar a molécula de cumulina, a qual irá ativar vias de proliferação das células foliculares. Por outro lado, essa molécula também ativa vias de sinalização de genes associados com a regulação do oócito, confirmando a presença de alças de controle oócito-células foliculares (MOTTERSHEAD D et al., 2015).

A perda da comunicação entre as células foliculares e o gameta poderia estar relacionada com a diminuição do perfil reprodutivo de acordo com a idade da paciente, uma vez que, com o avançar da idade, genes que estão relacionados com a comunicação entre o oócito e as suas células foliculares adjacentes são menos expressos pelas CCs (AL-EDANI T et al., 2014).

Apesar da grande quantidade de artigos descrevendo o processo de foliculogênese, ainda existem muitas informações desconhecidas, tornando interessante estudos que visam o entendimento do desenvolvimento folicular. Para isso, muitas pesquisas utilizam como modelo experimental o cultivo primário de células foliculares coletadas de pacientes submetidas a tratamentos de infertilidade, uma vez que elas são descartadas em alguns procedimentos de RA (FRAGOULI E et al., 2014), como afirmado anteriormente. No entanto, esse modelo apresenta, pelo menos, duas limitações. A primeira limitação consiste no fato de que as células recuperadas durante tratamento de infertilidade apresentam características de células luteinizadas, visto que houve indução da paciente com o LH para que ocorra o processo de maturação oocitária. Sabe-se que não apenas o fenótipo, mas também as características bioquímicas das células da granulosa variam dentre os estados luteinizado e não luteinizado. Adicionalmente, sabe-se que este padrão é alterado entre os estágios não luteinizados de folículo antral inicial e final (folículo pré-ovulatório). Alguns grupos de pesquisa demonstraram que é possível reprogramar as células recuperadas durante os tratamentos de RA do estado luteinizado para o estado não luteinizado (OPHIR L et al., 2014; VIREQUE A et al., 2015). Adicionalmente, foi demonstrado que é possível reprogramar essas células para estágios iniciais e finais da foliculogênese (estágio de folículo antral inicial e de folículo pré-ovulatório) (OPHIR L et al., 2014). Dessa forma, a primeira limitação pode ser metodologicamente contornada, apesar de ser necessária a comprovação bioquímica e/ou molecular da reprogramação celular ocorrida, visto que essa abordagem é bastante recente. A segunda limitação está relacionada com o período de cultivo que é desejado para execução do estudo, uma vez que as células foliculares de cultura primária não permanecem viáveis por muito tempo. Como alternativa de modelo experimental para estudo da foliculogênese, alguns autores utilizam linhagens de células da granulosa;

existem, principalmente, linhagens oriundas de pacientes que foram submetidas a tratamentos de infertilidade (e então imortalizadas), e linhagens tumorais; as primeiras apresentam como grande desvantagem o fato de seu receptor para o FSH não ser funcional; por isso, as linhagens tumorais parecem ser as mais representativas para estudos sobre desenvolvimento folicular (ZHANG H et al., 2000).

Um exemplo de linhagem de células foliculares é o modelo COV434, originada de células tumorais da granulosa. Esse modelo apresenta cariótipo normal e cumpre com as principais características de células foliculares – como dependência do FSH para produção do 17β -estradiol (ZHANG H et al., 2000). Além disso, já foi demonstrada a presença de elementos relacionados com a comunicação intercelular (MOTTERSHEAD D et al., 2015), característico para a formação da estrutura folicular, como descrito anteriormente.

4.3.1 Foliculogênese & infertilidade

Distúrbios na foliculogênese são característicos de pacientes com diminuição da reserva ovariana (DOR). Tais pacientes apresentam diminuição da reserva ovariana funcional e, frequentemente, quando realizam tratamento de RA são classificadas como más respondedoras (MR), devido à pouca produção de oócitos em resposta à indução da ovulação (TURHAN N, 2006). Em 2011 (FERRARETTI A et al., 2011), a Sociedade Europeia de Reprodução Assistida e Embriologia (*European Society of Human Reproduction and Embriology* - ESHRE) criou os critérios de Bologna para definir quais são as pacientes má respondedoras, como demonstrado a seguir.

Critérios de Bologna:

- idade avançada, do ponto de vista reprodutivo (≥ 40 anos);
- má resposta ovariana em ciclos prévios de tratamento de infertilidade (ciclo cancelado pela ausência de quantidade adequada de folículos ou ≤ 3 oócitos, aplicando-se tratamento de estimulação hormonal convencional);
- e/ou resultados alterados para os testes de reserva ovariana (contagem de folículos antrais - AFC $< 5 - 7$ ou dosagem do hormônio anti-mülleriano - AMH $< 0,5 - 1,1$ ng/mL).

A paciente precisa apresentar, no mínimo, dois critérios para ser classificada como má respondedora. Essa classificação é amplamente utilizada na prática clínica e em pesquisas que avaliam não apenas a reserva ovariana das pacientes, mas também a resposta delas à indução da ovulação em tratamento de RA (FERRARETTI e GIANAROLI, 2014).

Como observado, um dos critérios listados para classificação da paciente como MR é a idade avançada, associada com o envelhecimento fisiológico do ovário (GLEICHER N et al., 2011). No entanto, existe uma situação (observada em aproximadamente 1% das mulheres), na qual ocorre diminuição do funcionamento ovariano (características bastante pronunciadas de DOR) antes dos 40 anos, situação denominada de Falência Ovariana Precoce (FOP) ou menopausa prematura (GOSWAMI e CONWAY, 2005). A FOP é também conhecida como Insuficiência Ovariana Precoce (IOP), pois ocorre uma diminuição da reserva ovariana funcional, ou seja, uma diminuição/insuficiência da quantidade de folículos primários, pré-antrais e antrais, que podem ser recrutados para o desenvolvimento folicular (GLEICHER N et al., 2011). A FOP é diagnosticada quando a paciente apresenta idade inferior a 40 anos associado

com níveis de FSH compatíveis com o período da menopausa, além da presença de hipoestrogenismo e de amenorreia (GOSWAMI e CONWAY, 2005).

Dentre as causas da FOP podemos destacar as causas iatrogênicas (devido a cirurgias pélvicas, quimioterapia, etc.), as causas associadas a doenças autoimunes, as causas genéticas, entre outras (LAML T et al., 2002). As causas genéticas são distribuídas entre as anormalidades do cromossomo X (como a síndrome de Turner ou a trissomia do X) ou as alterações pontuais de genes específicos (os chamados genes candidatos a causadores da FOP, ilustrados na Figura 10). Dentre esses genes encontra-se o *Fragile X Mental Retardation 1 (FMR1)*, localizado no cromossomo X (observar Figura 10, região inferior do cromossomo X) e primeiramente relacionado com a Síndrome do X Frágil (SXF), doença que ocorre quando esse gene é silenciado devido a perfil de hipermetilação em região específica (KAYTOR e ORR, 2001). O gene *FMR1* apresenta em seu promotor uma região rica em repetições CGG (chamada de ilha CpG); o número de repetições desse trinucleotídeo CGG na região 5'UTR (*untranslated region*) do gene *FMR1* está relacionado com o risco de desenvolvimento não apenas da SXF, mas também com o risco de desenvolvimento da FOP e com o risco associado de expansão dos trinucleotídeos para mutação completa que pode ocorrer em seus progenitores (PASTORE e JOHNSON, 2014).

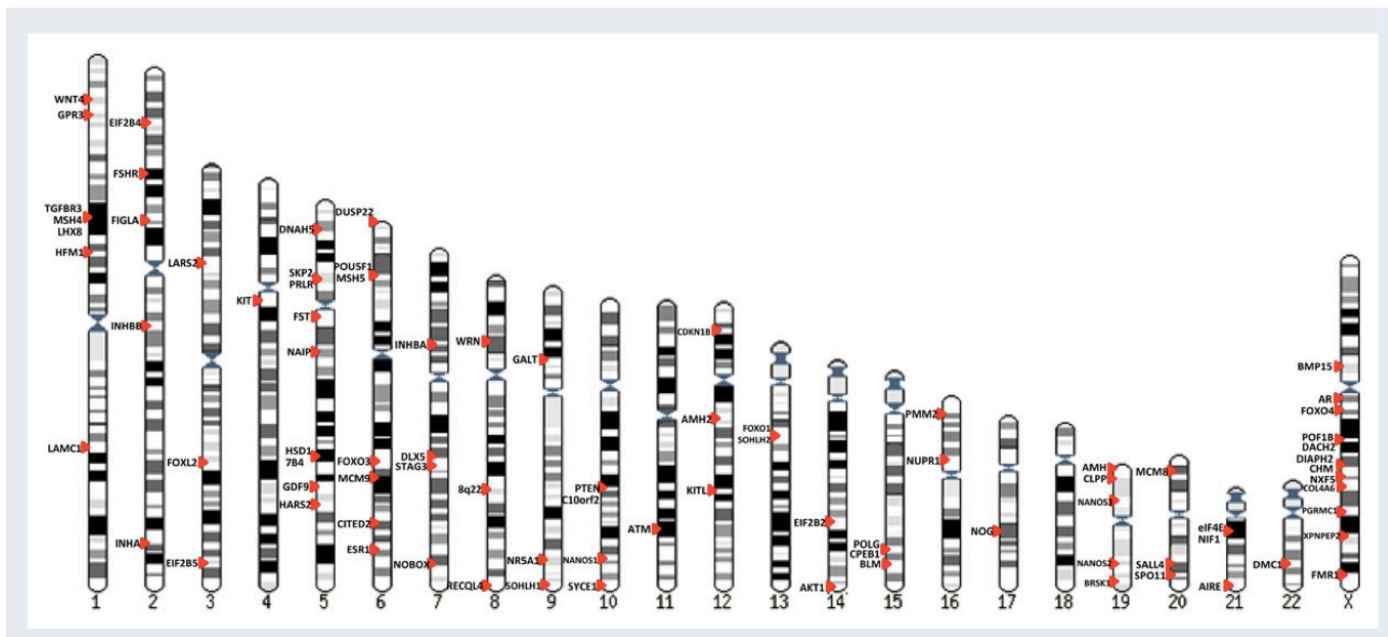


Figura 10 – Localização cromossômica dos possíveis genes relacionados com a insuficiência ovariana precoce. Retirado de Qin Y et al., 2015.

De acordo com o número de repetições CGG na região 5' UTR podemos classificar os pacientes de acordo com seu perfil alélico em (PEPRAH E, 2014; PASTORE e JOHNSON, 2014):

- “normal” ou comum (6 a 40 repetições: estável e usualmente não expande durante transmissão para a prole);
- intermediário (41 – 60 repetições, com risco variável de expansão);
- zona cinza ou *borderline* (45 a 54 repetições);
- pré-mutação (55 a 199 repetições, usualmente pode expandir para a prole);
- mutação completa (acima de 200 repetições, situação em que o paciente desenvolve a SXF)

Do ponto de vista reprodutivo tornam-se alvo de pesquisa as pacientes portadoras da pré-mutação, visto que até 24% delas apresentam IOP, denominada, consequentemente, de Insuficiência Ovariana Precoce associada ao X Frágil (FXPOI)

(PRETTO D et al., 2015). A Figura 11 ilustra a classificação das pacientes de acordo com o perfil alélico, utilizando classificação proposta por Pretto e colaboradores (2015).

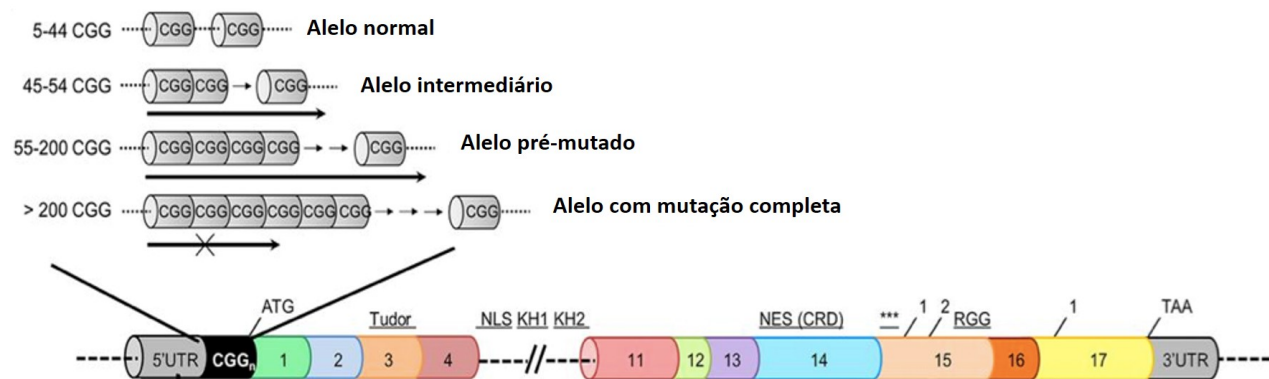


Figura 11 – Classificação alélica de acordo com o número de repetições CGG na região promotora do gene *FMR1*. Modificado de PRETTO D et al., 2015.

Como observado nas referências citadas anteriormente, os pontos de corte para alocação das pacientes em cada grupo podem variar de acordo com o estudo avaliado. Adicionalmente, outras formas de classificação já foram propostas. De acordo com Gleicher e colaboradores (2010) devemos considerar “normais”, do ponto de vista de função ovariana, pacientes que apresentem entre 26 e 34 repetições CGG. Quando a paciente apresenta ambos os alelos dentro desta faixa ela é classificada como “normal”; quando a paciente apresenta um alelo dentro desta faixa e o outro fora, consideramos a paciente “heterozigota”; e quando os dois alelos se encontram fora desta faixa, devemos considerar a paciente “homozigota”. Como esperado, pacientes “normais” demonstraram melhor reserva ovariana quando comparadas com pacientes heterozigotas, sendo observados os piores resultados de reserva ovariana nas pacientes homozigotas. Foi indicado que essa classificação genotípica define a velocidade do

envelhecimento ovariano e seria a classificação mais indicada do ponto de vista reprodutivo (GLEICHER N et al., 2011).

Apesar de ainda não estar claro o mecanismo causador da FOP nessas pacientes ou de como esse elemento (o *FMR1* e o seu produto final, a proteína FMRP) está relacionado, do ponto de vista fisiológico e molecular, com o envelhecimento ovariano, já foi demonstrado que a FMRP é expressa pelas células foliculares (GCs e CCs), não sendo expressa (ou de forma muito reduzida) pelas células estromais ovarianas e pelo gameta feminino (SCHUTTLER J et al., 2011), indicando a sua relação com o processo de foliculogênese (GLEICHER N et al., 2014). Sabe-se, através da literatura, que a ativação dos folículos envolve inúmeras vias de sinalização, sendo as mais bem descritas e entendidas a via PI3K-AKT e a via envolvendo o controle através do complexo 1 do mTOR. A regulação e o controle dessas duas vias parece ser o fator mais importante para a manutenção do estado de dormência dos folículos ovarianos, que irá repercutir na reserva ovariana da paciente (HSUEH A et al., 2015). Curiosamente, a literatura indica, embora não completamente descrito, que o mecanismo molecular causador da SXF envolve, principalmente, as vias de sinalização da PI3K e do mTOR, sendo esses, então, os principais alvos farmacológicos/terapêuticos para o entendimento e desenvolvimento de técnicas que visam o tratamento das doenças relacionadas com distúrbios do *FMR1* (BUSQUETS-GARCIA et al., 2014). Conseqüentemente, como observado, as vias envolvidas com o controle da foliculogênese e com o *FMR1* são similares.

Até o presente momento, no entanto, a maioria dos estudos focou no entendimento desse elemento (*FMR1* e FMRP) em neurônios, visto que a principal relação foi feita com a SXF, sendo, dessa forma, parca a literatura referente ao envolvimento desse elemento com as células foliculares.

Apesar de a SXF ter sido primeiramente descrita em 1943 por Martin & Bell, a sua associação com o gene *FMR1* ocorreu apenas em 1991 (PASCIUTO e BAGNI, 2014). Em neurônios, sabe-se que a FMRP é considerada uma proteína de ligação ao RNA mensageiro (mRNA). Dessa forma ela está diretamente relacionada com o controle pós-transcricional. A FMRP se movimenta entre o núcleo e o citoplasma, utilizando sequências de localização nuclear e sequências de exportação e, assim, direciona o mRNA para regiões específicas do citoplasma, controlando não apenas o local onde ocorrerá a tradução proteica, como representado na Figura abaixo (BAGNI e GREENOUGH, 2005), mas também a intensidade da tradução - se ela ocorrerá de forma mais rápida (FMRP atuando como estimulador), de forma mais lenta, ou até mesmo se o processo de tradução será anulado (FMRP atuando como repressor) (MAURIN T et al., 2014).

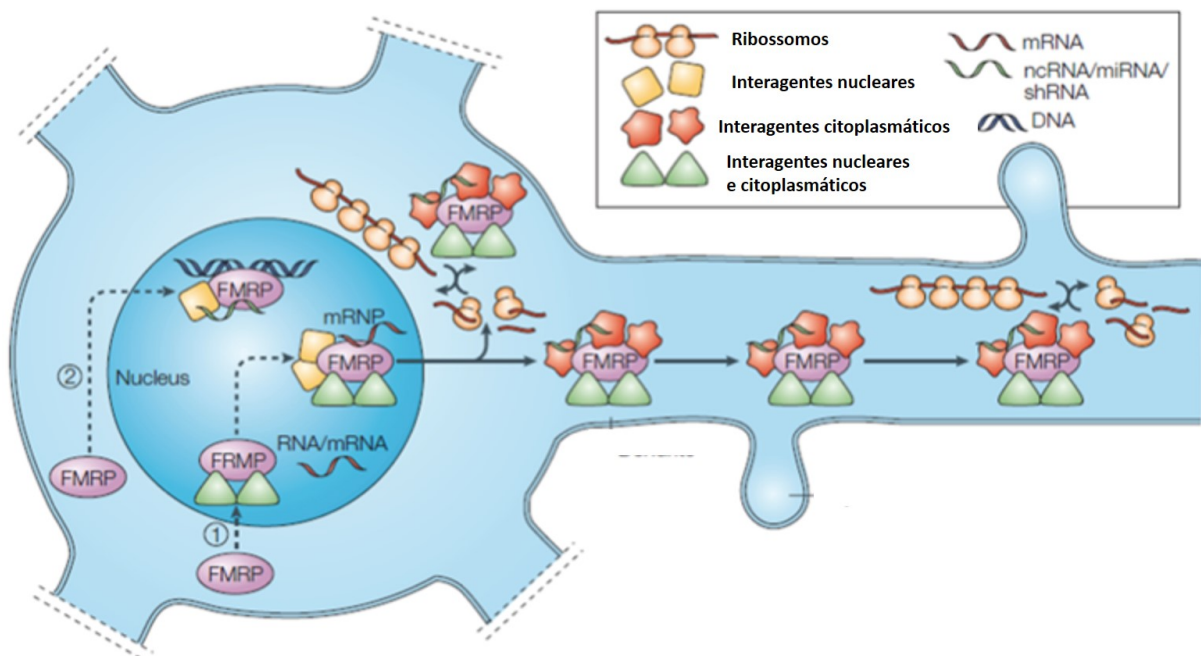


Figura 12 – Mecanismo de ação da FMRP. Modificado de BAGNI e GREENOUGH, 2005.

A interação da FMRP com o mRNA só é permitida pois essa proteína apresenta domínios de ligação ao mRNA, como os domínios KH0, KH1, KH2, Tudor e as caixas de arginina-glicina-glicina (HE e GE, 2014; MAURIN T et al., 2014). A Tabela 3 e a Figura 13, a seguir, ilustram esses domínios de ligação.

Tabela 3 – Domínios de ligação aos mRNAs presentes na FMRP.

Domínio	Quantidade	Localização
Tudor (Agenet 1 e Agenet 2)	2	N-terminal
KH0	1	N-terminal
nhRNP-K – KH1 e KH2	2	Central
Arginina-glicina-glicina (caixa RGG)	1	C-terminal

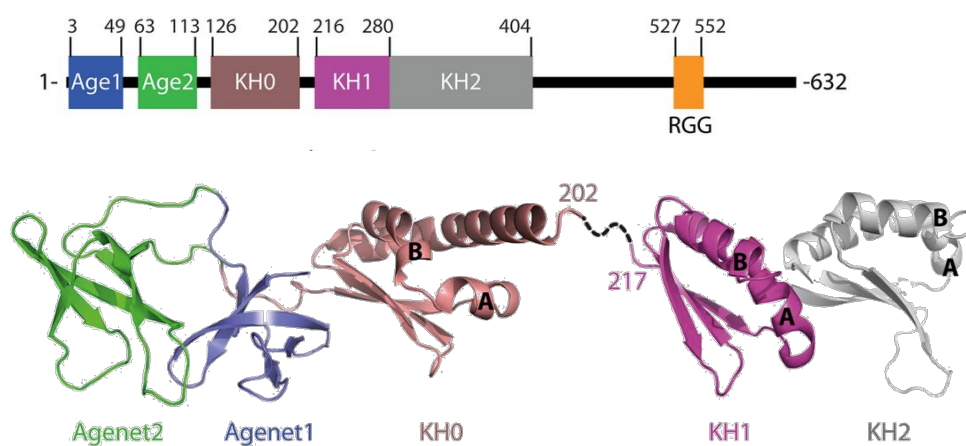


Figura 13 – Estrutura linear (em cima) e tridimensional (embaixo) da FMRP, ressaltando seus domínios de ligação com mRNA. Adaptado de MYRICK L et al., 2015.

A FMRP seleciona o seu alvo de acordo com a afinidade que apresenta com o mRNA, ou seja, ela apresenta seletividade na sua ligação ao mRNA; para isso o mRNA também precisa apresentar conformação adequada. Dentre as estruturas formadas pelo mRNA que facilitam essa interação destacam-se os *G quadruplex* (uma estrutura de RNA

em que se forma uma caixa, devido à presença de pontes de hidrogênio entre as guaninas do RNA), os motivos ACUK/WGGA, o *kissing complex* e o motivo SoSLIP (**S**od1 mRNA **S**tem **L**oops **I**nteracting with **F**MRP) (MAURIN T et al., 2014).

Apesar de termos o conhecimento da interação da FMRP com mRNA específicos, ainda não está esclarecido, mesmo em neurônios, a célula mais avaliada até o momento, todos os mRNA alvo da FMRP (KAYTOR e ORR, 2001). A importância da identificação desses alvos reside no fato de que, a princípio, o desenvolvimento das doenças associadas ao *FMR1* é causado pelo somatório dos mRNA alterados e não apenas pela alteração de um mRNA específico (PASCIUTO e BAGNI, 2014). Até o presente momento, muitos alvos já foram descritos em neurônios, destacando-se, entre eles, alguns que também estão relacionados com o processo de foliculogênese (como elementos da via PI3K e da MAPK) e com o processo de controle da maturação do oócito (como elementos controladores da via do AMPc) (BROWN V et al., 2001).

Devido a essa característica de regulação do processo de tradução, a FMRP está relacionada com o controle do desenvolvimento de espinhos dendríticos, com a proliferação e com a diferenciação de progenitores neuronais, etc. (MAURIN T et al., 2014).

Dessa forma, transpondo o conhecimento que temos a partir do papel da FMRP sobre o controle do desenvolvimento neuronal e da proliferação de neurônios, sabendo que o *FMR1* está relacionado com a FOP e que a FMRP é expressa em células foliculares, estudos recentes estão tentando demonstrar o papel desse elemento no controle da foliculogênese (SCHUTTLER J et al., 2011). No entanto, permanece desconhecido, até o momento, o mecanismo exato de controle da FMRP em células foliculares, assim como o seu real envolvimento com a foliculogênese.

4.4 Métodos de avaliação de células foliculares

4.4.1 Ensaios de Citotoxicidade

Uma vez que o desenvolvimento de uma nova droga com potencial terapêutico é bastante caro, ensaios pré-clínicos são extremamente importantes a fim de eliminar candidatos que não apresentam segurança/eficácia no seu uso antes de pesquisas clínicas serem iniciadas. Dessa forma, é imprescindível obter informações acuradas e confiáveis dos resultados de ensaios de citotoxicidade (VAN TONDER A et al., 2015). Sabemos que células de mamíferos, quando cultivadas em ambiente artificial, dividem-se constantemente e que agentes químicos tóxicos ou com potencial de toxicidade irão resultar em diminuição do potencial proliferativo das células, repercutindo na quantidade/viabilidade das células que permanecem mantidas em cultura (www.oecd.org/ehs/). Existem inúmeras formas de avaliação do efeito citotóxico de uma substância sobre o modelo de cultura celular utilizado; dentre elas encontram-se a avaliação da quantidade/densidade de células (através da contagem com azul de Tripan ou da aferição do conteúdo proteico na amostra - ensaio de Sulforrodamina B, por exemplo) e/ou avaliações da quantidade de células viáveis (viabilidade celular, como nos ensaios de MTT e de incorporação do Vermelho Neutro).

Uma das formas de avaliação da quantidade de células vivas (densidade celular) é através da utilização do corante azul de Tripan, um corante carregado negativamente que não é capaz de interagir com as células a não ser que elas estejam injuriadas (TRAN S, 2011). Células vivas, que apresentam membrana celular intacta, excluem certos corantes, como o azul de Tripan, enquanto que células mortas não o fazem (STROBER W et al., 2001). Dessa forma, ao utilizarmos essa técnica, todas as células, visualizadas no microscópio, que não incorporaram o corante são consideradas vivas, enquanto que as azuladas, que permitiram a entrada do corante, são consideradas mortas (STROBER W

et al., 2001; TRAN S, 2011). Assim, o azul de Tripán é considerado um corante de vitalidade, uma vez que é capaz de identificar células injuriadas (TRAN S, 2011). A Figura 14, abaixo, ilustra a utilização desse corante como método de avaliação da vitalidade celular (quantificação de células vivas).

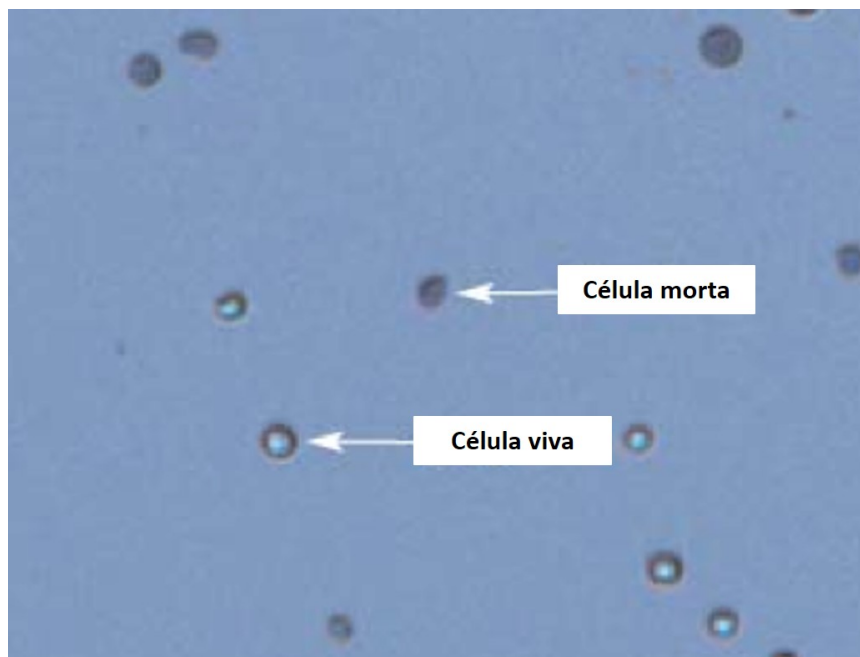


Figura 14 – Avaliação da densidade celular através da aplicação do corante azul de Tripán. Modificado de www.invitrogen.com/handbook/countess

Outra forma de avaliação da densidade celular é através do ensaio de Sulforrodamina B (SRB), o qual está baseado na quantificação do conteúdo proteico da amostra. Essa técnica é considerada eficiente e com ótimo custo benefício (VICHAI e KIRTIKARA, 2006), além de apresentar baixa variabilidade inter-experimentos (boa reprodutibilidade) e de ser capaz de detectar pequenas variações na quantidade de células entre grupos experimentais. Esse ensaio foi relatado como o método mais acurado e, conseqüentemente, o método de escolha sempre que possível (VAN TONDER A et al., 2015).

Uma das formas de avaliação da viabilidade celular (observação da quantidade de células viáveis ao final do tratamento experimental) é através dos ensaios de redução de tetrazólios. Existe uma grande variedade de tetrazólios, dentre eles o MTT – 3-(4, 5-dimetiltiazol-2)-2, 5-brometo de difeniltetrazólio, que apresenta rápida penetração em células eucarióticas, devido à sua carga positiva. O princípio de aplicação do MTT é que células com metabolismo ativo irão converter essa molécula em produto com coloração púrpura (formazan), que poderá ser detectado através de espectrofotometria (RISS T, 2015), como ilustrado na Figura 15, a seguir.

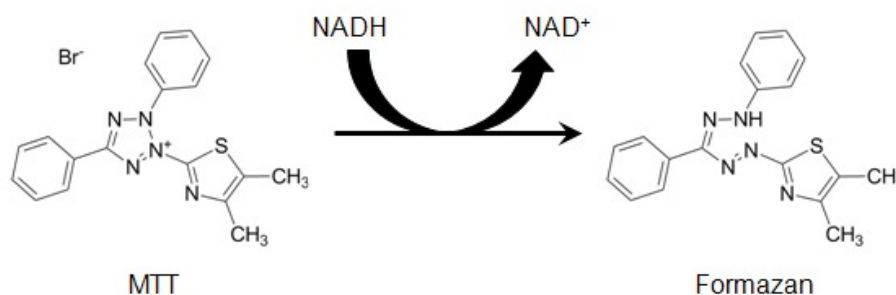


Figura 15 – Princípio molecular de funcionamento do MTT. Retirado de Riss T, 2015.

Apesar de, do ponto de vista didático, o ensaio de MTT ser simples, o mecanismo molecular exato de redução dessa molécula não está completamente esclarecido. Sabemos que essa reação não é catalisada apenas por enzimas mitocondriais (BERNAS e DOBRUCKI, 2002) e assumimos que ela reflete a quantidade de células metabolicamente ativas/viáveis – não necessariamente o número de células vivas (RISS T, 2015). Por muito tempo essa técnica foi relatada como padrão ouro para avaliação da viabilidade celular. No entanto, apesar de ser amplamente utilizada como forma de avaliação de

efeito de drogas sobre as células (viabilidade celular/citotoxicidade), essa técnica é bastante influenciada por vários fatores e, por isso, outros ensaios são necessários para comprovação dos resultados obtidos através desse método (STEPANENKO e DMITRENKO, 2015; VAN TONDER A et al., 2015).

Alternativa de teste para avaliação da viabilidade celular é o ensaio de citotoxicidade através da incorporação do vermelho neutro (*neutral red uptake* – NRU). O NRU é um ensaio de viabilidade/sobrevivência celular que utiliza um corante de supravitalidade, o Vermelho Neutro (VN); esse corante tem a capacidade de penetrar nas células, acumulando-se nos lisossomas (*Test Method Protocol for the NHK Neutral Red Uptake Cytotoxicity Assay Phase III*). Esse ensaio baseia-se no fato de que células viáveis são capazes de incorporar e de ligar o VN no seu interior – uma vez que esse corante é fracamente catiônico ele apresenta capacidade de ligação com a matriz lisossomal, que é aniônica. Dessa forma, visto que a concentração de VN que permanece nas células é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis, a citotoxicidade é representada por redução da concentração de VN na amostra após exposição ao agente químico testado (www.oecd.org/ehs/), pois alterações na membrana plasmática, resultante de dano celular, ou então na membrana dos lisossomas (fragilidade lisossomal) irão provocar diminuição da incorporação do VN (*Test Method Protocol for the NHK Neutral Red Uptake Cytotoxicity Assay Phase III*).

Van Tonder e colaboradores (2015) compararam 4 ensaios diferentes de viabilidade celular (MTT, SRB, NRU e ensaio de resazurina - RES) e demonstraram que os ensaios de SRB, de NRU e de RES apresentaram menor variabilidade (maior reprodutibilidade) quando comparado com o ensaio de MTT. Os autores indicaram que esses métodos são capazes de detectar diferença na viabilidade celular de forma mais acurada do que o ensaio considerado padrão ouro (MTT). Adicionalmente, demonstrou-

se que o ensaio de MTT não é sensível quando a amostra biológica é pequena (quando há menos de 1.000 células por poço), sendo que os ensaios de SRB e de RES conseguiram detectar diferenças na quantidade de células mesmo com pequenas quantidades de amostra (menos de 500 células por poço).

4.4.2 Avaliação da expressão gênica

A avaliação da expressão gênica, através da quantificação de mRNA, provê informação do estado em que a célula e/ou o tecido se encontra (UYAR A et al., 2013). Inúmeras técnicas permitem a detecção e/ou a quantificação da molécula de RNA. Entre elas encontram-se o *Northern blotting*, a hibridização *in situ*, o RT-PCR competitivo, o ensaio de RNase *protection*, o *microarray*, o RT-PCR qualitativo e o RT-PCR em tempo real (RT-qPCR) (RADONIC A et al., 2004). A técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real a partir de transcrição reversa (RT-qPCR) é rápida, de fácil execução, requer pouca quantidade de RNA, evita a utilização de radioativos (RADONIC A et al., 2004) e, quando comparada com os métodos convencionais, apresenta maior sensibilidade e acurácia. Além disso, apresenta ampla gama de aplicações (HUGGET J et al., 2005), sendo por isso técnica de eleição sempre que possível. A RT-qPCR permite a quantificação de ácidos nucleicos de forma muito mais acurada do que a PCR convencional, que é mais adequada para avaliação de presença ou ausência da expressão de determinado gene (BUSTIN e NOLAN, 2004).

A RT-qPCR é conhecida como “*two-step RT-qPCR*”, pois envolve dois passos diferentes: durante a primeira etapa (a transcrição reversa / *reverse transcription* - RT) a molécula de DNA complementar (cDNA) é formada através de uma fita molde de RNA (manual do usuário – *TaqMan® Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems*), utilizando *primers* gene específicos, *random hexamers* ou oligo(dT). Esta última molécula

(oligo(dT)) apresenta cauda poliT que irá se ligar à cauda poliA do mRNA (UYAR A et al., 2013). Essa etapa é crucial para que a avaliação da expressão gênica seja acurada e sensível, pois a quantidade de cDNA produzida pela transcrição reversa deve representar de forma fidedigna a quantidade de RNA (BUSTIN S, 2002). Durante a segunda etapa (reação em cadeia da polimerase/*polymerase chain reaction* - PCR) são formados, em cada ciclo, produtos da amplificação do cDNA (*amplicons*), os quais serão quantificados posteriormente por equipamento apropriado (manual do usuário – *TaqMan® Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems*). A principal ideia da PCR é proporcionar uma amplificação exponencial da sequência alvo (UYAR A et al., 2013). Os ciclos da PCR são formados por três passos: desnaturação, anelamento e extensão (www.sabiosciences.com; UYAR A et al., 2013). A Figura 16 ilustra as duas etapas da RT-qPCR.

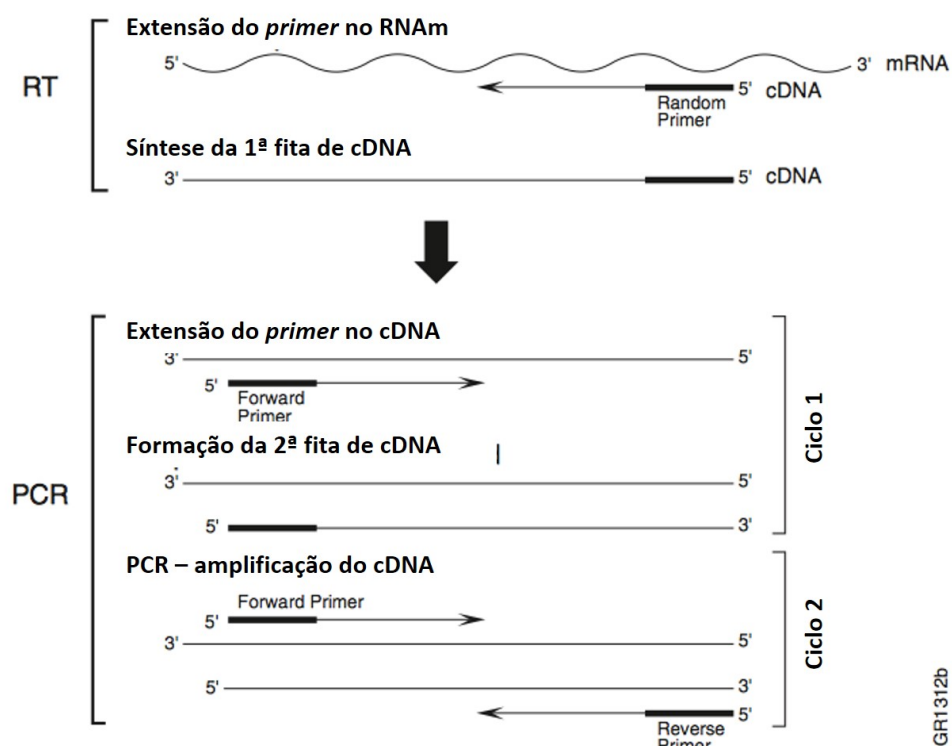


Figura 16 - *Two-step RT-qPCR*. Modificado de manual do usuário – *TaqMan® Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems*.

Uma vez que a técnica de RT-qPCR é utilizada para caracterizar a expressão gênica e comparar níveis de RNA mensageiro (mRNA) entre diferentes grupos (BUSTIN S, 2002), ela permite avaliar o estado transcricional da célula (BUSTIN e NOLAN, 2004); a RT-qPCR utiliza o princípio de geração de sinais fluorescentes dependente da interação entre moléculas: *template* (amostra), *primers* e sondas (*probes*) (BUSTIN S, 2002).

Existem dois tipos de agentes químicos (fluoróforos) utilizados para realizar a RT-qPCR: sondas de hidrólise específicas (que utilizam como princípio a geração de sinal fluorescente apenas quando ocorre hibridização do *amplicon* com a sonda) e agentes ligantes de DNA não específicos (que utilizam como princípio a geração de sinal fluorescente assim que uma fita dupla de DNA é formada) (www.sabiosciences.com; BUSTIN e NOLAN, 2004).

Um dos tipos de sondas específicas para realização da RT-qPCR é a TaqMan[®], a qual apresenta uma molécula chamada de “*reporter dye*” na sua região 5’ final e uma molécula chamada de “*quencher dye*” na sua região 3’ final. Quando essa sonda está intacta, a proximidade dessas duas moléculas resulta na supressão de sua fluorescência. Durante os ciclos da PCR, se houver hibridização entre a sonda e o cDNA alvo, a sonda é clivada por uma DNA polimerase (manual do usuário – *TaqMan[®] Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems*). Com a hidrólise da sonda o *reporter* será separado do *quencher*, ocorrendo troca de energia (*fluorescence resonance energy transfer*) que será detectada na forma de luz pelo aparelho (BUSTIN S, 2002). A Figura 17, a seguir, ilustra o funcionamento da sonda TaqMan[®].

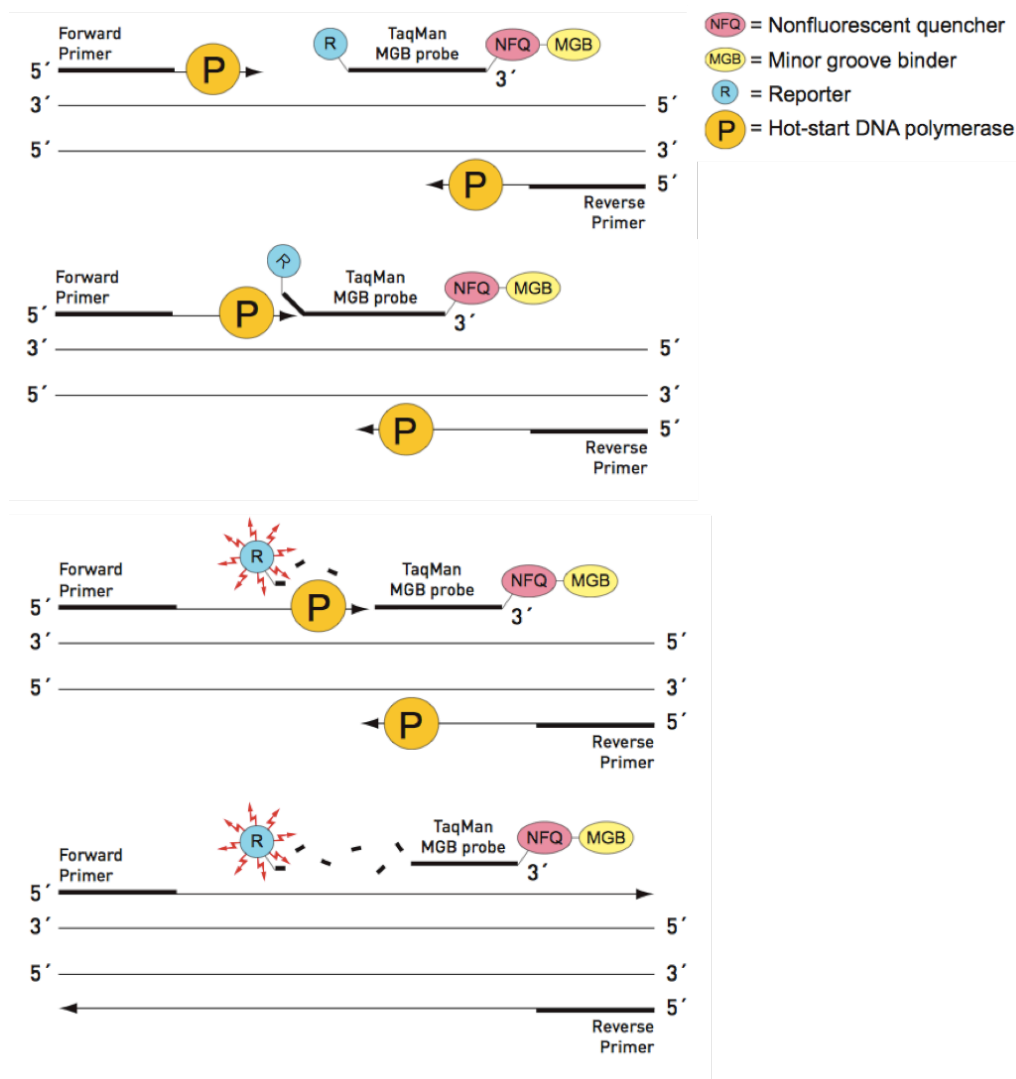


Figura 17 – Princípio molecular de funcionamento das sondas *TaqMan*[®]. Retirado de manual do usuário – *TaqMan*[®] Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems.

Utilizando esse método, a forma mais comum de determinar a quantidade de cópias de *amplicon* que temos na amostra (que, em última análise, reflete o perfil de expressão gênica) é através do chamado *threshold cycle* (Ct), definido como o ciclo em que a fluorescência da amostra excede a fluorescência do *background* (fluorescência basal) (BUSTIN e NOLAN, 2004; UYAR A et al., 2013). Esse valor também pode ser chamado de Cq (*quantification cycle*) ou de Cp (*crossing point*) (BUSTIN S et al., 2009) e é inversamente proporcional à quantidade inicial de *template* da amostra

(www.sabiosciences.com; UYAR A et al., 2013), pois reações com menores quantidades de *template* inicial necessitam de mais ciclos para que a amplificação seja detectada (UYAR A et al., 2013).

Os fluoróforos não específicos, economicamente mais viáveis, ligam-se em qualquer fita dupla de DNA criada durante a reação de PCR e geram, assim, sinal fluorescente. Por ocorrer ligação em qualquer fita dupla formada, é necessário avaliar a curva de desnaturação/dissociação (*melting curve* - T_m) para confirmação do produto (BUSTIN e NOLAN, 2004; UYAR A et al., 2013), que deve apresentar pico único, confirmando a especificidade da amplificação (TONG Z et al., 2009), uma vez que essa curva de fluorescência é formada em função da temperatura e, conseqüentemente, é fortemente dependente da composição dos nucleotídeos (manual do usuário – SYBR® *Green Master Mix*, Applied Biosystems). Ou seja, todos os produtos da amplificação da PCR devem ter sido originados do mesmo *primer* e, conseqüentemente, devem apresentar a mesma composição, resultando em T_m similar (UYAR A et al., 2013). A T_m representa o momento em que 50% das moléculas tornam-se fitas simples, devido ao aumento da temperatura, havendo conseqüente perda de ligação da sonda e diminuição do sinal fluorescente (www.sabiosciences.com). Um exemplo de sonda não específica é a SYBR® Green. Durante a PCR a DNA polimerase irá amplificar a sequência alvo, formando mais *amplicons*. A SYBR® Green irá se ligar a cada nova cópia de fita dupla. Conforme a PCR progride, mais *amplicons* são formados e, uma vez que a SYBR® Green liga-se a eles, há aumento proporcional da intensidade de fluorescência (manual do usuário – SYBR® *Green Master Mix*, Applied Biosystems). A Figura 18, a seguir, ilustra o princípio de funcionamento dessa sonda.

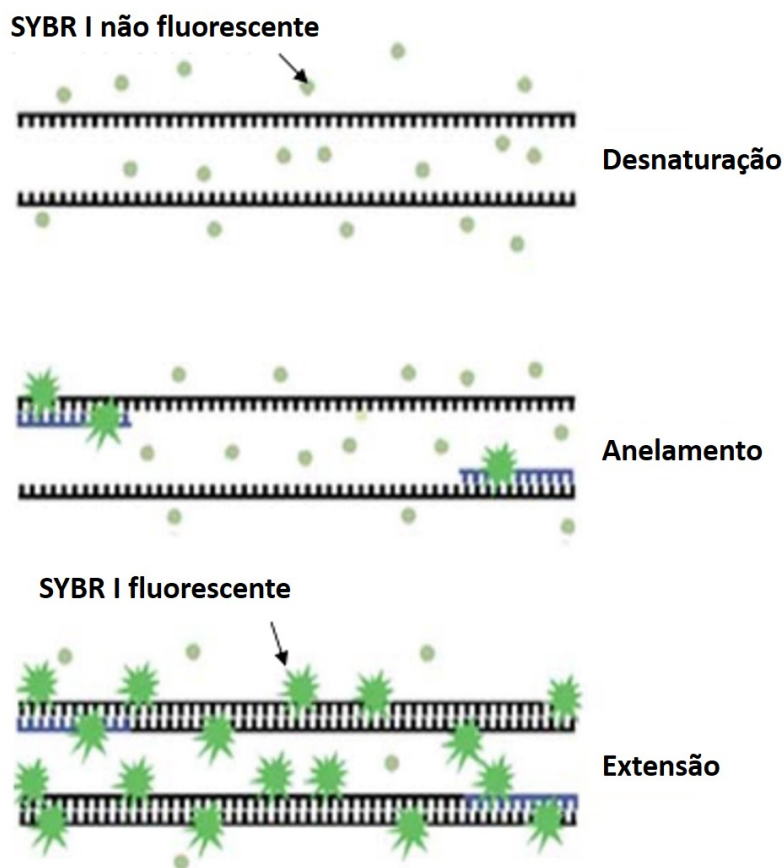


Figura 18 – Princípio molecular de funcionamento das sondas SYBR® *Green*. Modificado de Introduction to Real-Time quantitative PCR (qPCR)/Qiagen- www.sabiosciences.com

Independente do tipo de sonda utilizada, a técnica de RT-qPCR é bastante sensível e, devido a essa sensibilidade, é necessário realizar a sua normalização/correção, a fim de controlar os erros que podem ocorrer em todos os procedimentos que a envolvem (RADONIC A et al., 2004; HUGGET J et al., 2005), como na extração do RNA, na sua transcrição reversa, na sua amplificação, etc. (DHEDA K et al., 2004; BUSTIN S et al., 2009). A variabilidade nos protocolos usados para a aquisição das amostras e para a extração do RNA pode introduzir erros no processo de análise amostral (TRICARICO C et al., 2002), sendo imprescindível, conseqüentemente, técnicas de normalização/correção desses erros.

Muitas estratégias podem ser aplicadas para a normalização dos resultados, dentre elas a utilização da mesma quantidade de amostra entre os grupos, mesma quantidade de RNA ou de DNA genômico e/ou a utilização de genes de referência, podendo estes ser genes internos da amostra (chamados endógenos – controle interno) ou moléculas externas que são adicionadas à amostra (HUGGET J et al., 2005; DE JONG H et al., 2007).

A utilização da mesma quantidade de amostra, apesar de importante, não é suficiente para controlar os erros da RT-qPCR, pois diferentes grupos experimentais com tamanhos similares podem apresentar quantidade diferente de material celular. Adicionalmente, quando se trabalha com cultivo celular, é difícil de estimar o tamanho amostral (quantidade de células), pois células cultivadas podem formar grupamentos (*clumps*) que dificultam a sua contagem – existem enzimas que separam esses grupos, mas elas podem alterar a expressão de certos genes, podendo funcionar como fator de confusão (HUGGET J et al., 2005).

Outra possibilidade de correção dos resultados da avaliação da expressão gênica é através da padronização da quantidade de RNA em cada grupo experimental (HUGGET J et al., 2005; DE JONG H et al., 2007). Existem inúmeros métodos que permitem a quantificação do RNA, sendo que o método de preferência deve ser a quantificação com corantes fluorescentes que se ligam ao RNA, como o Qubit. No entanto, devido à sua praticidade, a técnica mais utilizada para quantificação de RNA é através de avaliação espectrofométrica (BUSTIN S et al., 2009). Devemos salientar que a normalização dos resultados através da utilização de mesma quantidade de RNA não é específica, pois após a extração de RNA menos de 10% da amostra corresponde ao mRNA (DE JONG H et al., 2007). Para sua utilização como método de normalização é imprescindível a utilização de um método extremamente eficaz para a quantificação da amostra (BUSTIN

S, 2002; DHEDA K et al., 2004). Adicionalmente, para sua aplicação devemos partir de duas premissas: primeiro de que temos quantidades significativas de amostra, uma vez que para obtenção de resultados acurados e precisos da quantidade de RNA é necessário grandes quantidades dessa molécula (DE JONG H et al., 2007); e, segundo, de que a transcrição e a subsequente amplificação apresentam eficiência similar para todas as amostras (BUSTIN S, 2002), fato que sabidamente não é completamente verdadeiro, uma vez que muitas substâncias presentes nas amostras biológicas e nos reagentes químicos apresentam influência negativa no processo de RT e/ou no de qPCR, atuando como inibidores e diminuindo a eficiência da reação - esses interferentes são muito difíceis de serem mensurados (BUSTIN e NOLAN, 2004).

Outra abordagem que poderia ser aplicada para a normalização dos resultados dos experimentos utilizando RT-qPCR é a correção pela quantidade de cópias de DNA, uma vez que células que estão se proliferando apresentam maior quantidade de DNA. No entanto, o método de extração de RNA geralmente não é adequado para extração de DNA. Dessa forma, a extração de RNA não garante extração correta de DNA de boa qualidade da amostra (HUGGET J et al., 2005).

A utilização de moléculas externas como normalizadoras é uma abordagem alternativa; elas podem ser adicionadas com uma concentração definida no estágio de extração do RNA e conseqüentemente também estarão sujeitas a todos os erros que podem ocorrer durante o procedimento de RT-qPCR (HUGGET J et al., 2005). No entanto, a utilização de tais moléculas não permite a avaliação de flutuações biológicas inerentes de cada amostra (não reflete a atividade transcricional da amostra), devendo então ser padronizada antes de ser aplicada em cada experimento (RADONIC A et al., 2004; HUGGET J et al., 2005) e, por isso, é dita como abordagem menos adequada

quando comparada com a utilização de controles internos (RADONIC A et al., 2004), discutido a seguir.

Uma vez que as abordagens descritas anteriormente não são eficazes, utiliza-se com maior frequência a avaliação de genes normalizadores internos para a correção dos resultados de expressão gênica. A normalização com genes de referência da própria amostra é utilizada em grande escala por ser um método simples e confiável. Essa estratégia visa a detecção de genes chamados de *housekeeping* (HUGGET J et al., 2005). Esses genes são também conhecidos como genes constitutivos, pois eles estão relacionados com funções metabólicas básicas, provendo suporte durante o ciclo celular – a sua manutenção é imprescindível para a homeostase celular (KHIMANI A et al., 2005).

Idealmente os genes de referência não devem ser regulados ou influenciados pelos procedimentos experimentais (não devem sofrer influências externas ou internas do modelo experimental) e devem ser constantemente transcritos em todos os tipos celulares e tecidos (RADONIC A et al., 2004). A utilização dessa abordagem apresenta como benefício o fato de que tanto os genes alvo como os genes de referência passam pelos mesmos procedimentos - desde a extração de RNA até a sua amplificação (RADONIC A et al., 2004; HUGGET J et al., 2005; TONG Z et al., 2009), permitindo dessa forma correção mais adequada dos resultados.

A utilização dos genes de referência como forma de normalização dos resultados de expressão gênica iniciou-se muito antes do advento da técnica de RT-qPCR. Esses genes eram utilizados como normalizadores de estudos envolvendo *Northern blotting* e RT-PCR convencional, por exemplo. As técnicas antigas de avaliação da expressão gênica eram pouco sensíveis e, por isso, os genes de referência deveriam, idealmente, ser altamente expressos pelos tecidos (HUGGET J et al., 2005). Dessa forma, consagraram-se

como genes normalizadores principalmente a β -actina (*ACTB*), o gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*), a hipoxantina fosforibosiltransferase 1 (*HPRT1*) e o RNA ribossômico 18S (*18S*) (RADONIC A et al., 2004; HUGGET J et al., 2005). Apesar do advento da RT-qPCR, técnica muito mais sensível que as anteriormente descritas, esses genes continuaram sendo utilizados como normalizadores (HUGGET J et al., 2005). No entanto, considera-se inaceitável a escolha de genes de referência de forma cega/indiscriminada, pois muitos estudos já demonstraram que os chamados “genes normalizadores clássicos”, alguns descritos acima, são muitas vezes inadequados por apresentarem grande variabilidade.

Podemos tomar como exemplo os resultados de Glare e colaboradores (2002) e os de Dheda e colaboradores (2004), que demonstraram ser a expressão gênica de *GAPDH* e de *ACTB* muito variável em seus modelos experimentais. Resultados semelhantes, indicando a não adequação desses dois genes como normalizadores, também foram observados em modelo vegetal (TONG Z et al., 2009). Adicionalmente, Radonic e colaboradores (2004) demonstraram que a expressão dos “genes normalizadores clássicos” *GAPDH*, *ACTB* e fosfolipase A2 (*PLA*) são regulados por estimulação mitogênica, sofrendo, assim, influência de fatores experimentais. Esse estudo indicou como gene normalizador mais adequado o RNA polimerase II (*RPII*), o qual foi expresso em 16 tipos diferentes de tecidos e apresentou menor alteração frente à manipulação experimental.

Corroborando estes achados, de Jonge e colaboradores (2007) encontraram drástica flutuação na expressão dos “genes normalizadores clássicos” *GAPDH*, *HPRT1* e β 2-microglobulina (*β 2M*); dentre eles apenas o *ACTB* mostrou-se adequado (no entanto, apresentou piores resultados quando comparado com outros genes). Neste trabalho, nenhum dos “genes normalizadores clássicos” ficou na lista dos 50 melhores

normalizadores – os melhores genes foram os que estavam relacionados com RNA ribossomal (rRNA). Entretanto, é preciso salientar que para permitir a utilização de rRNAs como normalizadores a transcrição reversa não pode ser feita com oligo(dT), técnica mais utilizada na literatura, visto que essa molécula permite a amplificação apenas de mRNA, pois esses apresentam cauda poli-A (RADONIC A et al., 2004; DHEDA K et al., 2004).

Utilizando o mesmo modelo experimental que o desta Tese (células do *cumulus oophorus*), Ekart e colaboradores (2013) mostraram que o gene da proteína ribossomal 60S L19 (*RPL19*) é mais adequado como normalizador do que o *18S*, através de utilização da sonda SYBR® Green. No entanto, é preciso salientar que o grupo comparou apenas esses dois genes. Os autores ressaltaram a importância de padronizar os resultados de expressão gênica (utilizando genes de referência) ao demonstrarem que 99,7% dos complexos *cumuli-oophorus* recuperados das pacientes apresentam composição bastante diferente, inclusive quanto à expressão gênica, pois o tratamento exógeno com as gonadotrofinas não sobrepõe por completo o padrão hierárquico do desenvolvimento folicular – a estimulação ovariana não permite perfeita sincronia no desenvolvimento dos folículos e, conseqüentemente, cada folículo se desenvolve de forma independente, apresentando, muitas vezes, diferentes padrões de expressão gênica (EKART J et al., 2013).

Estudo com sangue periférico e com cultivo de células sanguíneas mononucleares indicou como melhor normalizador o gene da proteína ácida ribossomal humana (*HuPO*), ao comparar 12 genes. Interessante foi o fato de que o gene *HPRT1*, descrito anteriormente como “gene normalizador clássico”, mostrou-se adequado apenas para o modelo de cultura celular e não para o modelo de sangue total, indicando a necessidade de padronização do gene de referência para cada tipo amostral (DHEDA K et al., 2004).

Outro fator que deve ser lembrado ao selecionar o gene normalizador é a intensidade de sua expressão. Essa variável não depende apenas do gene, mas também da amostra, confirmando a necessidade de padronização do gene de referência para cada modelo experimental. Dheda e colaboradores (2004) demonstraram que a expressão gênica da cultura de células sanguíneas mononucleares foi inferior à observada no sangue total periférico - para a cultura celular quase todos os genes apresentavam Cts maiores que 30. Radonic e colaboradores (2004) dividiram os genes normalizadores em dois grupos: genes com alta expressão (Cts abaixo de 30), grupo que incluiu os genes da proteína ribossomal L13 (*L13*), *GAPDH*, alfa-tubulina (*TUB*), *ACTB*, *B2M*, peptidil proil isomerase A (*PPIA*) e *PLA*; e genes com baixa expressão (Cts acima de 30), grupo que incluiu os genes da albumina (*ALB*), TATA-box (*TBP*), porfobilinogênio deaminase (*PBGD*), *RPII*, *G6PDH* e *HPRT1*. É preciso salientar o fato de que, assim como o *HPRT1* (no ovário, por exemplo), a expressão de alguns genes não pode ser detectada em alguns tecidos. Nesse trabalho os genes mais indicados como normalizadores foram o *G6PDH* e o *RPII* (RADONIC A et al., 2004).

Tratando-se de biologia, sabemos que, mesmo a expressão dos chamados genes de referência sofre flutuações de acordo com o estado nutricional da célula, por exemplo. Por isso é de extrema importância padronizar qual gene é o que sofre menor flutuação de acordo com o modelo experimental proposto, ou seja, aquele que é minimamente regulado pelo modelo, permitindo maior acurácia nas análises (RADONIC A et al., 2004). Caso o gene escolhido para ser utilizado como normalizador apresente níveis muito flutuantes entre as amostras, pequenas diferenças entre a expressão do gene alvo não serão observadas e os resultados não serão confiáveis. Dessa forma, a validação dos genes de referência é crucial a fim de evitar interpretações equivocadas (DHEDA K et al., 2004).

É esperado, idealmente, que os pesquisadores escolham o gene de referência utilizado em seus experimentos através da comprovação de que o gene selecionado é o mais adequado para o modelo experimental empregado (HUGGET J et al., 2005; DE JONG H et al., 2007).

Podemos avaliar como indicadores da estabilidade da expressão gênica o coeficiente de variação (CV), que deve ser o menor possível, e o *maximum fold change* (MFC), que idealmente não deve apresentar valor superior a dois (DE JONG H et al., 2007). O CV indica a variação no nível de expressão entre as amostras (RADONIC A et al., 2004). O MFC, por sua vez, demonstra a quantidade de transcritos de acordo com uma amostra que é utilizada como calibradora (DHEDA K et al., 2004). É imprescindível a utilização de uma amostra calibradora nos experimentos de RT-qPCR, uma vez que a quantificação do mRNA não é feita de forma absoluta, e sim de forma relativa (BUSTIN S et al., 2009).

Existem inúmeros programas que utilizam modelos matemáticos para aferição do melhor gene normalizador. Dentre esses programas encontra-se o *GeNorm*, que indica uma combinação de dois genes normalizadores que, quando avaliados em conjunto, apresentam menor variabilidade entre amostras. Esse programa calcula a estabilidade da expressão gênica (M), dividindo a média da variação da combinação de determinados genes com a média de variação de outras combinações (esse valor deve estar entre 0,5 e 1, a fim de ser considerado ideal, mas pode ser aceito quando seu valor for até 1,5); logo, a combinação de genes que apresentar menor M é considerada como a melhor combinação de endogenes (TONG Z et al., 2009). Esse programa é bastante indicado, pois sabe-se que, a fim de refinar o processo de correção dos resultados, é aconselhada sempre a utilização de dois genes normalizadores (TRICARICO C et al., 2002; BUSTIN e NOLAN, 2004; HUGGET J et al., 2005). No entanto, sabemos que, devido à quantidade de

amostra, muitas vezes essa abordagem não é possível (HUGGET J et al., 2005), sendo utilizado apenas um gene como normalizador. Por outro lado, poderia ser questionada a utilização de um terceiro gene constitutivo, a fim de aumentar ainda mais a eficácia da análise dos dados. No entanto, já foi demonstrado que essa abordagem não contribuiu de forma significativa para o fator de variação da normalização (TONG Z et al., 2009), sendo por isso uma abordagem não necessária. Dessa forma, a normalização com apenas um gene de referência pode ser utilizada, uma vez que o pesquisador comprove através de experimentos que sua utilização é adequada; de forma contrária, devem ser utilizados dois genes (BUSTIN S et al., 2009).

Outro programa que permite a avaliação de genes normalizadores é o *NormFinder*, o qual realiza estimações intra- e intergrupos, onde genes com maior estabilidade em sua expressão apresentam menores médias nos seus valores de estabilidade (TONG Z et al., 2009). Esse algoritmo utiliza abordagem de comparação baseada em modelo matemático (diferente da abordagem de comparação baseada em emparelhamento) e, por isso, é descrita como mais adequada por alguns autores (ANDERSEN C et al., 2004).

Apesar das inúmeras ferramentas que temos para avaliação do melhor gene normalizador, através de cálculos e modelos matemáticos, não há consenso de qual é a melhor ferramenta, uma vez que cada uma delas é baseada em diferentes algoritmos (TONG Z et al., 2009).

Até o presente momento, a utilização de normalizadores internos é considerado o padrão ouro para normalizar experimentos que avaliam conteúdo de mRNA (DE JONG H et al., 2007). Levando em consideração o embasamento teórico descrito até aqui, podemos concluir que, idealmente, devemos utilizar o mesmo número amostral, garantir boa qualidade do RNA e utilizar a mesma concentração de RNA para execução

da transcrição reversa e, posteriormente, utilizar controles internos (adequados) a fim de garantir resultados confiáveis em estudos com expressão gênica. A Figura 19, a seguir, ilustra os pontos de controle que devem ser aplicados quando executado RT-qPCR (HUGGET J et al., 2005).

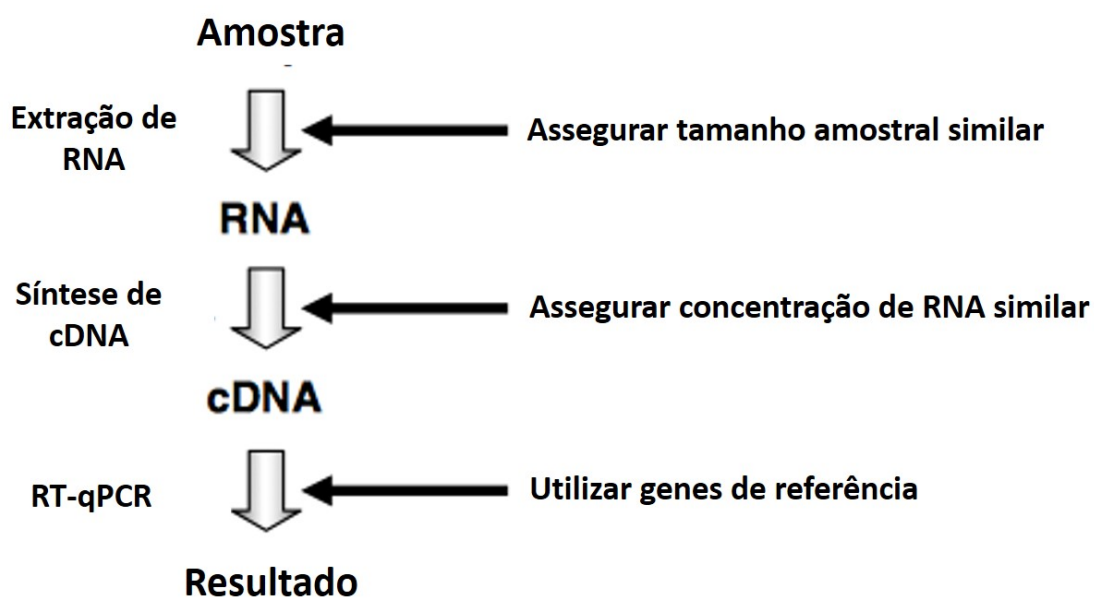


Figura 19 – Estratégias de normalização para experimentos com RT-qPCR (as setas negras indicam as estratégias que podem ser utilizadas). Modificado de HUGGET J et al. 2005.

5. Objetivos Gerais e Específicos

5.1 – Avaliar a segurança da aplicação do corante Azul Cresil Brilhante (BCB) na espécie humana, utilizando como modelo experimental o cultivo primário de células foliculares ovarianas luteinizadas (GCs e CCs);

5.1.1 Padronizar/Estabelecer o modelo de cultura primária de células foliculares ovarianas em nosso Laboratório (Artigo 1);

5.1.2 Caracterizar o modelo de cultura primária de células foliculares ovarianas (Artigo 2);

5.1.3 Padronizar o protocolo de aplicação do BCB com menor influência sobre a viabilidade das células foliculares ovarianas (Artigo 3);

5.1.4 Avaliar a inocuidade da aplicação do BCB sobre células foliculares ovarianas (Artigo 4);

5.2 – Avaliar a expressão gênica e proteica da via de sinalização AKT/mTOR/S6K/FMR1 na presença de FSH ou de inibidores da proliferação em modelo de linhagem de células foliculares (Artigo 5).

6. Hipóteses

Esta Tese apresenta duas principais hipóteses conceituais (baseadas nos dois objetivos gerais apresentados anteriormente – itens 5.1 e 5.2): a primeira hipótese é a de que a aplicação do corante BCB é seguro para a espécie humana, através da demonstração de sua segurança no modelo de cultura primária de células foliculares ovarianas luteinizadas; a segunda hipótese é a de que o controle da proteína FMRP nas células foliculares ovarianas de humanos envolve a via proliferativa S6K, assim como observado por vários autores que avaliaram o seu controle em neurônios.

7. Resultados

7.1 - Artigo 1: "*Morphology of human mural granulosa and cumulus cells*"

Publicado na Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre / Imagem Diagnóstica, v. 32, n. 3, p. 382, 2012.

MORFOLOGIA DE CÉLULAS MURAI DA GRANULOSA E DO *CUMULUS OOPHORUS*

MORPHOLOGY OF HUMAN MURAL GRANULOSA AND CUMULUS CELLS

Diego Duarte Alcoba¹, Stefan Gödde², Gustavo Dias Ferreira¹, Anita Mylius Pimentel³, Ana Paula Kussler³, Edimárlei Gonsales Valério⁴, Helena von Eye Corleta⁴, Ilma Simoni Brum¹

Revista HCPA. 2012;32(3):382

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

² Hochschule Hamm-Lippstadt, Alemanha.

³ Núcleo de Reprodução Humana Gerar.

⁴ Serviço de Ginecologia e Obstetrícia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Contato:

Diego Alcoba
alcobadiego@hotmail.com
Porto Alegre, RS, Brasil

Existem diferenças entre a morfologia das células somáticas que constituem o folículo ovariano. As células murais da granulosa e do *cumulus oophorus* foram coletadas de pacientes que realizaram tratamento de Reprodução Assistida no Núcleo de Reprodução Humana Gerar e foram cultivadas, por 5 dias, no Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Como ilustrado na Figura, as células murais apresentam morfologia alongada, são uninucleadas com bordos delimitados e proliferam em clusters (grumos de células). Nas culturas desse tipo celular há maior presença de hemácias, as quais permanecem até a segunda troca do meio de cultivo. A presença de hemácias no líquido folicular é comum secundária a punção ovariana. Por outro lado, as células do *cumulus oophorus* apresentam morfologia bastante diferenciada quando comparadas as células da granulosa, têm crescimento mais lento ao redor de um centro germinativo, sem evidência de clusters como observado nas células murais. Adicionalmente, as células da *cumulus* apresentam formato triangular com prolongamentos que se aderem à placa de cultivo, são células uninucleadas com bordos delimitados. Não existe contaminação hemática porque as células envolvem o oócito. A cultura das células somáticas do folículo ovariano demonstra sua diversidade morfológica, o que é compatível com a função que desempenham: as murais são fundamentais na esteroidogênese, enquanto as do *cumulus* têm papel essencial no crescimento e desenvolvimento do ovócito.

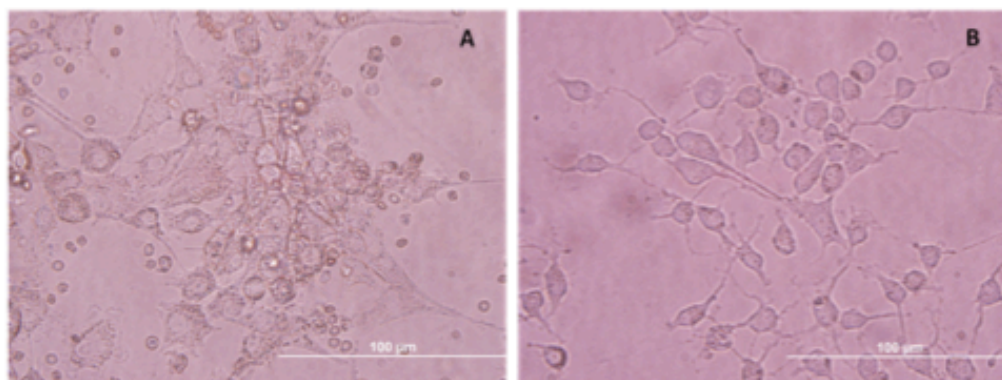


Figura 1 - Células da granulosa cultivadas por 5 dias em meio DMEM high glicose com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina e 75 U.I. de FSH/LH.
(A) Células murais - (B) Células do cumulus oophorus.

7.2 - Artigo 2: *“Experimental standardization of human ovarian follicular cells”*

Artigo com intenção de submissão para a revista *“Molecular Reproduction and Development”*.

Experimental standardization of human ovarian follicular cells

Running Title: Primary culture of ovarian follicular cells

Diego Duarte Alcoba^{1,2}, Júlia Schneider¹, Amanda de Barros Machado¹, Julia Rehnitz², Peter H Vogt², Edison Capp^{3,4}, Helena von Eye Corleta³, Thomas Strowitzki⁴, and Ilma Simoni Brum^{1*}

¹ Department of Physiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90050 - 170, Porto Alegre, Brazil;

² Reproduction Genetic Unit, Department of Gynecological Endocrinology and Reproductive Medicine, University Women's Hospital 69120, Heidelberg, Germany;

³ Service of Gynecology and Obstetrics, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 90035 - 903, Porto Alegre, Brazil;

⁴ Department of Gynecological Endocrinology and Reproductive Medicine, University Women's Hospital 69120, Heidelberg, Germany.

*** Correspondence:**

Prof. PhD Ilma Simoni Brum

Department of Physiology

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Sarmiento Leite, 500

CEP: 90 050-170, Porto Alegre, RS

E-mail address: ilma@ufrgs.br

Tel: + 55 51 3308-3559

Abstract

The primary culture of ovarian follicular cells, granulosa cells (GCs), and *cumulus* cells (CCs), is considered a suitable experimental model for many studies about human reproduction, not only because these cells can be easily accessed but also because they can be used to elucidate many ovarian mechanisms. Nowadays, real-time PCR and western immunoblotting are the most frequently used techniques for the quantification of mRNA and protein, respectively. However, the standardization of genes and proteins used to normalize the results is mandatory in order to achieve an accurate and reliable comparison of mRNA and protein between different samples. In order to identify the best housekeeping gene and protein loading control, we first of all characterized a GC primary culture using immunocytochemistry for FSH receptor and pan-cytokeratin. Additionally, we checked the hormonal dosage (estradiol and progesterone) released by ovarian follicular cells. After obtaining positive results for the above-mentioned analysis, proving that we were working with the correct cell model (ovarian follicular cells), we analyzed the expression of five different genes and four different proteins, described in the literature as good housekeeping genes and protein loading controls. Among the genes analyzed, the combination of *ACTB* and *HPRT1* presented the best results and consequently, these two reference genes are recommended as the most suitable for primary culture of human luteinized follicular cells. Among the proteins, α -actinin, β -tubulin, and β -actin presented good results and are therefore recommended as suitable protein loading controls. These results should facilitate future experiments designed with primary culture of human luteinized follicular cells.

Keywords: *Cumulus* cells; granulosa cells; normalization; real-time PCR; western immunoblot.

Introduction

The dominant ovarian follicle is a mixture of different cell types (Chronowska 2014). Among them, follicular cells are widely used for studies about human assisted reproduction, as they are considered by-products of these techniques and are routinely discarded (Winterhager and Kidder 2015). Although granulosa and *cumulus* cells (ovarian follicular cells) share a common origin at the early follicular stage, they can be distinguished in the dominant follicle by their localization: granulosa cells (GCs) form the follicle's wall, while *cumulus* cells (CCs) surround the oocyte (Chronowska 2014). It should be pointed out that not only the localization but also some molecular structures are different between them. Additionally, controlled ovarian hyperstimulation (COH) with exogenous gonadotropins does not overlap with the hierarchical pattern of follicular development and it reflects in the biochemical and structural composition of the *cumulus*-oocyte complex (COCs), which can vary within a cohort of COCs collected from the same patient. For this reason, it is mandatory that studies applying this cell model standardize the methods of cell analysis (Ekart et al. 2013).

The transcriptome and the metabolome of these two somatic cell types have been widely used for screening potential biomarkers of oocyte quality (Ashry et al. 2015; Fragouli et al. 2014; Tanghe et al. 2002) and for understanding ovarian processes such as folliculogenesis (Vireque et al. 2015). GCs are easily accessible after oocyte retrieval, but the sample is usually contaminated with blood. The cellular content of follicular aspirates consists of GCs (single and in *clumps*), COCs, leucocytes, ovarian interstitial cells, and a large number of epithelial cells (Neubourg et al. 1996). On the other hand, the retrieval of CCs is relatively easy to perform and does not present many contaminants, as these cells are physically connected to the egg (Uyar et al. 2013).

Taking into account the aforesaid realities, the first objective of this study was to prove that the method of GC retrieval used by our group is efficient and allows the culture of epithelial granulosa cells. The second objective was to compare differences in proliferation rate and cellular viability between CCs and GCs in order to highlight the dissimilarities between these two cell models. The third and last objective was to describe the best reference gene and the most suitable loading protein control for the primary culture of human luteinized follicular cells.

Results

Immunocytochemistry

The GC culture presented a positive fluorescent signal for FSH receptor (FSHR), pan-cytokeratin, and DAPI, as shown in Figure 1, demonstrating that we were working with granulosa cells and not with contaminants recovered during oocyte retrieval.

Hormonal dosages

Estradiol and progesterone were present in the supernatant of follicular cell culture and could be measured. All progesterone dosages were higher than the detection limit (>60 ng/mL), not only for GCs but also for CCs. Estradiol released by GCs and CCs presented a mean of 67.9 and 91.9 pg/mL, respectively.

Cellular viability (MTT assay) / proliferation rate (Trypan blue)

The proliferation rate did not differ between granulosa and *cumulus* cells ($5.942 \pm 0.88 \times 10^4$ cells/mL and $5.687 \pm 0.87 \times 10^4$ cells/mL, respectively). On the other hand, cellular viability was higher in CCs (0.0897 ± 0.006), when compared with GCs (0.0659 ± 0.004).

Cellular viability and proliferation were moderately correlated in GCs ($P = 0.007$; $R = 0.36-0.67$), but this correlation was not observed in CCs ($P = 0.768$), as shown in Figure 2.

Housekeeping genes

To identify the most suitable reference gene (s) for primary culture of human luteinized follicular cells, we amplified five different genes, commonly used as *housekeeping genes*. The mean quantification cycle (Cq) of each gene showed that they present different expression levels, as shown in Figure 3. Among the genes we evaluated, *GAPDH* gene expression was the highest, not only for GCs but also for CCs (represented as the lowest Cq value). On the other hand, *HPRT1* and *B2M* presented the lowest gene expression level for GCs and CCs, respectively, represented as the highest Cq value. *Maximum fold change* (MFC – the ratio of the maximum and minimum values) was lower than 2 for all genes, demonstrating their expression stability, as shown in Table 2. Cq, MFC and coefficient of variation (CV) are shown in Table 2, in order of ascending CV. These values represent the first analysis of dispersion data and suggest the least variable gene. Nevertheless, as observed in Figure 3 and Table 2 and mentioned before, none of the evaluated genes were expressed at a constant level, which may indicate that the data dispersion is not sufficient to identify a suitable *housekeeping* gene. Therefore, we evaluated the results using *NormFinder* for quantification data. This algorithm estimates the inter- and intragroup variation in the expression of each candidate gene, considering systematic differences between sample subgroups. The inter- and intragroup stability variations from each gene are shown in Figures 4 and 5, respectively. As observed in both cell types, *B2M* presented the highest variation.

For GCs, *NormFinder* indicated *ACTB* to be the most suitable *housekeeping* gene when both groups (control and treated with BCB) were analyzed together (it presented the lowest stability value: 0.192). However, the combination of *ACTB* and *HPRT1* presented better results (stability value: 0.146), as shown in Table 3.

For CCs, *NormFinder* indicated *HPRT1* to be the most suitable *housekeeping* gene when both groups (control and treated with BCB) were analyzed together (it presented the lowest stability value: 0.140). As observed for GCs, the combination of *ACTB* and *HPRT1* presented better results (stability value: 0.111), as shown in Table 3.

Housekeeping proteins

To identify the most suitable loading protein control for primary culture of human luteinized follicular cells, we evaluated four different proteins that are commonly used as *housekeeping* proteins. The mean ratio and standard deviation between the immunodetection and Ponceau S staining among control and treated GCs and CCs are presented in Figures 6 (β -tubulin), 7 (β -actin), 8 (α -actinin), and 9 (GAPDH) and summarized at Table 4. As we can observe, α -actinin, β -actin, and β -tubulin presented suitable results for CCs and for GCs, independent of treatment (mean ratio near to one and small standard deviation). On the other hand, GAPDH presented the highest standard deviation for GCs (control and treated group).

Discussion

In order to study ovarian mechanisms, human follicular cells are widely employed. For this purpose, we chiefly have two different possibilities: the culture of follicular immortalized cell lines collected from cancer or infertile patients (Zhang et al. 2000) and primary ovarian cell culture. The latter presents as an advantage the fact that the cells are physiologically healthy. On the other hand, as a disadvantage, primary ovarian follicular cell culture presents cellular contaminants, mainly in the GC model. Even if density gradients are applied, GCs still have an important number of granulocytes (Neubourg et al. 1996) and according to the manner in which these cells are collected and purified, cellular contamination can strongly influence the outcomes.

The results of the current study demonstrated that using an appropriate protocol for GCs isolation (mentioned in the Material and Methods section), it is possible to get a correct GC primary culture. Our GC culture presented not only positive fluorescent signal for FSHr and pan-cytokeratin but also positive results for estradiol and progesterone secretion and this measure is an important parameter of viable ovarian follicular cells (Wen et al. 2010). Followed by FSH and LH stimulation, follicular cells are able to secrete not only 17- β estradiol but also progesterone (Erickson et al. 1974) and for that reason, the measurement of these hormones in the supernatant is a suitable way to verify the quality of a primary culture of ovarian follicular cells. As expected in our experiment, progesterone levels presented very high values because GCs collected from assisted reproduction treatment exhibit features of the luteinization process, such as high progesterone production, as LH or analogues are applied in order to obtain a mature oocyte (Ophir et al. 2014; Vireque et al. 2015). Similar results were found for CC cultures, corroborating the idea of the purity of this model.

Additionally, it is well known that after *antrum* formation, follicular cells differentiate and gonadotropin receptors appear on the cells, characterizing the follicular cell model (Erickson et al. 1974). As expected, when the method of GC retrieval mentioned before was applied, they presented a positive fluorescent signal for FSHr (characteristic of ovarian follicular cells) and for pan-cytokeratin (characteristic of epithelial cells). Taking into account the previously mentioned results, we can conclude that we were working with the correct cell model.

It should be noted that in spite of the fact that GCs and CCs present many similarities, they are morphologically different (Ophir et al. 2014), and they should be chosen as experimental, depending on the endpoints required for the study. Nevertheless some authors only describe them using the general term “follicular cells”. In order to highlight the dissimilarities between primary cell cultures of these two cell types, we showed that cellular viability was different between them. The MTT assay results indicate that CCs are

metabolically more active than GCs, and the results of trypan blue staining show a similar proliferation rate between them. Consequently, we should emphasize that, contrary to the statements made by some authors, these two parameters were not correlated for all cells - only in the case of GCs.

Once a difference between GCs and CCs was demonstrated, the best *housekeeping* gene and protein for each cell model was described. We chose brilliant cresil blue (BCB) dye to treat our cells in order to obtain a control and an experimental group. This substance was chosen for its wide application in animal reproduction, but its application in humans is still restricted because its safety has not yet been proven and its results have been questioned (Abazari-Kia et al. 2014; Ashry et al. 2015).

Gene expression analysis, via examination of mRNA content, is a good tool for evaluating the cellular condition and for comparing different treatments, as it can reflect the effects of molecules on cellular function (Uyar et al. 2013). Among the techniques used for this purpose, qRT-PCR is considered the gold standard because it is easy to perform and provides accurate and sensible results (Huggett et al. 2005). Due to the fact that qRT-PCR is very practical, performing normalization/correction of the results is mandatory (Huggett et al. 2005; Radonic et al. 2004). Among the normalization strategies, the most frequently applied is the use of reference genes as endogenous controls for the relative quantification of target genes. This approach is simple and trustworthy (Huggett et al. 2005) because not only the target gene but also the *housekeeping* gene pass through the same conditions during all experimental steps (Huggett et al. 2005; Radonic et al. 2004; Tong et al. 2009). The most common *housekeeping* genes used in basic research are *ACTB*, *GAPDH*, *HPRT1*, and *18S* because they are highly expressed (Huggett et al. 2005; Radonic et al. 2004). However, the *classical* endogenous control has been questioned, as many authors have already demonstrated that *GAPDH* and *ACTB* gene expression, for example, is not as constant as expected and their expression can be modulated by experimental influences (Glare et al. 2002;

Radonic et al. 2004; Tong et al. 2009). For these reasons, *housekeeping* gene selection at random is not acceptable any more and the most suitable *housekeeping* gene must be investigated for each experimental model (de Jonge et al. 2007; Dheda et al. 2004). The results of the current study demonstrated that among five different *classical housekeeping* genes, only *HPRT1* or the combination of *ACTB* with *HPRT1* are suitable for normalization of results from primary culture of human luteinized follicular cells.

Corroborating previous studies, *GAPDH* presented high gene expression, whereas *HPRT1* presented low expression (Radonic et al. 2004). We have to take into account that gene expression intensity is an important factor for qRT-PCR and ideally, the evaluated genes should present gene expression within a suitable range (Dheda et al. 2004).

Different algorithms are used to identify gene expression stability and to indicate the best endogenous control. However, most of them present similar results (Radonic et al. 2005) and the use of only one is recommended (Wan et al. 2011). There is nothing to indicate which software is the best because they apply different algorithms (Tong et al. 2009) and in this study, we decided to use *NormFinder*, since it applies a model-based comparison approach, which provides a more accurate expression stability measurement than does the pairwise comparison approach (Andersen et al. 2004).

For GCs, the program indicated that *ACTB* presented the lowest variation in expression when control and treated cells were analyzed together (Table 3). As seen in Figure 5, the intragroup variation in *ACTB* gene expression was the lowest among the evaluated genes, demonstrating that this gene sustained the lowest impact of experimental treatment. On the other hand, the intergroup variation (Figure 4), also called biological variation (from patient to patient) reveals that this gene is not expressed at a constant level. One of the reasons for this may be that the patients allocated to our study used different methods of controlled ovarian hyperstimulation, and this can influence gene expression in their follicular cells (Grondahl et al. 2009). Additionally, for GCs, the program indicated that the *ACTB* and

HPRT1 combination presented the lowest stability value (*i.e.*, the lowest variation in gene expression). Taking into account the aforementioned results, we can conclude that maybe none of the mentioned genes alone are good *housekeeping* genes and for GCs, the use of two endogenous controls is necessary. This result is in accordance with a previous study, showing that none of the *classical housekeeping* genes were ranked in the “top 50”. Among the *classical housekeeping* genes, *ACTB* was the most suitable, but it did not present optimal results on its own (de Jonge et al. 2007).

The idea of using two different *housekeeping* genes, described before, is in accordance with the literature, which indicates that the use of two different *housekeeping* genes improves the normalization (Huggett et al. 2005; Tricarico et al. 2002). However, we cannot forget that this approach presents, as a disadvantage, the need for a larger quantity of sample and therefore, it is sometimes not possible (Huggett et al. 2005).

For CC, the software indicated *HPRT1* as the most stably expressed gene and, in that case, it presented low intra- and intergroup variation (Figures 4 and 5). This gene presented alone a suitable stability value but, as observed for GCs, the combination of two genes (*ACTB* and *HPRT1*) yielded better results. Therefore, we can conclude that for CC, it is possible to use only one *housekeeping* gene (*HPRT1*), but the use of two (*ACTB* and *HPRT1*) will improve the accuracy of the results.

To the best of our knowledge, there is no information in the literature indicating the best endogenous control for the primary culture of human luteinized follicular cells. The gene most commonly used as a calibrator for follicular cells is *GAPDH* (Uyar et al. 2013), but no scientific explanation has been given for this choice. Using the same experimental model, a previous study indicated *RPL19* as a suitable *housekeeping* gene, but the authors compared only two different genes - *RPL19* and *18S* (Ekart et al. 2013).

For measuring protein content, western immunoblot is a powerful technique. Similarly to qRT-PCR, *housekeeping* proteins are widely used as loading controls, because they are

considered to be constitutively expressed (Welinder and Ekblad 2011). The most common *housekeeping* proteins used are β -actin, GAPDH, and β -tubulin (Rivero-Gutierrez et al. 2014; Welinder and Ekblad 2011) but, as described for genes, individual loading control proteins can be subject to variation in certain biological situations (Rivero-Gutierrez et al. 2014) and their stability has to be evaluated. Another possibility for normalization of protein analysis is the use of the total amount of protein transferred to the blot membrane, checked by dyes, such as Ponceau S and Coomassie brilliant blue. The normalization of protein analysis based on this approach does not allow the assessment of biological fluctuations inherent in each sample (do not reflect the translational activity of each sample). That is the reason why some reviewers require the use of a *housekeeping* protein. Unfortunately, there is no software to detect the best *housekeeping* protein (as described for *housekeeping* genes); therefore, we were looking for proteins that presented the lowest standard deviation and mean ratio values closest to one. Among the evaluated proteins, all of them presented suitable results, but GAPDH was the one that showed the highest variation (mainly in GCs). It is in accordance with the theory that GAPDH presents extraglycolytic functions, such as in cell death control and cell proliferation (Chen et al. 1999; Nicholls et al. 2012). The idea of applying GAPDH as a *housekeeping*, not only for the gene but also for the protein, is based on its main glycolytic function, as it is one important enzyme for ATP production and pyruvate through anaerobic glycolysis (Nicholls et al. 2012). However, nowadays, many extraglycolytic functions have already been described.

The other analyzed proteins (α -actinin, β -tubulin, and β -actin) presented suitable results for all groups and cells. When selecting the loading protein control, we have to consider the protein molecular weight, in order that it does not overlap with the target protein (Welinder and Ekblad 2011). Consequently, we encourage authors who want to perform normalization of protein analysis using a protein loading control to use α -actinin, β -actin, or β -tubulin, on the basis of the target protein weight.

Taking into account our results and discussion, based on the literature, we encourage authors to describe GCs and CCs differently. They might choose them according to experimental goals. Additionally, we propose that the combination of two genes (*ACTB* and *HPRT1*) should be used as endogenous controls in gene expression experiments and that α -actinin, β -tubulin, or β -actin should be used as *housekeeping* proteins for western immunoblot experiments that apply primary culture of human luteinized follicular cells.

Material & Methods

This study was approved by the Institutional Ethical Committee of the *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* (#14-0113). Forty-five patients (age between 25 and 45) who underwent COH and signed an informed consent form were included in this study. We did not include patients with polycystic ovarian syndrome (PCOS) or patients with fewer than three aspirated follicles.

Granulosa and *cumulus* cells were collected as previously described (Alcoba et al. 2016). Briefly, COCs were isolated from the aspirated follicular fluid and CCs were recovered after oocyte denudation by enzymatic treatment with hyaluronidase solution (Irvine Scientific). CCs were resuspended in 2 mL of culture medium, counted in a hemocytometer and then plated in cell culture plates. GCs were recovered from the aspirate from pooled oocytes (without COCs). The follicular fluid was centrifuged for 15 min (800 g) and the pellet was added to 2 mL of a 50% density gradient (Isolate HEPES from Irvine Scientific) and centrifuged over again for 8 min (800 g). Intermediate phase containing GCs was added to 2 mL of 50% density gradient and centrifuged again (for 8 min at 800 g). The purified GC preparation was resuspended in 8 to 10 mL of culture medium, counted in a hemocytometer and then plated. GCs and CCs were separately cultivated under specific conditions (at 37 °C in 100% relative humidity and 5% CO₂ atmosphere in air) using Dulbecco's Modified Eagle

Medium (DMEM) with phenol red (Sigma, D5796) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco 12657-029), 75 m IU of FSH and 75 m IU LH (Gonal, Merk Serono), and 1% kanamycin sulfate (Gibco, 15160-054). After 48 h of cell culture, cells were exposed for 60 min to BCB (Sigma, B5388) solution diluted to 13 μ M in modified Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (mDPBS) supplemented with 10% fetal bovine serum, 75 m IU of FSH and LH, and 1% of kanamycin sulfate. The control group was exposed to fresh medium only. After treatment, cells were cultivated for a further 48 h and gene and protein expression were examined. For immunocytochemistry, hormonal dosages, and proliferation/viability assays, there was no treated group.

Immunocytochemistry

Approximately 1×10^5 GCs were plated in a 6-well plate (2 mL of medium/well). After four days of cell culture (without any treatment), cells were fixed with 4% paraformaldehyde (pH 7.4) for 1 h at room temperature, washed with washing solution (bovine serum albumin 0.1% diluted in DPBS) and permeabilized with 0.1% sodium citrate and 1% Triton X-100 at 4 °C for 15 min. After permeabilization, cells were washed and incubated with antibodies anti-pan cytokeratin (Abcam, ab78478), anti FSH receptor (Abcam, ab103874), and DAPI (Abcam, ab104139) for 30 min at room temperature.

Hormonal dosages

Approximately 5×10^4 GCs or CCs were plated in a 6-well plate (2 mL of medium/well). After four days of cell culture (without any treatment), the supernatant was collected and estradiol and progesterone levels were evaluated by electrochemiluminescence (ECL) and competitive ECL, respectively, using commercial kits (Cobas e602 and Cobas e601). Hormonal dosages on culture medium (without cell culture) were also checked as control to avoid interference from the FBS.

Cellular viability (MTT) and proliferation rate (trypan blue)

In order to check cell viability, approximately 1×10^3 GCs and CCs were plated in a 96-well plate (100 μ L of medium/well) to perform an 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. After four days of cell culture (without any treatment), the MTT assay was performed as previously described (Riss et al. 2015). Briefly, 10 μ L of MTT solution (5 mg/mL) were added to each well and incubated for 4 h. Subsequently, the incubation medium containing MTT solution was removed and 100 μ L of dimethyl sulfoxide (DMSO) were added to each well. The optical density (OD) was measured at 540 to 570 nm using a microplate reader.

In order to determine the proliferation rate, approximately 1×10^4 GCs and CCs were plated in a 24-well plate (500 μ L of medium/well) to perform the trypan blue assay, which was performed as previously described (Alcoba et al. 2016). Briefly, cells were trypsinized, centrifuged, stained with trypan blue, and counted in a hemocytometer chamber.

Housekeeping genes – Real-time quantitative RT-PCR

Between 0.5 and 1×10^5 GCs or CCs were plated in each well (6-well plate containing 2 mL of medium per well). At the end of the experimental design, cells from the control and treated groups were lysed, RNA was isolated using TRIzol[®] Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), following the manufacturer's instructions, and stored at -80 °C until molecular analysis. Total RNA was quantified by QuBit[™] (Invitrogen[®], EUA), using Quant-it[™] reagents (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. This technique is considered the gold standard, as it uses specific probes for RNA molecules and therefore, is more precise because it avoids the influence of contaminants (Uyar et al. 2013). Complementary DNA (cDNA) was synthesized using 0.5 μ g of total RNA per μ L after oligo-dT priming (Oligo(DT)₁₂₋₁₈) with the SuperScript III First-Strand System for RT-PCR (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), following the manufacturer's

instructions. SYBR green-based real-time quantitative PCR (Reagent Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used for the gene expression of *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), *ACTB* (β -actin), *YWHAZ* (Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide), *HPRT1* (hypoxanthine phosphoribosyltransferase) and *B2M* (β 2-microglobulin). Primers were designed with PrimeTime qPCR Assay Entry (IDT, Integrated DNA Technologies, Coraville, Iowa, USA) and are described in Table 1. Amplification was performed using the StepOnePlus[™] Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The reaction mixture (12.5 μ L) consisted of 6.25 μ L of SuperMix, 1 μ L of 50 μ mol/L Rox dye, 0.2 μ L of each primer (10 μ mol/L forward and 10 μ mol/L reverse), 1 μ L of diluted sample (1:10) and 3.85 μ L of H₂O. Quantification of amplified samples was performed based on the amplification of a standard curve (serial dilution). Annealing and extension temperatures as well as cDNA dilution were tested beforehand.

Housekeeping proteins – western immunoblot

Between 0.5 and 1 x 10⁵ cells were plated in each well (6-well plate containing 2 mL of medium). At the end of the experimental design, cells from control and treated groups were trypsinized and precipitated after centrifugation (at 4 °C for 10 min at 2,000 g). The supernatant was discarded and the pellet was homogenized in 1 mL of 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.25% sodium deoxycholate, 1 mM PMSF, 1 μ g/mL leupeptin, and 1 mM sodium fluoride. The homogenate was incubated for 1 h at 4 °C and then centrifuged again (at 10,000 g for 10 min at 4 °C). The supernatant containing proteins was transferred to a tube and stored at -20 °C until protein quantification. Protein concentration was measured by the fluorescent method (Qubit[®] protein assay kit, Thermo Fischer Scientific), following the manufacturer's instructions. Approximately 50 μ g of protein was incubated in Laemmli buffer [50% glycerol, 10% sodium dodecyl sulfate (SDS), 62.5

mM Tris, 0.1% bromophenol blue, and 0.05% 2- β -mercaptoethanol] at 95 °C for 3 min and then applied to an 8% to 12% SDS-PAGE gel and transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane by electroblotting. PVDF membranes were activated with methanol, washed with blocking solution containing 15 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris, 0.5% Tween 20, pH 7.4, plus 2.5% BSA, and incubated with specific antibodies diluted in NET with 2.5% BSA (α -actinin, sc-17829, Santa Cruz Biotechnology; GAPDH, Millipore #MAB374; β -actin, Applied Biosystems Ambion #AM4302; or β -tubulin, Invitrogen #32-2600). The bands were detected by enhanced chemiluminescence (ECL) followed by film (CL-Exposure, Pierce) exposure for 15 to 60 seconds. After immunodetection, PVDF membranes were washed twice with TBS-T, once with TBS and then stained for 5 min with Ponceau S solution, a nonspecific protein stain (Welinder and Ekblad 2011), and destained once with water. The ODs of the bands obtained by chemiluminescence and by Ponceau S staining were measured by densitometric analysis using an image-processing system (Image Station IS 40000 MM Pro[®]). The band density for each protein was corrected by the corresponding density of Ponceau S.

Statistical analysis

As immunocytochemistry (n = 3 patients) and hormonal dosages (n = 7 patients) were performed only to validate our cell model, a descriptive analysis was performed.

Cellular viability and proliferation rate data distribution were verified by Shapiro-Wilk test and then evaluated using Generalized Estimated Equations (GEE) and Spearman correlation (n = 24 patients). Results are presented as mean \pm standard error. Data were analyzed with *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS v. 22.0) and the level of statistical significance was set at $P \leq 0.05$.

Gene expression analysis was performed using the free software GenEx (MultiD Analysis), which contains the *NormFinder* algorithm (a Visual Basic application for

Microsoft Excel). Data were subdivided according to cell type (GCs or CCs) and according to the group: cells that were not treated comprised the control group (GC n = 5 patients and CC n = 6 patients); and cells that were exposed to BCB constituted the treated group (n = 6 patients for both cell types). *NormFinder* identifies the most suitable normalization gene (s), as indicated by lower average expression stability value among a set of candidates and it gives us information about intra and inter-group variation stability values.

Protein expression analysis (n = 6 to 8 patients) were evaluated applying the idea of looking forward the protein with mean ratio near to one and small standard deviation. As described for gene expression analysis, data were subdivided according to cell type (GCs or CCs) and according to the group (control and treated, exposed to BCB).

Acknowledgements

This work was financially supported by *Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia* from UFRGS (PPGFISIO), *Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos* (FIPE) of *Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação* (GPPG) from HCPA. Edison Capp, Ilma Simoni Brum, Diego Alcoba, and Júlia Schneider received scholarships from CNPq. Diego Alcoba received a scholarship from CAPES (process number 12907/13-8).

Abbreviations

18S	18S ribosomal
ACTB	β-actin
B2M	β2-microglobulin
BCB -	Oocytes that reduce the blue color of BCB stain
BCB	Brilliant Cresyl Blue
BCB +	Oocytes that retain the blue color of BCB stain
CCs	<i>Cumulus</i> cells
COCs	<i>Cumulus</i> -oocyte complexes
COH	controlled ovarian hyperstimulation
FSHr	FSH receptor
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GCs	Granulosa cells
HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase

MTT	3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide
PCOS	polycystic ovarian syndrome
RPL19	ribosomal protein L19
YWHAZ	Tyrosine 3 –monooxygenase/ tryptophan –monooxygenase activation protein, zeta polypeptide

References

- Abazari-Kia AH, Mohammadi-Sangcheshmeh A, Dehghani-Mohammadabadi M, Jamshidi-Adegani F, Veshkini A, Zhandi M, Cinar MU, Salehi M. 2014. Intracellular glutathione content, developmental competence and expression of apoptosis-related genes associated with G6PDH-activity in goat oocyte. *J Assist Reprod Genet* 31(3):313-321.
- Alcoba DD, Conzatti M, Ferreira GD, Pimentel AM, Kussler AP, Capp E, von Eye Corleta H, Brum IS. 2016. Safety of brilliant cresyl blue staining protocols on human granulosa and cumulus cells. *Zygote* 24(1):83-88.
- Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. 2004. Normalization of Real-Time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research* 64:5245-5250.
- Ashry M, Lee K, Mondal M, Datta TK, Folger JK, Rajput SK, Zhang K, Hemeida NA, Smith GW. 2015. Expression of TGFbeta superfamily components and other markers of oocyte quality in oocytes selected by brilliant cresyl blue staining: relevance to early embryonic development. *Mol Reprod Dev* 82(3):251-264.
- Chen RW, Saunders PA, Wei H, Li Z, Seth P, Chuang DM. 1999. Involvement of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and p53 in neuronal apoptosis: evidence that GAPDH is upregulated by p53. *J Neurosci* 19(21):9654-9662.
- Chronowska E. 2014. High-throughput analysis of ovarian granulosa cell transcriptome. *Biomed Res Int* 2014:213570.
- de Jonge HJ, Fehrmann RS, de Bont ES, Hofstra RM, Gerbens F, Kamps WA, de Vries EG, van der Zee AG, te Meerman GJ, ter Elst A. 2007. Evidence based selection of housekeeping genes. *PLoS One* 2(9):e898.
- Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, Zumla A. 2004. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *BioTechniques* 37(1):112-114, 116, 118-119.
- Ekart J, McNatty K, Hutton J, Pitman J. 2013. Ranking and selection of MII oocytes in human ICSI cycles using gene expression levels from associated cumulus cells. *Hum Reprod* 28(11):2930-2942.
- Erickson GF, Challis JR, Ryan KJ. 1974. A developmental study on the capacity of rabbit granulosa cells to respond to trophic hormones and secrete progesterone in vitro. *Dev Biol* 40(2):208-224.
- Fragouli E, Lalioti MD, Wells D. 2014. The transcriptome of follicular cells: biological insights and clinical implications for the treatment of infertility. *Hum Reprod Update* 20(1):1-11.
- Glare EM, Divjak M, Bailey MJ, Walters EH. 2002. beta-Actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels. *Thorax* 57(9):765-770.
- Grondahl ML, Borup R, Lee YB, Myrholm V, Meinertz H, Sorensen S. 2009. Differences in gene expression of granulosa cells from women undergoing controlled ovarian hyperstimulation with either recombinant follicle-stimulating hormone or highly purified human menopausal gonadotropin. *Fertil Steril* 91(5):1820-1830.
- Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. 2005. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* 6(4):279-284.

- Neubourg DD, Robins A, Fishel S, Gibbon L. 1996. Flow cytometric analysis of granulosa cells from follicular fluid after follicular stimulation. *Hum Reprod* 11(10):2211-2214.
- Nicholls C, Li H, Liu JP. 2012. GAPDH: a common enzyme with uncommon functions. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 39(8):674-679.
- Ophir L, Yung Y, Maman E, Rubinstein N, Yerushalmi GM, Haas J, Barzilay E, Hourvitz A. 2014. Establishment and validation of a model for non-luteinized human mural granulosa cell culture. *Mol Cell Endocrinol* 384(1-2):165-174.
- Radonic A, Thulke S, Bae HG, Muller MA, Siegert W, Nitsche A. 2005. Reference gene selection for quantitative real-time PCR analysis in virus infected cells: SARS corona virus, Yellow fever virus, Human Herpesvirus-6, Camelpox virus and Cytomegalovirus infections. *Virology* 2:7.
- Radonic A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A. 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 313(4):856-862.
- Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Benink HA, Worzella TJ, Minor L. 2015. *Cell Viability Assays. Assay Guidance Manual*
- Rivero-Gutierrez B, Anzola A, Martinez-Augustin O, de Medina FS. 2014. Stain-free detection as loading control alternative to Ponceau and housekeeping protein immunodetection in Western blotting. *Anal Biochem* 467:1-3.
- Tanghe S, Van Soom A, Nauwynck H, Coryn M, de Kruif A. 2002. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol Reprod Dev* 61(3):414-424.
- Tong Z, Gao Z, Wang F, Zhou J, Zhang Z. 2009. Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR. *BMC Mol Biol* 10:71.
- Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, Paglierani M, Distante V, Pazzagli M, Bustin SA, Orlando C. 2002. Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Anal Biochem* 309(2):293-300.
- Uyar A, Torrealday S, Seli E. 2013. Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality. *Fertil Steril* 99(4):979-997.
- Vireque AA, Campos JR, Dentillo DB, Bernuci MP, Campos CO, Silva-de-Sa MF, Ferriani RA, Nunes AA, Rosa-e-Silva AC. 2015. Driving Human Granulosa-Luteal Cells Recovered From In Vitro Fertilization Cycles Toward the Follicular Phase Phenotype. *Reprod Sci* 22(8):1015-1027.
- Wan Q, Whang I, Choi CY, Lee JS, Lee J. 2011. Validation of housekeeping genes as internal controls for studying biomarkers of endocrine-disrupting chemicals in disk abalone by real-time PCR. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 153(3):259-268.
- Welinder C, Ekblad L. 2011. Coomassie staining as loading control in Western blot analysis. *J Proteome Res* 10(3):1416-1419.
- Wen X, Li D, Tozer AJ, Docherty SM, Iles RK. 2010. Estradiol, progesterone, testosterone profiles in human follicular fluid and cultured granulosa cells from luteinized pre-ovulatory follicles. *Reprod Biol Endocrinol* 8:117.
- Winterhager E, Kidder GM. 2015. Gap junction connexins in female reproductive organs: implications for women's reproductive health. *Hum Reprod Update* 21(3):340-352.
- Zhang H, Vollmer M, De Geyter M, Litzistorf Y, Ladewig A, Durrenberger M, Guggenheim R, Miny P, Holzgreve W, De Geyter C. 2000. Characterization of an immortalized human granulosa cell line (COV434). *Mol Hum Reprod* 6(2):146-153.

Figure Legends

Figure 1 – triple immunocytochemistry for pan-cytokeratin (A), FSH receptor (B) and nucleus (C) in human luteinized granulosa cells. (D) Merge.

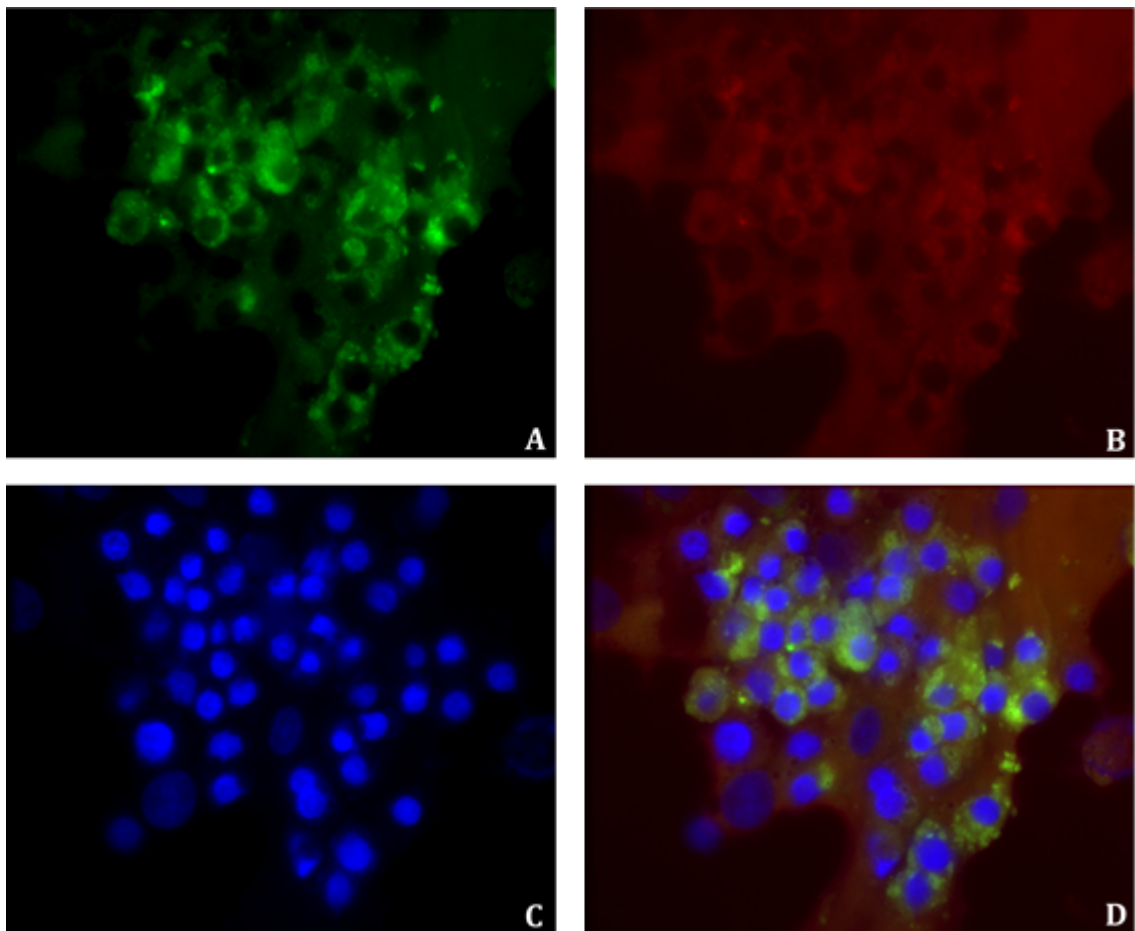


Figure 2 – Spearman correlation between cellular proliferation and viability in follicular cells.

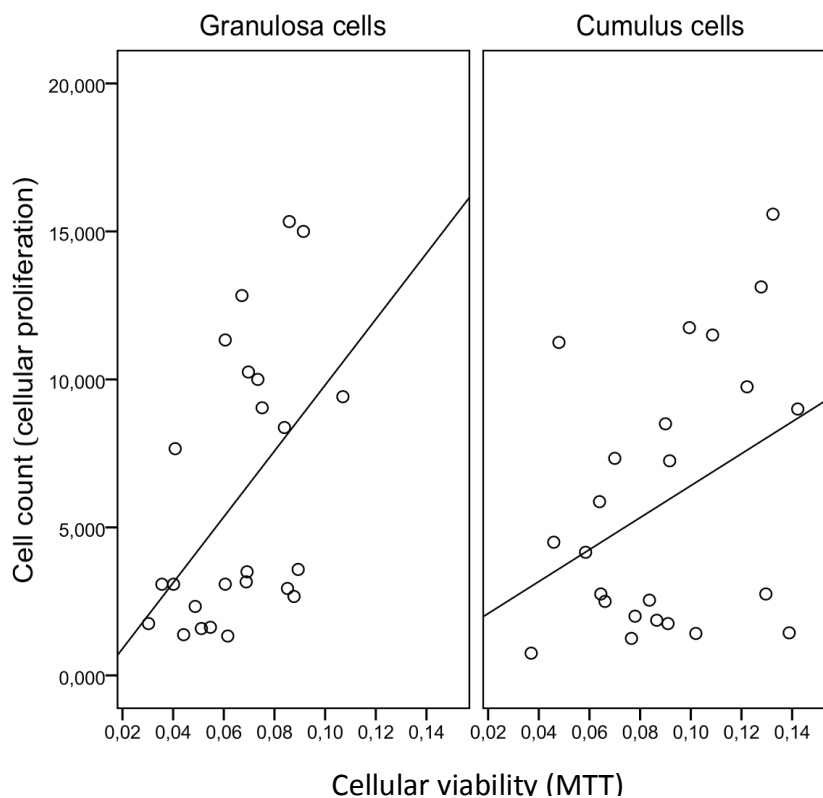


Figure 3 – RT-qPCR Cq values for reference genes in GCs (A) and CCs (B).

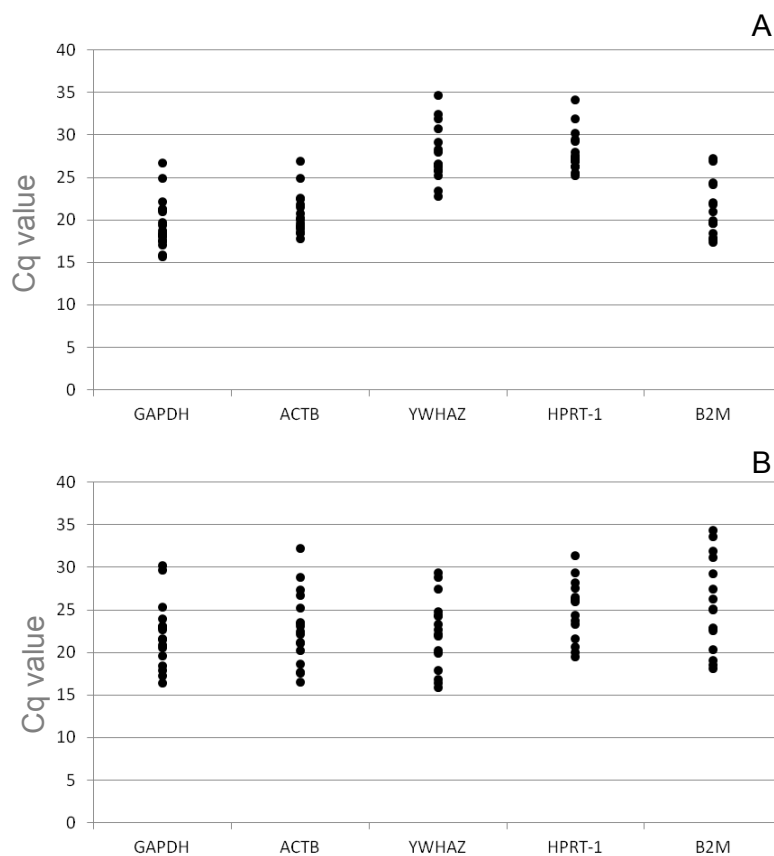


Figure 4 – Intergroup/biological variation (gene expression variation, from patient to patient) in GCs (A) and CCs (B) between control and treated (exposed to BCB) groups.

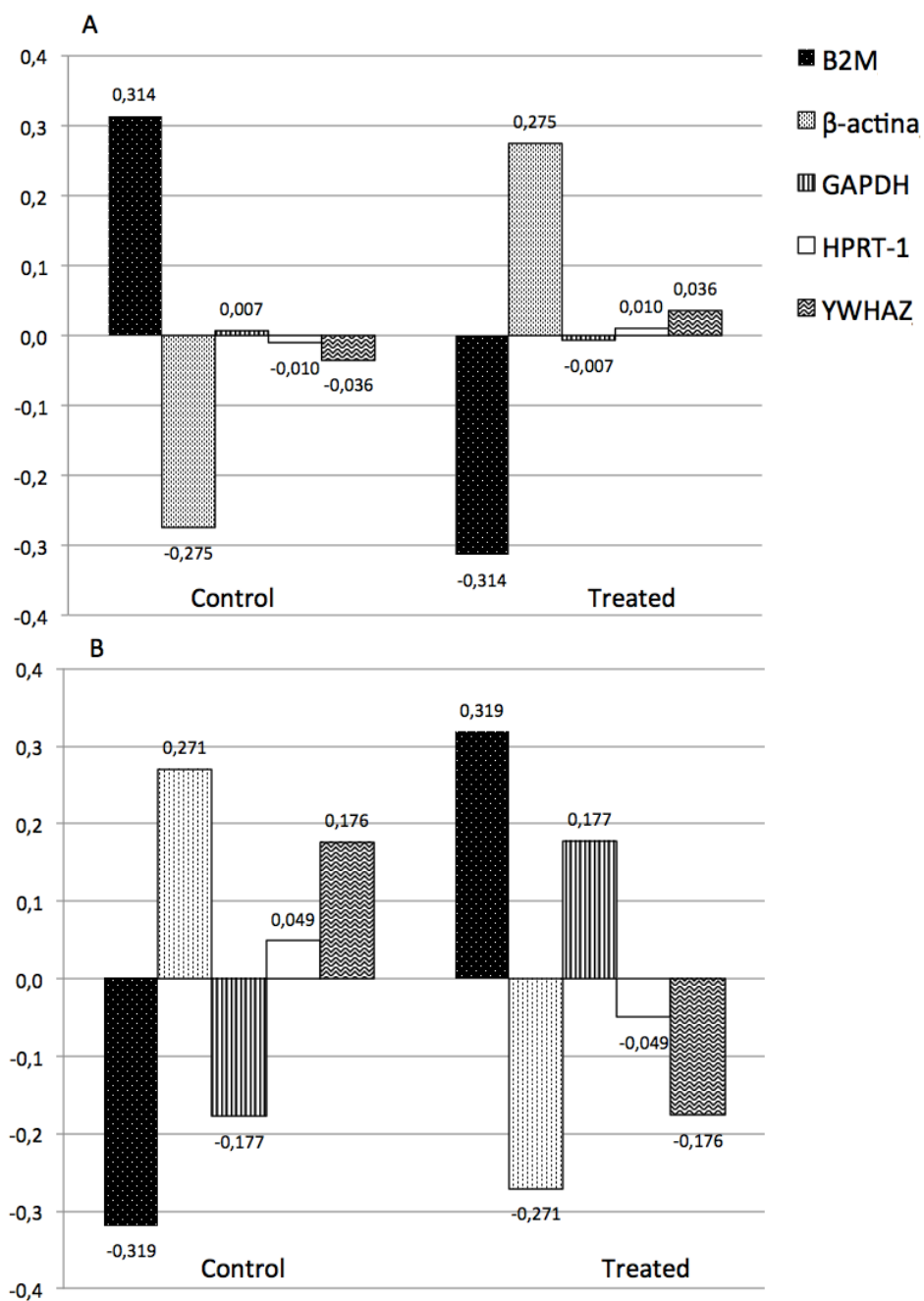


Figure 5 – Intragroup variation (effect of experimental treatment on gene expression) in GCs (A) and CCs (B) between control and treated (exposed to BCB) groups.

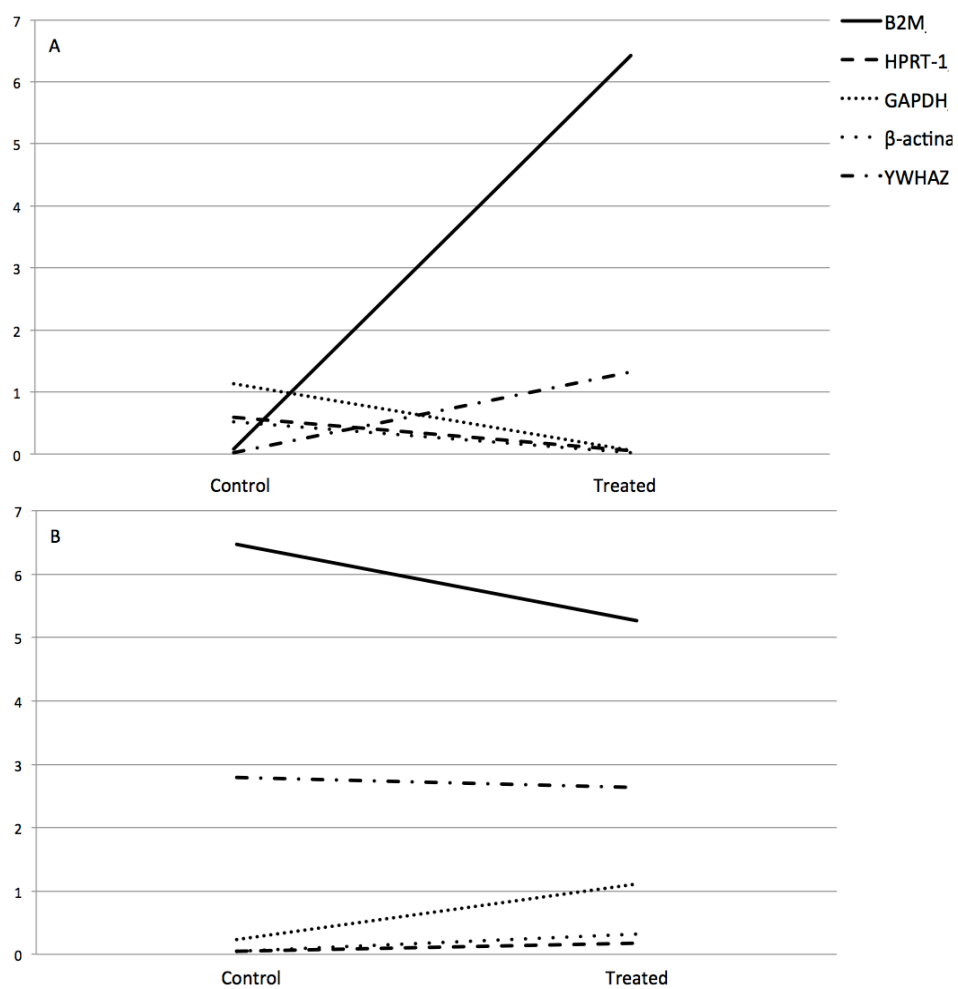


Figure 6 – β -tubulin protein expression in CCs (A) and GCs (B) between control and treated (exposed to BCB) groups. Images are representative.

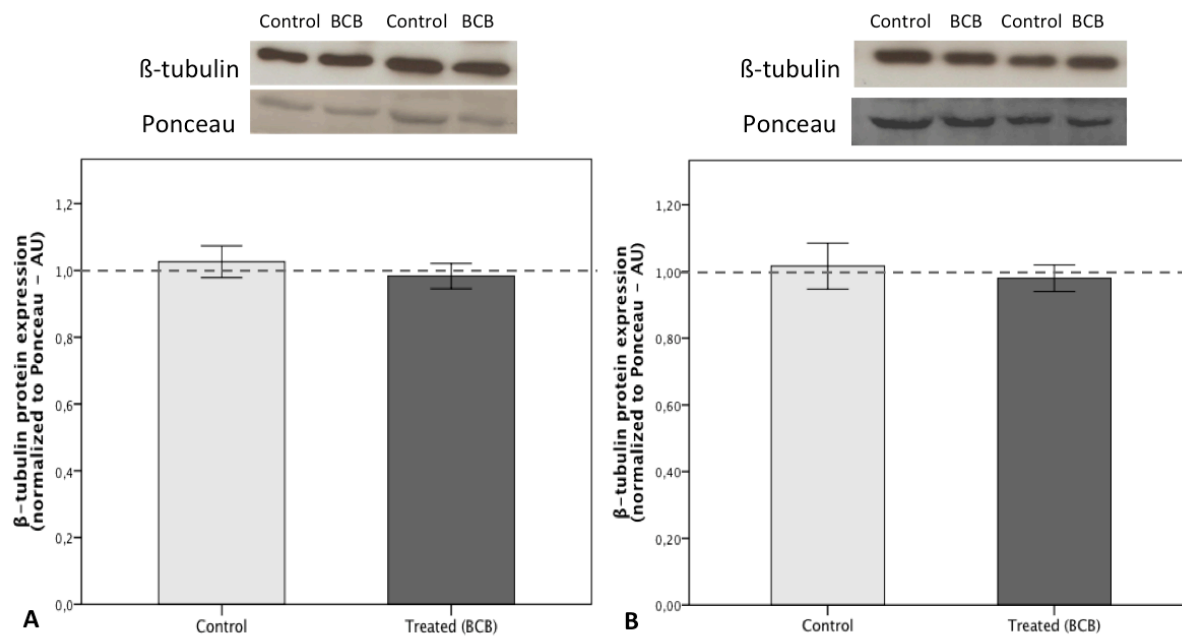


Figure 7 – β -actin protein expression in CCs (A) and GCs (B) between control and treated (exposed to BCB) groups. Images are representative.

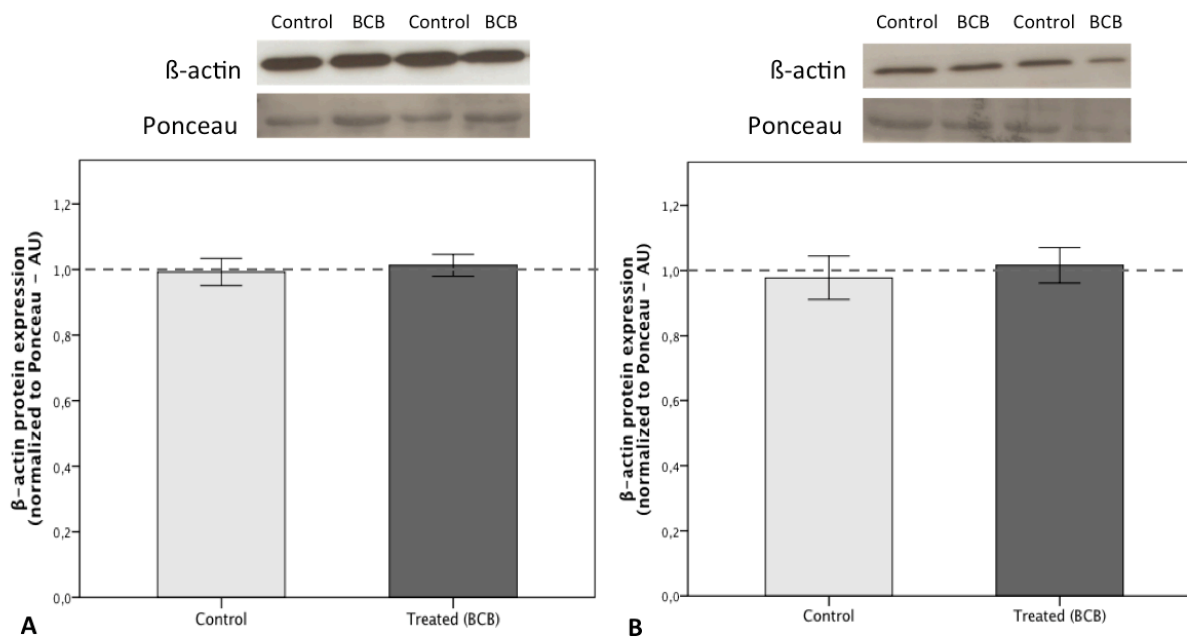


Figure 8 – α -actinin protein expression in CCs (A) and GCs (B) between control and treated (exposed to BCB) groups. Images are representative.

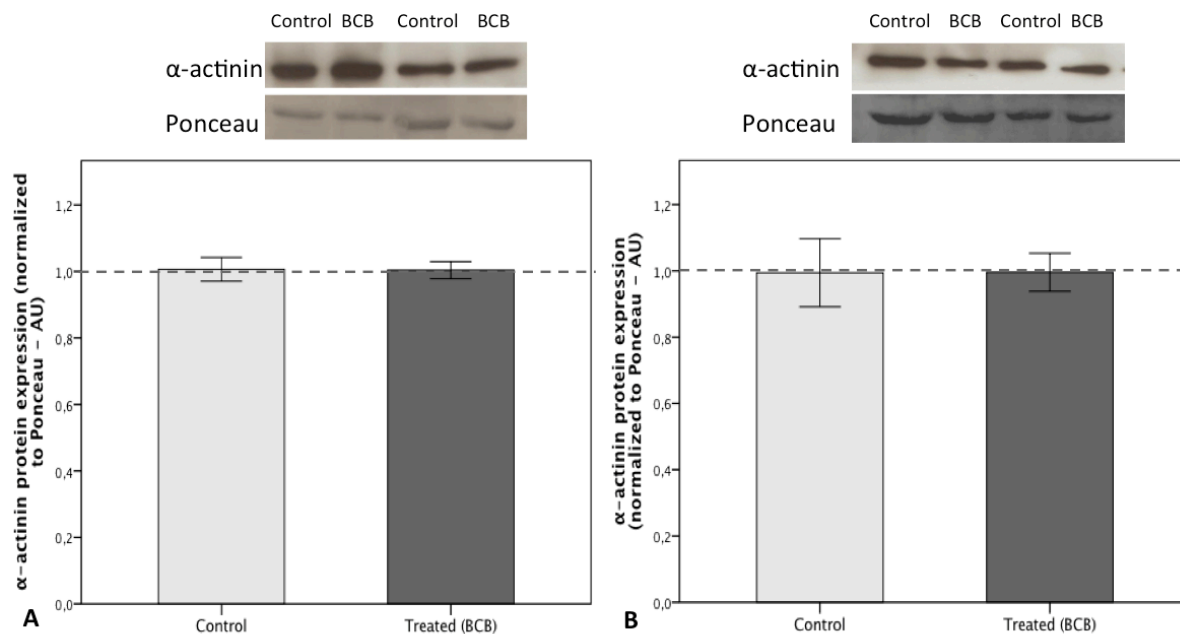


Figure 9 – GAPDH protein expression in CCs (A) and GCs (B) between control and treated (exposed to BCB) groups. Images are representative.

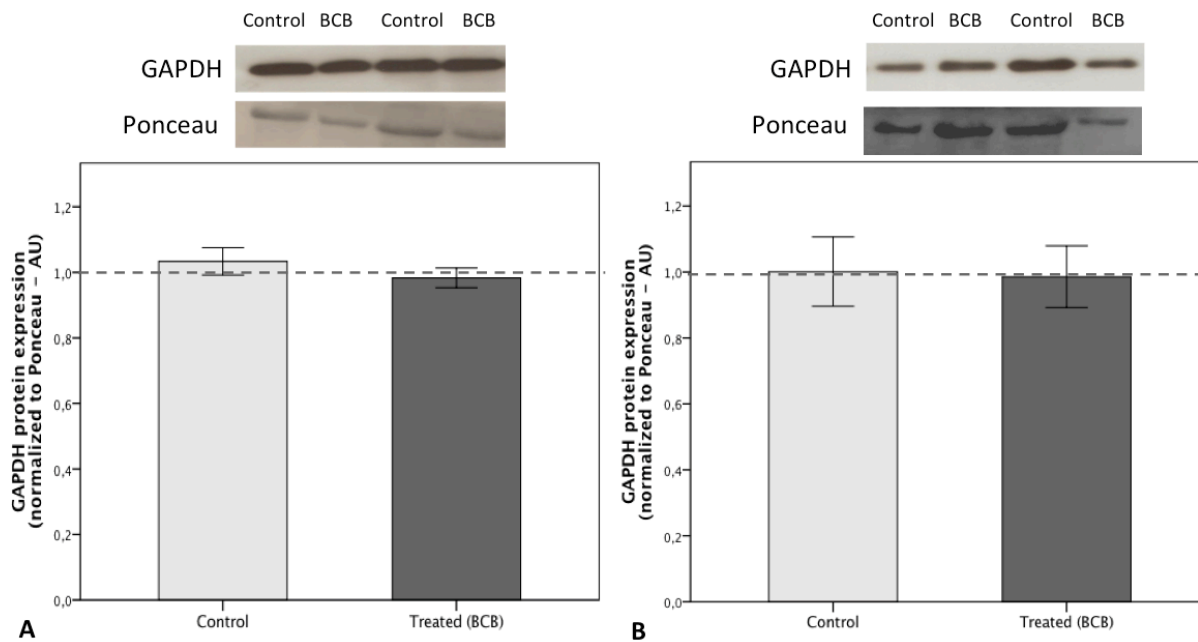


Table 1. Gene symbol, name of the gene, NCBI reference, primer sequences, product length (base pairs - bp), genomic location and cell function for candidate housekeeping genes in follicular cells.

Gene symbol	Name	NCBI ref. seq.	Sequence (5' - 3')	Product length (bp)	Genomic location	Cell function
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	NM_002046.4	Forward: CTTTGTCAAGCTCATTCCTGG Reverse: CTTCTCTTGTGCTCTTGC	133	12p13	Glycolytic enzyme
<i>ACTB</i>	β -actin	NM_001101.3	Forward: CTGGAACGGTGAAGGTGACA Reverse: AAGGGACTTCCTGTAACAATGCA	140	7p22	Cytoskeletal structural protein
<i>YWHAZ</i>	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	NM_001135699.1	Forward: CAACACATCCTATCAGACTGGG Reverse: AATGTATCAAGTTCAGCAATGGC	133	8q23.1	Signal transduction
<i>HPRT1</i>	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase	NM_000194.2	Forward: AGATGGTCAAGGTCGCAAG Reverse: GTATTCATTATAGTCAAGGGCATATCC	128	Xq26.1	Metabolic salvage of purines
<i>B2M</i>	β 2-microglobulin	NM_004048.2	Forward: CTATCCAGCGTACTCCAAAG Reverse: ACAAGTCTGAATGCTCCACT	165	15q21-q22.2	Major Histocompatibility Complex

Table 2 – Dispersion data of raw CT values for candidate reference genes. SD standard deviation; CV coefficient of variation (ratio of SD and media); MFC maximum fold change

Granulosa cells					<i>Cumulus</i> cells				
Gene	Mean	SD	CV (%)	MFC	Gene	Mean	SD	CV (%)	MFC
<i>HPRT1</i>	27.79	2.03	7.29	1.35	<i>HPRT1</i>	24.64	3.33	13.51	1.61
<i>ACTB</i>	20.69	2.20	10.62	1.51	<i>GAPDH</i>	21.68	3.32	15.30	1.84
<i>YWHAZ</i>	27.27	3.16	11.57	1.52	<i>YWHAZ</i>	22.02	3.86	17.54	1.85
<i>GAPDH</i>	19.39	2.75	14.20	1.71	<i>ACTB</i>	22.82	4.19	18.36	1.95
<i>B2M</i>	21.27	3.22	15.16	1.57	<i>B2M</i>	25.51	5.26	20.61	1.89

Table 3 – Stability values of candidate reference genes for normalization qRT-PCR in granulosa and cumulus cells (both groups, control and treated with BCB, evaluated together), calculated by *NormFinder*.

Ranking order	Granulosa cells		<i>Cumulus</i> cells	
	Gene	Stability value	Gene	Stability value
1	<i>ACTB + HPRT1</i>	0.146	<i>ACTB + HPRT1</i>	0.111
2	<i>ACTB</i>	0.192	<i>HPRT1</i>	0.140
3	<i>HPRT1</i>	0.219	<i>ACTB</i>	0.171
4	<i>YWHAZ</i>	0.268	<i>GAPDH</i>	0.334
5	<i>GAPDH</i>	0.287	<i>YWHAZ</i>	0.704
6	<i>B2M</i>	0.578	<i>B2M</i>	1.033

Table 4 – Protein loading control for normalization western immunoblot in granulosa and *cumulus* cells.

Protein	Granulosa cells					<i>Cumulus</i> cells				
	Control			Treated		Control			Treated	
	n	Mean	SD	Mean	SD	n	Mean	SD	Mean	SD
β -tubulin	7	1.01	0.18	0.97	0.10	8	1.02	0.13	0.98	0.10
β -actin	6	0.98	0.16	1.01	0.13	7	0.99	0.10	1.01	0.08
α -actinin	7	0.99	0.27	0.99	0.15	7	1.00	0.09	1.00	0.06
GAPDH	7	1.00	0.27	0.98	0.24	8	1.03	0.11	0.98	0.08

7.3 - Artigo 3: *“Safety of brilliant cresyl blue staining protocols on human granulosa and cumulus cells”*

Publicado na Revista *Zygote*, v.24, n. 1, p. 83-88, 2016.

Safety of brilliant cresyl blue staining protocols on human granulosa and cumulus cells

Diego Duarte Alcoba^{2,3}, Maiara Conzatti³, Gustavo Dias Ferreira^{2,3}, Anita Mylius Pimentel⁴, Ana Paula Kussler⁴, Edison Capp^{3,5}, Helena von Eye Corleta^{3,4} and Ilma Simoni Brum^{2,3}

Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS; Faculdade de Medicina, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, UFRGS; Associação Hospitalar Moinhos de Vento – Núcleo de Reprodução Humana, Porto Alegre, Brazil; and University Hospital Heidelberg, Heidelberg, Germany

Date submitted: 04.03.2014. Date revised: 29.01.2015. Date accepted: 24.02.2015

Summary

The selection of human immature oocytes destined for *in vitro* maturation (IVM) is performed according to their cumulus–oocyte complex (COC) morphology. In animal models, oocyte pre-selection with brilliant cresyl blue (BCB) staining improves fertilization and blastocyst rates and even increases the number of calves born. As the granulosa cells and cumulus cells (GCs and CCs) have a close relationship with the oocyte and are available in *in vitro* fertilization (IVF) programs, applying BCB staining to these cells may help to elucidate whether BCB shows toxicity to human oocytes and to determine the safest protocol for this dye. GCs and CCs were isolated from 24 patients who underwent controlled ovarian stimulation. After 48 h, cells were exposed to: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with or without phenol red, DPBS and mDPBS for 60 min; 13, 20 and 26 μM BCB for 60 min; and 60, 90 or 120 min to 13 μM BCB. Cellular viability was tested using 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and trypan blue assays. The 20 and 26 μM BCB exposures resulted in lower cell viability, similar to when cells were exposed to BCB for 90 or 120 min. GCs and CCs viabilities were equal among control group and 13 μM BCB group after 60 min. BCB staining was not toxic to GCs and CCs when the regime of 13 μM BCB for 60 min was used. Due to the close molecular/biochemical relationship between these cells and the gamete, we propose that it is unlikely that the use of BCB could interfere with the viability/health of human oocytes.

Keywords: Assisted reproduction, Brilliant Cresyl Blue, Cell culture, Cumulus cells, Granulosa cells

Introduction

In vitro maturation (IVM) is a promising technique for assisted reproduction programs (Chian *et al.*, 2004; Agdi *et al.*, 2010). However, the heterogeneity of oocytes retrieved from the ovary is a great obstacle for this technique, resulting in divergent IVM success, varying from 36.5% (Ben-Ami *et al.*, 2010) to 72.5% (Huang *et al.*, 2010). In order to differentiate oocytes that are the best candidates for IVM from those that are not, selection methods are applied. The most common selection method is based on cumulus–oocyte complex (COC) morphology. Nevertheless, this method does not determine some important factors, such as gene expression and protein translation (Goovaerts *et al.*, 2010), resulting in inaccuracy and subjective results (Mota *et al.*, 2010).

¹All correspondence to: Edison Capp, Serviço de Ginecologia e Obstetrícia – Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350/11º andar, Porto Alegre, RS, CEP 90035–903, Brazil. Tel./Fax: +55 51 33598117. E-mail: edcapp@ufrgs.br

²Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil.

³Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, UFRGS, Brazil.

⁴Associação Hospitalar Moinhos de Vento – Núcleo de Reprodução Humana – Rua Ramiro Barcelos, 910–8º andar – Cj. 905, Porto Alegre, Brazil.

⁵Department of Gynecological Endocrinology and Reproductive Medicine, University Hospital Heidelberg, Heidelberg, Germany.

After its first description as a new selection method by Ericsson *et al.* (1993), brilliant cresyl blue (BCB) dye has been widely applied in animal assisted reproductive technologies (ART). It has been already demonstrated that BCB staining can differentiate two cohorts of oocytes: those that are developmentally competent from those that have lower potential for IVM (Alcoba *et al.*, 2011). In spite of the fact that BCB staining results in higher IVM and fertilization rates (Wongsrikeao *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2011) and that it even improves the number of calves born (Su *et al.*, 2012), its use on human oocytes remains to be studied. Additionally, there is large number of protocols of BCB staining on animals (there are three variables which change according to the studies: the diluent used to prepare BCB, its concentration and the time of exposure).

The retrieval of human oocytes that can be destined to research is still difficult (Catalá *et al.*, 2012). To test the safest BCB protocol on human oocytes and its effect on oocyte health it would be necessary to use a large number of human immature eggs, turning the study unfeasible. As there is a close relationship among granulosa cells and cumulus cells (GCs and CCs) and the oocyte (Gosden *et al.*, 1997), not only structurally, but also in biochemical and molecular aspects, evaluation of these cells could help to determine the suitable protocol to ascertain oocyte quality in humans (Tanghe *et al.*, 2002; Sathananthan *et al.*, 2006).

Therefore, the main objective of this study was to evaluate in human GCs and CCs which BCB staining protocol results in a better cellular viability and to determine the best protocol to test in human oocytes.

Materials and methods

This study was approved by the Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (#12-0367). All participants signed an informed consent form.

Twenty-four patients who were submitted to controlled ovarian stimulation (COH) were invited to participate in this study. Patients with polycystic ovarian syndrome (PCOS), with indication for IVF due to ovary infertility or patients with less than four follicles aspirated were excluded from the study.

Human GCs and CCs were collected from aspirated follicular fluid obtained via ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval (from pooled follicles) as previously described (Fuhrmeister *et al.*, 2014). Briefly, after cumulus-oocyte complex isolation, the follicular fluid was centrifuged for 15 min (800 g) in order to separate red blood and GCs from the follicular fluid. The pellet was added to 2 ml of

50% density gradient [isolate concentrate and human tubal fluid (HTF), modified with HEPES from Irvine Scientific] and centrifuged again (15 min, 800 g) to separate red blood cells from the GCs. This purified GC preparation was re-suspended and the cells counted in a hemocytometer. Oocytes were denuded of the cumulus oophorus cells, 4 h after retrieval, by enzymatic treatment [exposure to hyaluronidase solution (Irvine Scientific) for 25 s], and then CCs were re-suspended in 5 ml of culture medium.

GCs and CCs were cultivated separately under specific conditions (at 37°C in 100% relative humidity and 5% CO₂ atmosphere in air) using Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco) with phenol red supplemented with 10% fetal bovine serum, 75 mIU/mL of follicle stimulating hormone (FSH) and 75 mIU/mL of luteinizing hormone (LH) (Gonal, Merck Serono) and 1% kanamycin. Approximately 10³ cells were plated in each well (96-well plate, 100 µl of medium/well) or 10⁴ in each well (24-well plate, 500 µl of medium/well). Cells were cultivated for 48 h (in order to ensure right adhesion and good confluence) and then were separated into three experiments.

Experiment 1: Selection of appropriate diluent for BCB

GCs and CCs were exposed for 60 min to different diluents: control (DMEM with phenol red); DMEM without phenol red; DPBS; or modified DPBS (mDPBS).

Experiment 2: Effect of different BCB concentrations on GCs and CCs proliferation and viability

GCs and CCs were exposed for 60 min to different BCB concentrations: 13, 20 or 26 µM (using the best diluent observed in Experiment 1).

Experiment 3: Effect of BCB exposure time on GCs and CCs proliferation and viability

GCs and CCs were exposed for 60, 90 or 120 min to BCB (using the best concentration observed in Experiment 2).

After treatment (according to each experiment), GCs and CCs were cultivated for more than 48 h, in order to mimic the maximal time for *in vitro* maturation (Agdi *et al.*, 2010), and then cellular viability was evaluated using MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) and trypan blue (cell counter) assays.

The MTT assay was performed based on an earlier publication (Riss *et al.*, 2013). Briefly, 10 µl of MTT solution (5 mg/ml diluted in warm PBS) was added to each well (96-well plate) and incubated for 4 h. After this time, the supernatant was removed and

Table 1 Results of cell counter ($\times 10^4$ cells) and MTT among groups treated with different diluents

	Granulosa cells		Cumulus cells	
	Cell counter	MTT	Cell counter	MTT
DMEM with phenol red	3.96 \pm 1.09	0.070 \pm 0.007	1.68 \pm 0.20	0.085 \pm 0.009
DMEM without phenol red	3.56 \pm 0.86	0.073 \pm 0.006	1.58 \pm 0.25	0.085 \pm 0.007
DPBS	3.83 \pm 0.95 ^a	0.081 \pm 0.007	1.65 \pm 0.23	0.090 \pm 0.008
Modified DPBS	4.29 \pm 0.96	0.078 \pm 0.006	1.79 \pm 0.37	0.087 \pm 0.10

^aDifferent from mDPBS.

Table 2 Results of cell counter ($\times 10^4$ cells) and MTT among groups treated with different BCB concentration

	Granulosa cells		Cumulus cells	
	Cell counter	MTT	Cell counter	MTT
DMEM with phenol red	3.36 \pm 0.58	0.052 \pm 0.006	5.49 \pm 1.02	0.088 \pm 0.011 ^c
BCB 13 μ M in mDPBS	3.48 \pm 0.80	0.051 \pm 0.006	5.79 \pm 1.02	0.073 \pm 0.006
BCB 20 μ M in mDPBS	3.50 \pm 0.72	0.046 \pm 0.004	5.15 \pm 0.82	0.067 \pm 0.006
BCB 26 μ M in mDPBS	2.99 \pm 0.67	0.042 \pm 0.003 ^b	4.67 \pm 0.56 ^b	0.067 \pm 0.006

^aDifferent from DMEM with phenol red and BCB 13 μ M.

^bDifferent from BCB 13 μ M.

^cDifferent from BCB 20 μ M and BCB 26 μ M.

100 μ l of dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to each well to dissolve the developed formazan crystals. Optical density was measured in an ELISA reader at 540–570 nm.

For the trypan blue assay (cell counter), 250 μ l of trypsin solution was added to each well (24-well plate) and incubated for 5 min. After this time 500 μ l of culture medium was added to each well, centrifuged and counted in a hemocytometer chamber, using trypan blue.

Results were evaluated using Generalized Estimating Equations (GEE), followed by Bonferroni or least significance difference (LSD) tests for multiple comparisons. When no statistical difference was observed between groups, the β error was calculated. Data were analyzed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, v. 19.0) and statistical significance was set at $P \leq 0.05$.

Results

Twenty-four patients were invited to participate in the study and they were divided according to each experiment (eight patients/experiment).

Experiment 1: Selection of appropriate diluent for BCB

Viability of GC and CC, assessed by cell count and MTT, after exposure to different diluents was not

different among control (DMEM with phenol red) and treated groups (Table 1). GCs exposed to mDPBS presented higher proliferation compared with GCs exposed to DPBS (4.29×10^4 and 3.38×10^4 cells, respectively; $P < 0.001$) shown in Table 1. Based on these results, mDPBS was selected as diluent for the following experiments (Experiments 2 and 3) and DMEM with phenol red as control, as they showed similar results.

Experiment 2: Effect of different BCB concentrations on GCs and CCs proliferation and viability

GCs proliferation after exposure to 13, 20 or 26 μ M BCB diluted in mDPBS was equal in control (DMEM with phenol red) and treated groups when the cell counter technique was used. However, when analyzing cell viability using the MTT assay, GCs exposed to BCB 26 μ M showed a lower effect, compared with control and 13 μ M BCB groups ($P = 0.029$ and $P = 0.019$, respectively) (Table 2).

Cell viability was lower in CCs treated with 26 μ M BCB compared with the 13 μ M group ($P = 0.012$), when trypan blue was performed, as shown in Table 2. Additionally, lower cell viability was observed in 26 μ M group, and also in 20 μ M group compared with control group when MTT was performed ($P = 0.04$ and $P = 0.02$, respectively). Independently of cell type or assay performed, the control and 13 μ M groups showed the same cell viability. Based on these results, 13 μ M BCB was selected to be used in Experiment 3.

Table 3 Results of cell counter ($\times 10^4$ cells) and MTT among groups treated with different BCB time exposure

	Granulosa cells		Cumulus cells	
	Cell counter	MTT	Cell counter	MTT
DMEM with phenol red	10.828 \pm 1.26	0.0713 \pm 0.003	10.057 \pm 1.33	0.095 \pm 0.009
60 min	9.823 \pm 1.01	0.0711 \pm 0.003	10.411 \pm 1.65	0.087 \pm 0.008
90 min	8.041 \pm 1.02 ^a	0.0722 \pm 0.003	9.843 \pm 1.39	0.085 \pm 0.008 ^b
120 min	9.676 \pm 1.20	0.0696 \pm 0.003	7.09 \pm 1.16 ^a	0.084 \pm 0.008

^aDifferent from DMEM with phenol red and 60 min.

^bDifferent from DMEM with phenol red.

Experiment 3: Effect of BCB exposure time on GCs and CCs proliferation and viability

Comparing cell viability of cells exposed to 13 μ M BCB diluted in mDPBS for 60, 90 or 120 min, GCs exposed for 90 min presented lower proliferation, compared to control and 60 min groups ($P < 0.001$ and $P = 0.024$, respectively) (trypan blue assay). In the MTT assay, GCs control and treated (all time exposure) presented the same viability (Table 3).

CCs showed lower proliferation after 120 min compared with the control and 60 min groups ($P = 0.05$ and $P = 0.04$ respectively) (cell counter assay). In the MTT assay, CCs exposed to BCB for 90 min showed lower cell viability, compared with control group ($P = 0.04$) (Table 3). Independently of cell type or assay performed, control and 60 min groups showed the same viability.

Discussion

The safety of oocyte exposure to BCB with normal blastocysts morphology has been investigated in several animal species (Alm *et al.*, 2005; Bhojwani *et al.*, 2007; Sugulle *et al.*, 2008). However, it was demonstrated that BCB-negative oocytes expressed degenerative changes (Mlodawska *et al.*, 2005), did not have the potential to be fertilized (Egerszegi *et al.*, 2010) or could not form blastocyst (Wongsrikeao, Otoi *et al.*, 2006). Additionally, when BCB-negative oocytes were fertilized, this resulted in less blastocysts (Bhojwani *et al.*, 2007; Catalá, Izquierdo *et al.*, 2012). Considering these handicaps, it was suggested that oocytes could be affected by BCB staining (Mota *et al.*, 2010). As the oocyte selection method is one of the most important factor (Goovaerts, Leroy *et al.*, 2010), the safety of BCB on human oocytes remains to be studied.

Kempisty *et al.* (2011) demonstrated that if oocytes are exposed twice to BCB they present lower expression of important genes related to fertilization, such as expression of the matrix compound. Additionally, double exposure decreases the fertilization rates and

even prevents blastocyst formation (Wongsrikeao *et al.*, 2006). In spite of the discussion about BCB security, most authors agreed that BCB staining, as a selection method, is better than just using morphological criteria (Pujol *et al.*, 2004).

Despite the fact that BCB staining is widely used in several animal species, there are a large number of protocols applied that use different vehicles to dilute BCB (PBS: Ericsson *et al.*, 1993; mDPBS: Alm *et al.*, 2005; M2: Wu *et al.*, 2007), different concentrations (4.8 μ M: Alvarez *et al.*, 2012; 13 μ M: Ericsson *et al.*, 1993; 20 μ M: Alcoba *et al.*, 2011; 26 μ M: Alm *et al.*, 2005) and different exposure times (30 min: Alcoba *et al.*, 2011; 60 min: Mota *et al.*, 2010; 90 min: Ericsson *et al.*, 1993; 180 min: Alvarez *et al.*, 2012). It is known that phenol red (pH indicator) must not be used, as it can interfere with the BCB resulting color (Wu *et al.*, 2007). We demonstrated that applying different diluents cell viability and proliferation gave the same results in control (DMEM with phenol red) and treated groups. These results suggested that the possible BCB toxicity is not related to the diluents.

The 26 μ M BCB concentration is the most acceptable and applied in most laboratories (Rodriguez-Gonzalez *et al.*, 2002; Manjunatha *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2012). BCB concentrations higher than 26, such as 39 μ M (Rodriguez-Gonzalez, Lopez-Bejar *et al.*, 2002; Manjunatha, Gupta *et al.*, 2007) and 52 μ M (Rodriguez-Gonzalez, Lopez-Bejar *et al.*, 2002; Wang, Lin *et al.*, 2012), did not present benefits. Similarly, a lower BCB concentration (13 μ M) was not sufficient to select an appropriate number of oocytes (Rodriguez-Gonzalez, Lopez-Bejar *et al.*, 2002; Manjunatha, Gupta *et al.*, 2007; Wu, Liu *et al.*, 2007; Alcoba *et al.*, 2011). However, the BCB concentration remains debateable, as it was proposed that 13 μ M (Catalá *et al.*, 2011) or an intermediate concentration, between 13 and 20 μ M (Alcoba *et al.*, 2011), would be more suitable. Taking these points into account, it was suggested that, for each species, the best concentration should be tested (Wang *et al.*, 2012). We have demonstrated that for GCs and CCs, the best BCB concentration is 13 μ M, as others concentrations (20 and 26 μ M) can affect cellular

viability, we suggest the use of 13 μ M BCB for selecting human oocytes.

BCB time exposure varies according to each experiment – regardless of the fact that most experiments used BCB for 90 min (Goovaerts, Leroy *et al.*, 2010). It has been suggested that 60 min (Wu *et al.*, 2007) or even 90 min (Sugulle *et al.*, 2008) would not be a long enough time to select oocytes for IVF. However, after testing different exposure times it was demonstrated that 60 min is appropriate for selecting competent mice oocytes (Alcoba *et al.*, 2011). It should be noted that in our experiment GC viability was impaired when cells were exposed for longer than 60 min.

Conclusions

BCB seems to be safe for use in human granulosa and cumulus cells, viability was not impaired when an appropriate BCB protocol (13 μ M BCB diluted in mDPBS for 60 min) was used. As these cells present a close relationship with the oocyte and many studies use them as an indicator for oocyte quality, we can infer that BCB staining will not impair human eggs. The benefits of using BCB in selecting human eggs need further investigations.

Acknowledgements

This work was financially supported by Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas–Fisiologia da UFRGS (PPGFISIO), Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) of Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (#12-0367) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul FAPERGS (#14/0549-7 APE). Edison Capp, Ilma Simoni Brum da Silva, Gustavo Dias Ferreira and Maiara Conzatti are scholarship recipients from CNPq.

References

- Agdi, M., Zarei, A., Al-Sannan, B., Tulandi, T. & Tan, S.L. (2010). Effects of ovarian puncture for *in vitro* maturation on subsequent *in vitro* fertilization cycle in women with polycystic ovaries. *Fertil. Steril.* **94**, 381–3.
- Alcoba, D.D., da Rosa Braga, B.L., Sandi-Monroy, N.L., Proença, L.A., Felix Lopes, R.F. & de Oliveira, A.T. (2011). Selection of *Rattus norvegicus* oocytes for *in vitro* maturation by brilliant cresyl blue staining. *Zygote* **21**, 238–45.
- Alm, H., Torner, H., Lohrke, B., Viergutz, T., Ghoneim, I. & Kanitz, W. (2005). Bovine blastocyst development rate *in vitro* is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVF as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Theriogenology* **63**, 2194–205.
- Alvarez, G.M., Ferretti, E.L., Gutnisky, C., Dalvit, G.C. & Cetica, P.D. (2012). Modulation of glycolysis and the pentose phosphate pathway influences porcine oocyte *in vitro* maturation. *Reprod. Domest. Anim.* **48**, 545–53.
- Ben-Ami, I., Komsky, A., Bern, O., Kasterstein, E., Komarovskiy, D. & Ron-El, R. (2010). *In vitro* maturation of human germinal vesicle-stage oocytes: role of epidermal growth factor-like growth factors in the culture medium. *Hum. Reprod.* **26**, 76–81.
- Bhojwani, S., Alm, H., Torner, H., Kanitz, W. & Poehland, R. (2007). Selection of developmentally competent oocytes through brilliant cresyl blue stain enhances blastocyst development rate after bovine nuclear transfer. *Theriogenology* **67**, 341–5.
- Catalá, M.T., Izquierdo, D., Uzbekova, S., Morató, R., Roura, M., Romaguera, R., Papillier, P. & Paramio, M.T. (2011). Brilliant cresyl blue stain selects largest oocytes with highest mitochondrial activity, maturation-promoting factor activity and embryo developmental competence in prepubertal sheep. *Reproduction* **142**, 517–27.
- Catalá, M.G., Izquierdo, D., Rodríguez-Prado, M., Hammami, S. & Paramio, M.T. (2012). Effect of oocyte quality on blastocyst development after *in vitro* fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in a sheep model. *Fertil. Steril.* **97**, 1004–8.
- Chian, R.C., Buckett, W.M. & Tan, S.L. (2004). *In vitro* maturation of human oocytes. *Reprod. Biomed. Online* **8**, 148–66.
- Egerszegi, I., Alm, H., Rátky, J., Heleil, B., Brüßow, K. & Torner, H. (2010). Meiotic progression, mitochondrial features and fertilisation characteristics of porcine oocytes with different G6PDH activities. *Reprod. Fertil. Dev.* **22**, 830–8.
- Ericsson, S.A., Boice, M.L., Funahashi, H. & Day, B.N. (1993). Assessment of porcine oocytes using brilliant cresyl blue. *Theriogenology* **39**, 214.
- Fuhrmeister, I.P., Branchini, G., Pimentel, A.M., Ferreira, G.D., Capp, E., Brum, I.S. & Corleta, H.E. (2014). Human granulosa cells: insulin and insulin-like growth factor-1 receptors and aromatase expression modulation by metformin. *Gynecol. Obstet. Invest.* **77**, 156–62.
- Goovaerts, L., Leroy, J., Jorssen, E. & Bols, P. (2010). Noninvasive bovine oocyte quality assessment: possibilities of a single oocyte culture. *Theriogenology* **79**, 1509–20.
- Gosden, R., Krapez, J. & Briggs, D. (1997). Growth and development of the mammalian oocyte. *Bioessays* **19**, 875–82.
- Huang, J.Y., Chian, R.C., Gilbert, L., Fleischer, D., Holzer, H., Dermatas, E., Elizur, S.E., Gidoni, Y., Levin, D., Son, W.Y. & Tan, S.L. (2010). Retrieval of immature oocytes from unstimulated ovaries followed by *in vitro* maturation and vitrification: A novel strategy of fertility preservation for breast cancer patients. *Am. J. Surg.* **200**, 177–83.
- Kempisty, B., Jackowska, M., Piotrowska, H., Antosik, P., Woźna, M., Bukowska, D., Brüßow, K.P. & Jaśkowski, J.M. (2011). Zona pellucida glycoprotein 3 (pZP3) and integrin β 2 (ITGB2) mRNA and protein expression in porcine

- oocytes after single and double exposure to brilliant cresyl blue test. *Theriogenology* 75, 1525–35.
- Manjunatha, B., Gupta, P., Devaraj, M., Ravindra, J. & Nandi, S. (2007). Selection of developmentally competent buffalo oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM. *Theriogenology* 68, 1299–304.
- Mlodawska, W., Pawlowska, A. & Kochan, J. (2005). Meiotic competence of mare oocytes selected using the brilliant cresyl blue test. In Proceedings of a Workshop on International Equine Gamete Group, Kühlungsborn, Germany, 18–21 September 2005. Alm, H.; Torner, H.; Wade, J. F. (eds). Havemeyer Foundation Monograph Series 2006 no. 18, pp. 21–24.
- Mota, G., Batista, R., Serapião, R., Boité, M., Viana, J., Torres, C. & de Almeida Camargo, L. (2010). Developmental competence and expression of the MATER and ZAR1 genes in immature bovine oocytes selected by brilliant cresyl blue. *Zygote* 18, 209–16.
- Pujol, M., Lopez-Bejar, M. & Paramio, M. (2004). Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. *Theriogenology* 61, 735–44.
- Riss, T.L., Moravec, R.A., Niles, A.L., Benink, H.A., Worzella, T.J. & Minor, L. (2013). Cell viability assays. In *Assay Guidance Manual*, Sittampalam, G.S. et al. (eds) Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, pp. 1–23.
- Rodriguez-Gonzalez, E., Lopez-Bejar, M., Velilla, E. & Paramio, M. (2002). Selection of prepubertal goat oocytes using the brilliant cresyl blue test. *Theriogenology* 57, 1397–409.
- Sathananthan, A., Selvaraj, K., Girijashankar, M., Ganesh, V., Selvaraj, P. & Trounson, A. (2006). From oogonia to mature oocytes: Inactivation of the maternal centrosome in humans. *Microscopy Res. Techn.* 69, 396–407.
- Silva, D.S., Rodriguez, P., Galuppo, A., Arruda, N.S. & Rodrigues, J.L. (2011). Selection of bovine oocytes by brilliant cresyl blue staining: effect on meiosis progression, organelle distribution and embryo development. *Zygote* 21: 250–5.
- Su, J., Wang, Y., Li, R., Peng, H., Hua, S., Li, Q., Quan, F., Guo, Z. & Zhang, Y. (2012). Oocytes selected using BCB staining enhance nuclear reprogramming and the *in vivo* development of SCNT embryos in cattle. *PLoS One* 7, e36181.
- Sugulle, A., Dochi, O. & Kayama, H. (2008). Developmental competence of bovine oocytes selected by brilliant cresyl blue staining: effect on the presence of corpus luteum on embryo development. *J. Mammalian Ovarian Res.* 25, 50–5.
- Tanghe, S., Van Soom, A., Nauwynck, H., Coryn, M. & de Kruif, A. (2002). Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 61, 414–24.
- Wang, L., Lin, J., Huang, J., Wang, J., Zhao, Y. & Chen, T. (2012). Selection of ovine oocytes by brilliant cresyl blue staining. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012, 161372.
- Wongsrikeao, P., Otoi, T., Yamasaki, H., Agung, B., Taniguchi, M., Naoi, H., Shimizu, R. & Nagai, T. (2006). Effects of single and double exposure to brilliant cresyl blue on the selection of porcine oocytes for *in vitro* production of embryos. *Theriogenology* 66, 366–72.
- Wu, Y., Liu, Y., Zhou, P., Lan, G., Han, D., Miao, D. & Tan, J. (2007). Selection of oocytes for *in vitro* maturation by brilliant cresyl blue staining: a study using the mouse model. *Cell Res.* 17, 722–31.

7.4 - Artigo 4: *“Brilliant Cresyl Blue does not present cytotoxic effects on human luteinized follicular cells”*

Artigo submetido no dia 07 de maio de 2016 para a revista *“Reproductive Toxicology”*.

1 **Brilliant Cresyl Blue staining does not present cytotoxic effects on human**
2 **luteinized follicular cells**

3

4 Diego Duarte Alcoba¹, Júlia Schneider¹, Letícia Arruda¹, Patrícia Borba Martiny¹,
5 Edison Capp^{2,3}, Helena von Eye Corleta^{1,2} and Ilma Simoni Brum^{1*}

6

7 ¹ Department of Physiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade
8 Federal do Rio Grande do Sul, 90050 – 170, Porto Alegre, Brazil;

9 ² Service of Gynecology and Obstetrics, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 90035-
10 903, Porto Alegre, Brazil;

11 ³ Department of Gynecological Endocrinology and Reproductive Medicine, University
12 Women's Hospital 69120, Heidelberg, Germany.

13

14 *** Correspondence:**

15 PhD Ilma Simoni Brum

16 Department of Physiology

17 Universidade Federal do Rio Grande do Sul

18 Rua Sarmiento Leite, 500

19 CEP: 90 050-170, Porto Alegre, RS

20 E-mail address: ilma@ufrgs.br

21 Tel: + 55 51 3308-3559

22 **Abstract**

23 *In vitro* maturation presents many advantages and its success is related to the
24 selection of fully grown oocytes. In animal models, staining of *cumulus*-oocyte
25 complexes with Brilliant Cresyl Blue (BCB) is widely used for this selection. However,
26 a lack of information about the safety of BCB makes its applicability in humans
27 questionable. Because granulosa and *cumulus* cells have a close relationship with the
28 oocyte, we aimed to evaluate the effects of BCB on human follicular cells exposed to
29 BCB. Cytotoxicity tests and gene and protein expression of elements related to the cell
30 cycle, as well as to cell death and metabolism, glucose consumption, and estradiol and
31 progesterone secretion, were examined in follicular cells with and without exposure to
32 BCB. Regardless estradiol secretion and glucose consumption, all other evaluations
33 presented similar results between control and treated groups. Therefore, our results
34 should encourage future studies to evaluate the development of embryos derived from
35 human oocytes selected by BCB staining.

36 **Keywords:** *In vitro* maturation, Brilliant Cresyl Blue, granulosa cells, *cumulus*
37 cells, cytotoxicity.

1. Introduction

The selection of immature oocytes destined for *in vitro* maturation (IVM) is still based on morphological characteristics of the *cumulus*-oocyte complex (COC), as it is considered to be noninvasive and fast to perform [1]. Additionally, other techniques can cause cell death or they are expensive [2]. Otherwise, it is well known that morphological criteria alone are not effective determinants of quality factors, such as gene and protein expression [3].

In order to improve the results of assisted reproductive technology (ART), which applies IVM, the selection of competent oocytes, gametes that are passed through a process called 'capacitation' or 'growth phase' [4], is essential. It has been observed that the specific activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) decreases during this process [5]. Therefore, competent oocytes (immature fully grown oocytes) present lower G6PDH specific activity while non-competent oocytes (immature growing oocytes) present higher G6PDH specific activity [5, 6]. Williams et al. described in 1986 [7] that G6PDH activity could be indirectly measured using one supra-vital dye, called brilliant cresyl blue (BCB). Because BCB can be reduced to a colorless compound by G6PDH, the reduction of this dye is associated with G6PDH activity and could consequently select competent gametes. At the end of BCB exposure, oocytes that present blue cytoplasm (BCB positive) are classified as competent gametes, because G6PDH specific activity is lower and the enzyme is not able to reduce the dye. On the other hand, oocytes that present colorless cytoplasm (BCB negative) are classified as immature growing oocytes, as G6PDH specific activity is higher and the enzyme is able to reduce BCB [8].

After the first description of BCB as an appropriate selection method for competent oocytes [8], many other studies have shown that BCB staining can increase IVM, cleavage, and blastocyst rates in animal models [2, 9-11]. However, it is too early to assess the utility of

BCB in human ART [9] because the safety of BCB staining is still in doubt [12, 13] and some results are controversial [9].

It should be noted that BCB staining is applied to COCs (not only to the oocyte), and we should not reject the idea that BCB can cause cellular toxicity in follicular cells, *i.e.*, granulosa cells (GCs), and *cumulus* cells (CCs). Because experiments using follicular cell culture allow faster screening of potential reproductive toxicants [14], it is important to know if BCB has any negative effect on COCs, and only with this knowledge can we try to avoid, or even neutralize them [13].

Unfortunately, the retrieval of oocytes that may be destined for research is difficult [15]. On the other hand, human follicular cells (GCs and CCs) are discarded in ARTs that apply intracytoplasmic sperm injection (ICSI), and they can be easily destined for research [16]. Therefore, examining the effect of BCB on human follicular cells will help us to elucidate the effects of BCB on human COCs.

Keeping in mind the aforementioned realities, the present study was conducted with the main objective of evaluating whether BCB staining is safe for human COCs by examining the effect of BCB on human luteinized follicular cells (GCs and CCs) exposed to BCB.

2. Material & Methods

The Institutional Ethical and Research Committee of the *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* approved this project (#14-0113). All patients provided their written informed consent for the use of follicular cells for research. Thirty-four patients (age between 25 and 45) who underwent ART for infertility treatment were invited to participate in this study. We did not include patients with polycystic ovarian syndrome (PCOS) or patients with less than three aspirated follicles. The causes of infertility were mainly of male origin, although in some cases there was evidence of fallopian tube pathology.

Follicular fluid was aspirated transvaginally under ultrasound guidance during follicular puncture and GCs and CCs were recovered as previously described [17]. Briefly, COCs were isolated and CCs were removed from the oocyte by 25 s of enzymatic treatment (exposure to hyaluronidase solution, Irvine Scientific), followed by repeated pipetting. Then, CCs were resuspended in 5 mL of culture medium, described hereafter. The follicular fluid (without COCs) was centrifuged for 15 min (800 g) in order to separate red blood cells and GCs. The pellet was added to 2 mL of a 50% density gradient (Isolated HEPES from Irvine Scientific) and centrifuged over again for 8 min to separate red blood cells from GCs. This step was repeated one more time to increase red blood cell removal. The purified GC preparation was resuspended in 10 mL of culture medium, counted in a hemocytometer and then plated. GCs and CCs were separately cultivated for 48 h under specific conditions (at 37 °C in 100% relative humidity and a 5% CO₂ atmosphere in air) using Dulbecco's Modified Eagle Medium with phenol red (Sigma, D5796) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco 12657-029), 75 m IU of FSH and 75 m IU of LH (Gonal, MerkSerono), and 1% kanamycin sulfate (Gibco, 15160-054). After this time, cells were treated for 60 min with modified Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (mDPBS) supplemented with 10% fetal bovine serum, 75 m IU of FSH and 75 m IU of LH and 1% of kanamycin sulfate containing 13 µM BCB (Sigma, B5388) (BCB group) or with culture medium (control group). We choose this BCB concentration, diluent, and time exposure on the basis of a previous study by our group, which showed this to be the safest protocol [17]. After treatment, cells were washed with mDPBS, cultivated for an additional 48 h, and then assays (described below) were performed in order to check viability and cellular functions.

2.1 Cytotoxicity Tests - Neutral Red Uptake (NRU) & Sulforhodamine B (SRB)

For toxicity screening of BCB in our cells, the neutral red uptake assay, based on the ability of viable cells to incorporate the supravital dye neutral red (Sigma, N4638), and the

sulforhodamine B (Sigma, S1402-5G) assay, based on the measurement of cellular protein content, were performed. Approximately 5×10^3 GCs and 1×10^3 CCs were plated in each well (96-well plate containing 100 μ L of medium per well).

NRU assay was performed according to the “*Test Method Protocol for the NHK Neutral Red Uptake Cytotoxicity Test*”, with some modifications. Briefly, cells were incubated with 250 μ L of medium containing 25 μ g/mL of neutral red and incubated for 3 h. After incubation, the wells were washed with prewarmed DPBS. To dissolve the developed neutral red crystals, 100 μ L of desorb solution (1% glacial acetic acid, 50% ethanol and 49% H₂O) was added to each well. The plate was incubated for 20 min with shaking and additional 5 min at room temperature. At the end, the optical density (OD) was determined at 540 nm using a microplate reader.

The SRB assay was performed as described previously [18] with some modifications. Briefly, cells were fixed with 50% trichloroacetic acid for 1 h at 4 °C, washed twice with distilled water and then stained for 25 min with SRB solution (0.4% SRB diluted in 1% acetic acid). After staining, the wells were washed repeatedly with 1% acetic acid to remove excess dye. Bound protein was dissolved in 10 mM Tris base solution, incubated with shaking for 10 min, and the OD was determined at 510 nm using a microplate reader.

2.2 Analysis of gene expression by quantitative real-time RT-PCR

Cell numbers between 0.5 and 1×10^5 of GCs or CCs were plated in each well (6-well plate containing 2 mL of medium per well). RNA was isolated using TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), following the manufacturer’s instructions, dissolved in RNase-free water and stored at -80 °C. RNA concentration and purity were assessed using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Rockland, DE, USA). Complementary DNA (cDNA) was synthesized (using 1 μ g of total RNA for CC or 2 μ g of total RNA for GC) after oligo-dT priming with the SuperScript III First-strand System

(Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), following the manufacturer's instructions.

Taqman predesigned assays for *BAX* (Hs00180269_m1), *BCL2* (Hs00608023_m1), *CDKN1A* (Hs00355782_m1), and *TP53* (Hs01034249_m1) and for the endogenous controls *HPRT1* (Hs02800695_m1) and β -*actin* (Hs00984230), as well as the TaqMan universal PCR master mix were purchased from Applied Biosystems by Life Technologies (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Table 1 describes the target and endogenous sequences used in this study. Samples were amplified on a StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in a total volume of 10 μ L per reaction. Relative quantitative expression analysis was performed using the $\Delta\Delta$ -CT method. Untreated GCs and CCs were used as calibrators in each run.

Table 1. NCBI reference, primers sequence, genomic location and cell function for target and endogenous sequences.

Gene symbol	Name	NCBI ref. seq.	Genomic location	Cell function
<i>HPRT1</i>	<i>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase</i>	NM_000194.2	Xq26.1	Metabolic salvage of purines
<i>ACTB</i>	β - <i>actin</i>	NM_001101.3	7p22	Cytoskeletal structural protein
<i>BAX</i>	<i>BCL2-associated X protein</i>	NM_001291428.1	19q13.3-q13.14	Apoptosis signaling (proapoptotic)
<i>CDKN1A</i>	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1 A</i>	NM_000389.4	6p21.2	Regulator of cell cycle progression
<i>TP53</i>	<i>Tumor protein p53</i>	NM_000546.5	17p13.1	Response to cellular stresses
<i>BCL2</i>	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>	NM_000633.2	18q21.3	Apoptosis signaling (antiapoptotic)

2.3 Analysis of protein expression by western immunoblotting

Cell numbers between 0.5 and 1×10^5 of GCs or CCs were plated in each well (6-well plate containing 2 mL of medium per well). Cells were trypsinized and precipitated after centrifugation (at 4 °C for 10 min at 2,000 g). The supernatant was discarded and 1 mL of lysis buffer (RIPA buffer: 50 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1% Triton X-100; 0.25% sodium deoxycholate; 1 mM PMSF; 1 µg/mL leupeptin; and 1 mM sodium fluoride) was added to the precipitate. Cells were homogenized, incubated for 1 h at 4 °C and vortexed. The homogenized was centrifuged over again (at 10,000 g for 10 min at 4 °C) and the supernatant containing proteins was stored at -20 °C. Protein concentration was measured by a fluorescent method (Qubit[®] protein assay kit, Thermo Fischer Scientific), following the manufacturer's instructions. Approximately 50 µg of protein were incubated in Laemmli buffer [50% glycerol, 10% sodium dodecyl sulfate (SDS), 62.5 mM Tris, 0.1% bromophenol blue, and 0.05% 2-β-mercaptoethanol] at 95 °C for 3 min and pipetted onto an SDS-polyacrylamide gel (8% to 12 %) for electrophoresis. Buffer containing 192 mM glycine, 25 mM Tris and 0.1% SDS at pH 8.3 was used for electrophoresis, which was carried out for 2 h in a 120 V/cm electric field. Proteins were transferred to a polyvinylidenedifluoride (PVDF) membrane in a semidry system for 1 h in a 25 V/cm electric field and the membrane was blocked for 1 h (TBS-T with 1% bovine serum albumin). PVDF membranes were incubated with shaking at 4 °C overnight with specific antibodies (target proteins: Bax – Cell Signaling #2772 and GAPDH – Millipore #MAB374, and loading protein control: β-actin – Applied Biosystem Ambion #AM4302 or β-tubulin - Invitrogen #32-2600). After incubation, PVDF membranes were washed with TBS, incubated for 2 h with secondary antibody and then washed again with TBS. Finally, membranes were incubated in a solution for enhanced chemiluminescence and placed on photographic film (CL-Exposure Film, Pierce). The film was washed in developer solution and then in fixing solution. After development, OD values

were measured using Image Station IS 40000 MM Pro[®] and densitometry for each protein was corrected for β -actin or β -tubulin.

2.4 Biochemical dosages

Approximately 5×10^4 GCs or CCs were plated in each well (6-well plate containing 2 mL of medium per well). At the end of the experiment, the supernatant was collected and estradiol and progesterone levels were evaluated by electrochemiluminescence (ECL) and competitive ECL, respectively, using commercial kits (Cobas e602 and Cobas e601). Glucose was measured by quantitative enzymatic determination using the hexokinase enzyme (HK) commercial kit (Cobas c702). Hormonal dosages on culture medium (without cell culture) were also checked as control to avoid interference from the FBS.

2.5 Statistical analysis

Data distribution was checked by Shapiro-Wilk test and then evaluated using a Mann-Whitney-U or paired *t*-test. Results are presented as mean \pm standard error or median and interquartile range. Additionally, for cytotoxicity tests and biochemical dosages, results were evaluated adopting the control group as 100%, so that we were able to work with percentages. Percentage distribution was checked by Shapiro-Wilk test and then evaluated using one-sample Wilcoxon or one-sample *t*-test. Statistical analysis was carried out with SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences V. 22.0*) and the level of statistical significance was set at $P \leq 0.05$.

3. Results

Cytotoxic assays results (using raw values or percentage) were similar between control and treated groups, independent of cell type (GC or CC) and consistent in both cytotoxicity assays (NRU or SB), as shown in Figures 1 and 2.

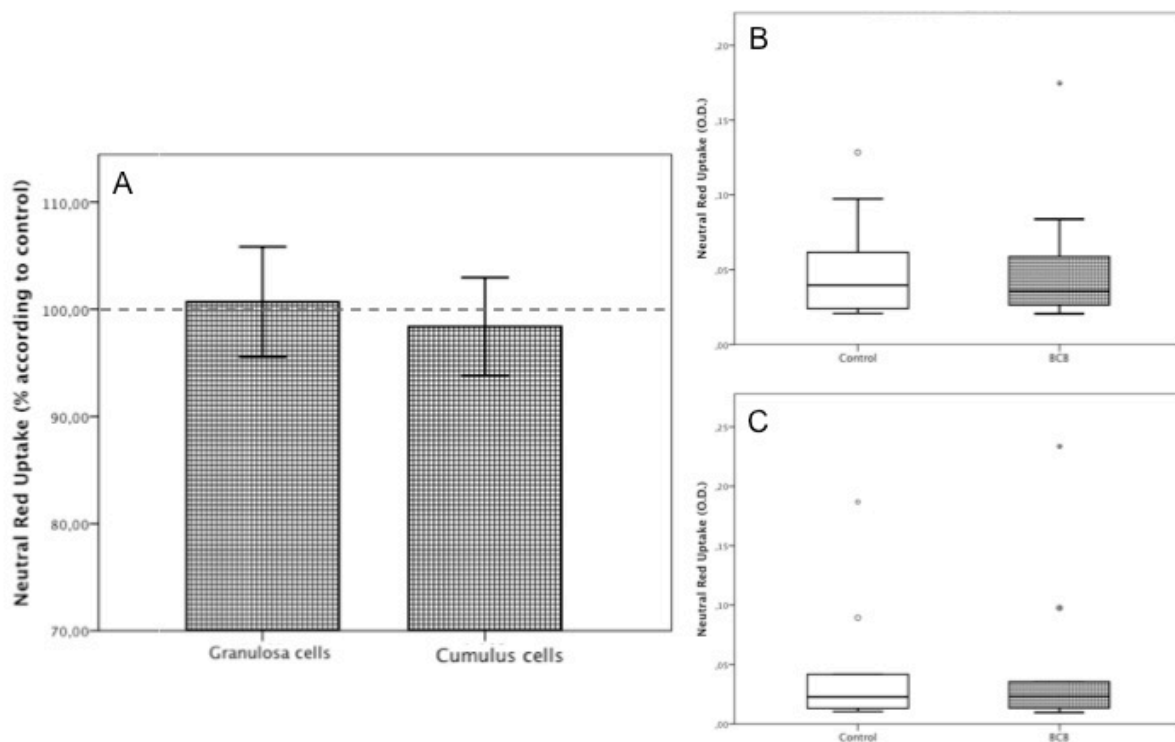


Figure 1 – Neutral red uptake in control and treated follicular cells. A) GCs (n = 12 patients) and CCs (n = 10 patients) treated with BCB compared with control group in percentage ($P = 0.894$, and $P = 0.733$, respectively). B) Raw values of GCs ($P = 0.954$) and C) CCs ($P = 0.1$), comparing control and BCB groups.

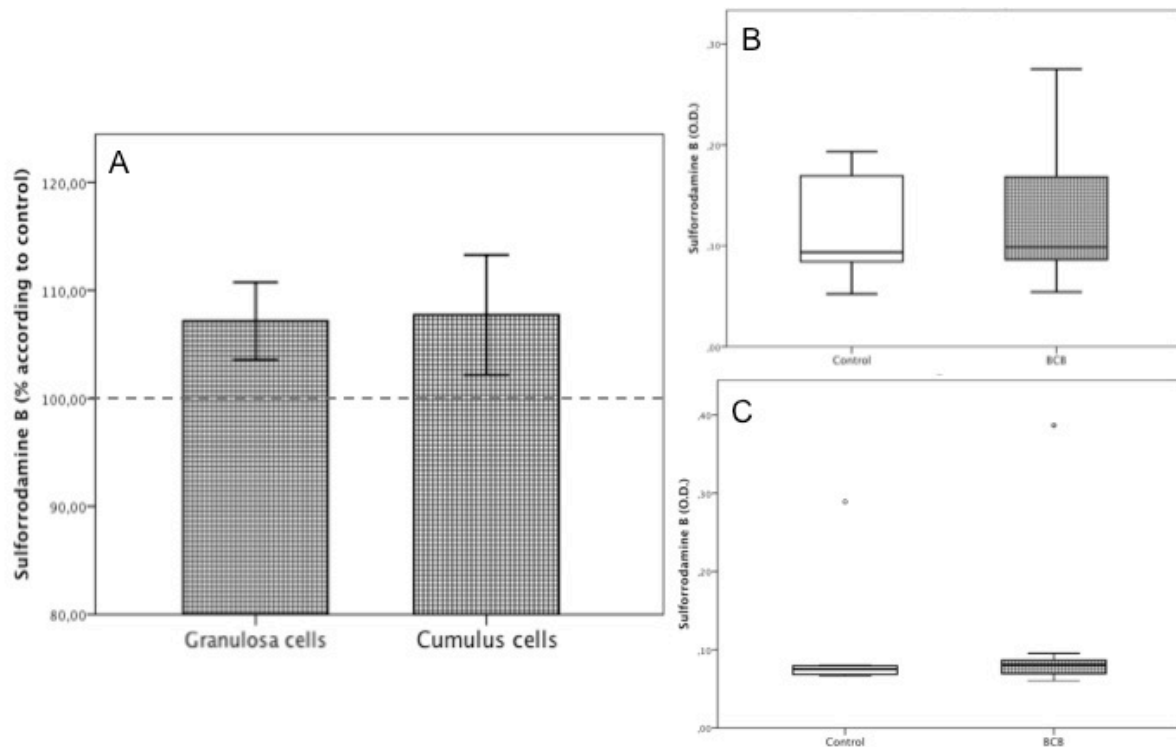


Figure 2 – Sulforhodamine B in control and treated follicular cells. A) GCs (n = 12 patients) and CCs (n = 9 patients) treated with BCB compared with control group in percentage ($P = 0.071$, and $P = 0.202$, respectively). B) Raw values of GCs ($P = 0.644$) and C) CCs ($P = 0.402$), comparing control and BCB groups.

Additionally, gene expression of *BAX* ($P = 0.438$ and $P = 0.815$), *CDKN1A* ($P = 0.387$ and $P = 0.481$), *TP53* ($P = 0.863$ and $P = 0.606$), and *BCL2* ($P = 0.353$ and $P = 0.196$) in GCs and CCs did not change when control and BCB treated groups were compared, as shown in Figures 3 and 4 (*BCL2* gene expression presented normal distribution, but its graphic representation follows other expression gene data – non parametrical distribution). Furthermore, *BAX/BCL2* and *BCL2/BAX* gene expression ratios were similar between GCs ($P = 0.073$ and $P = 0.136$, respectively) and CCs ($P = 0.482$ and $P = 0.482$, respectively) treated or not with BCB (data not shown).

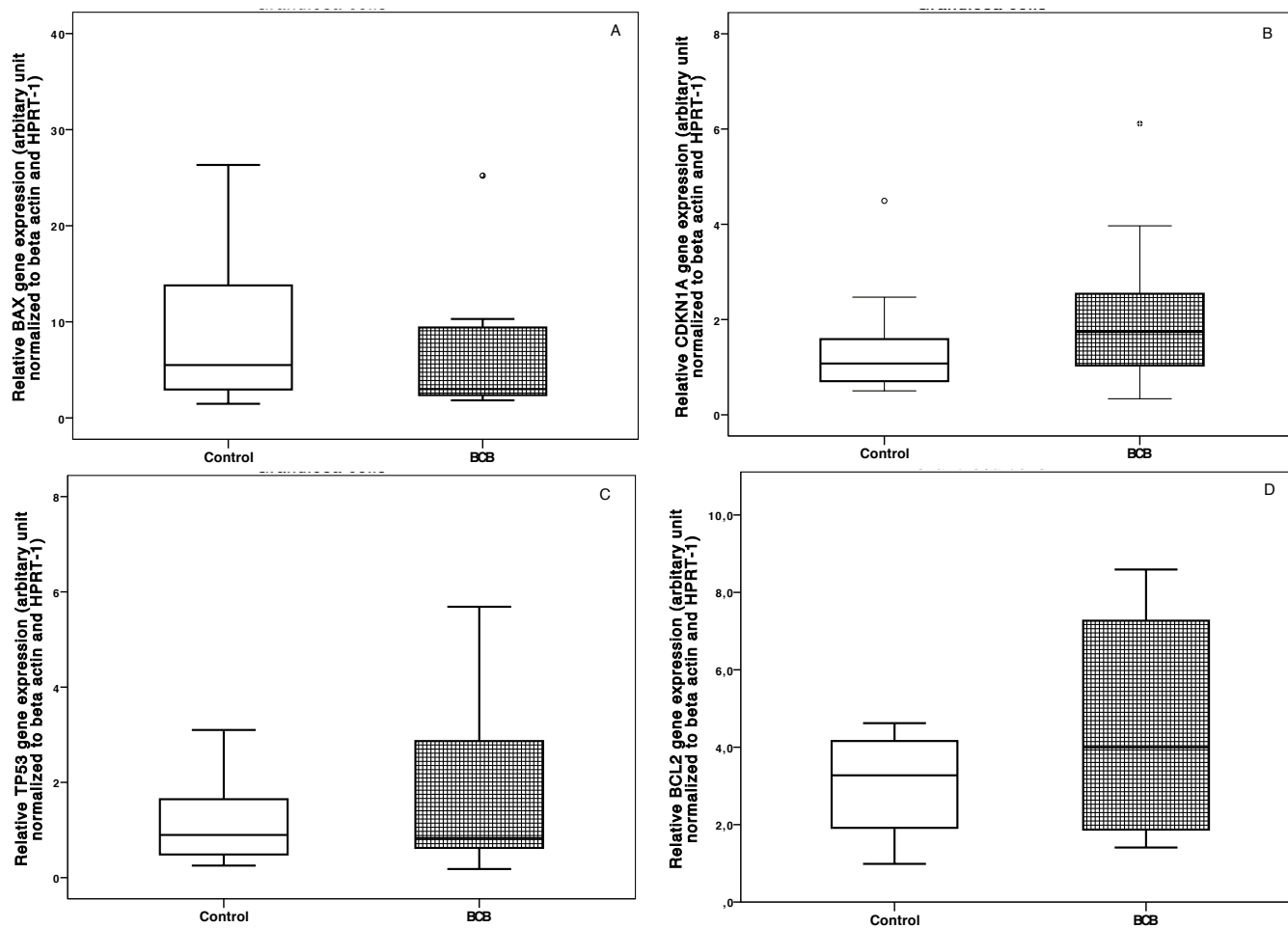


Figure 3 – Gene expression of A) *BAX*, B) *CDKN1A*, C) *TP53*, and D) *BCL2* in GCs.

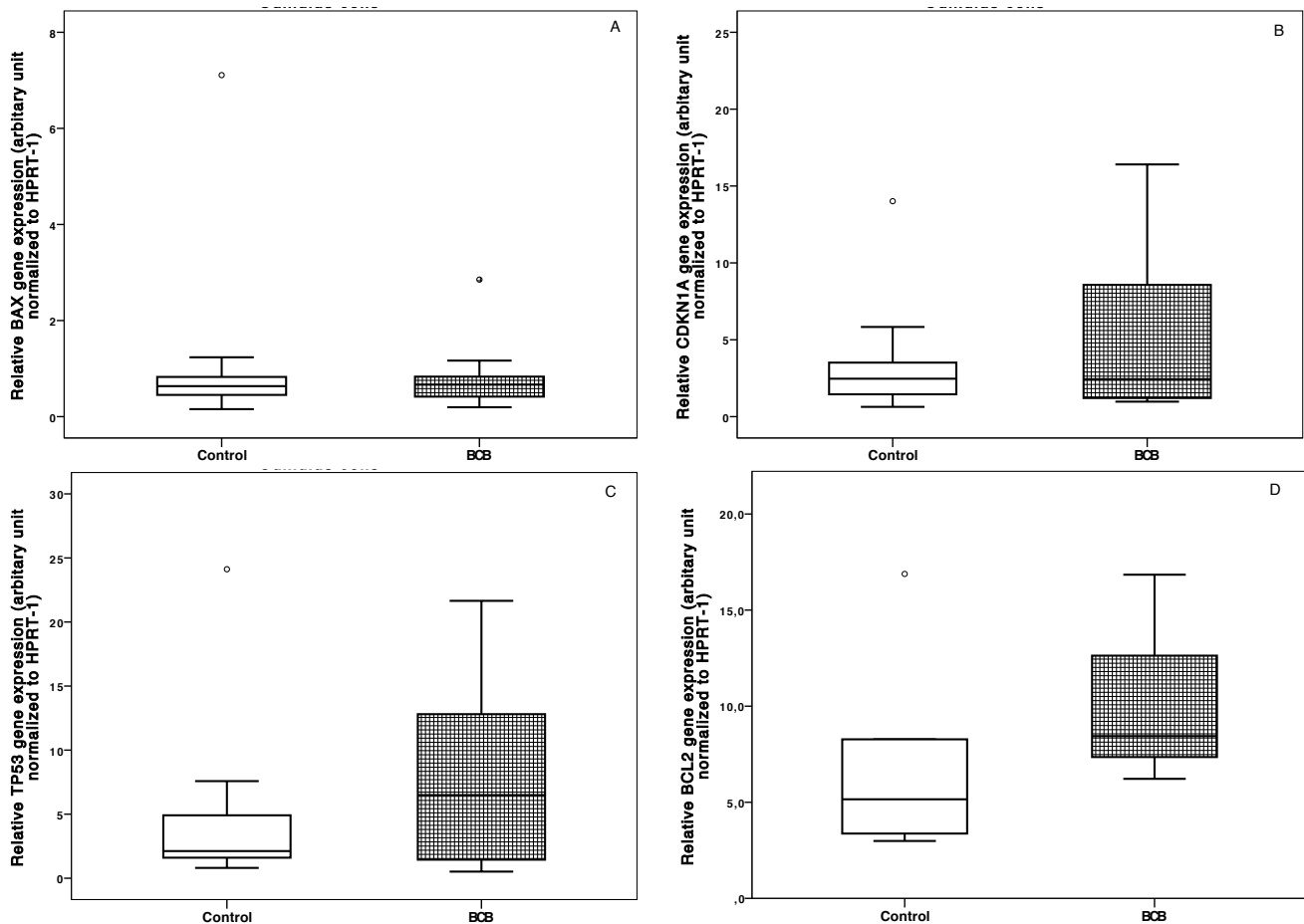


Figure 4 – Gene expression of A) *BAX*, B) *CDKN1A*, C) *TP53*, and D) *BCL2* in CCs.

In agreement with gene expression results, BAX protein expression did not change when cells were exposed to BCB ($P = 0.492$ for GCs and $P = 0.406$ for CCs). Similarly, GAPDH protein expression was similar among groups ($P = 0.864$ for GCs and $P = 1.00$ for CCs), as shown in Figures 5 and 6.

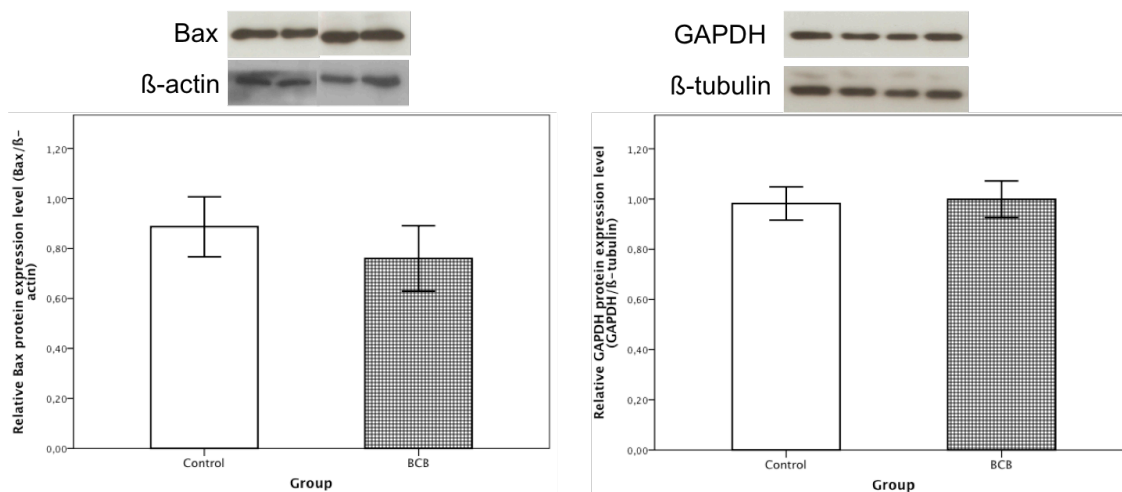


Figure 5 – Bax and GAPDH protein expression in GCs. Images are representative of blots (n = 6 and 7).

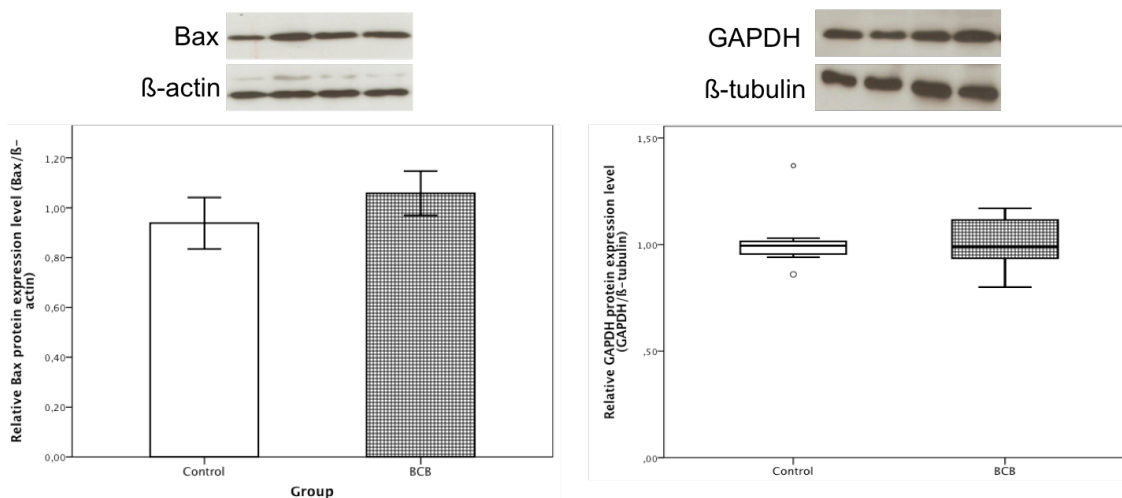


Figure 6 – Bax and GAPDH protein expression in CCs. Images are representative of blots (n = 5 and 8).

Comparing raw values, estradiol released by GCs ($P = 0.436$) and CCs ($P = 0.190$) in the medium did not change according to the group (Figures 7B and 7C, respectively). Likewise, glucose consumed by GCs ($P = 0.714$) or CCs ($P = 0.276$) was similar among control and BCB groups (Figures 8B and 8C, respectively). On the other hand, adopting the

control group as 100% and comparing percentages, estradiol content in the supernatant of GCs ($P = 0.005$) and CCs ($P = 0.004$) exposed to BCB was lower (Figure 7A). Additionally, glucose content in the supernatant of CCs ($P = 0.011$) exposed to BCB was higher, compared to control group (Figure 8A). This difference was not found in GCs ($P = 0.237$), as shown in Figure 8A.

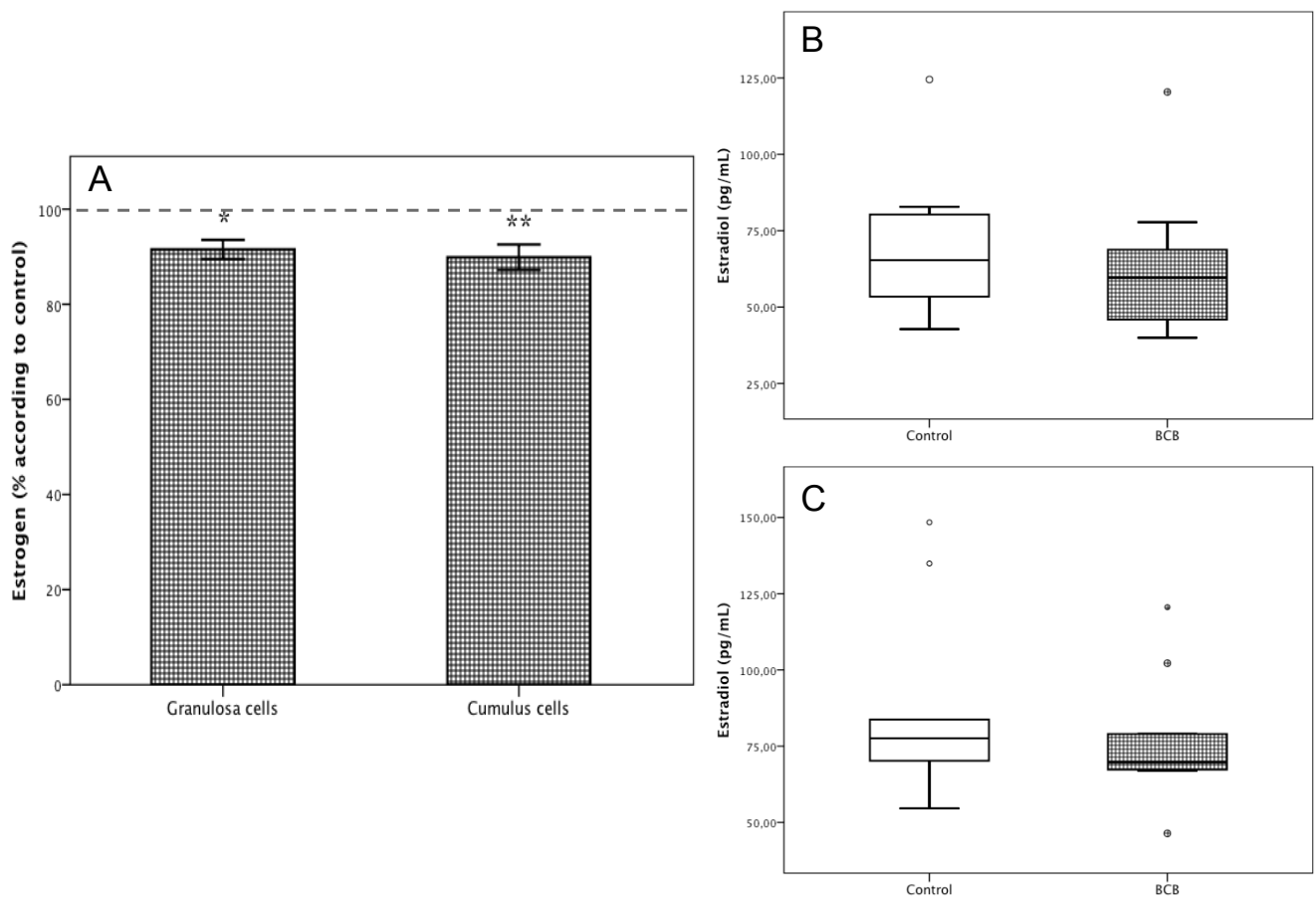


Figure 7 – Estradiol content in the supernatant of follicular cells. GCs (n = 10 patients) and CCs (n = 8 patients) treated with BCB compared with the control group in percentage (A). Raw values (pg/mL) of estradiol secreted in the supernatant by GCs (B) and CCs (C), comparing control and BCB groups. * different from control group ($P = 0.005$); ** different from control group ($P = 0.004$).

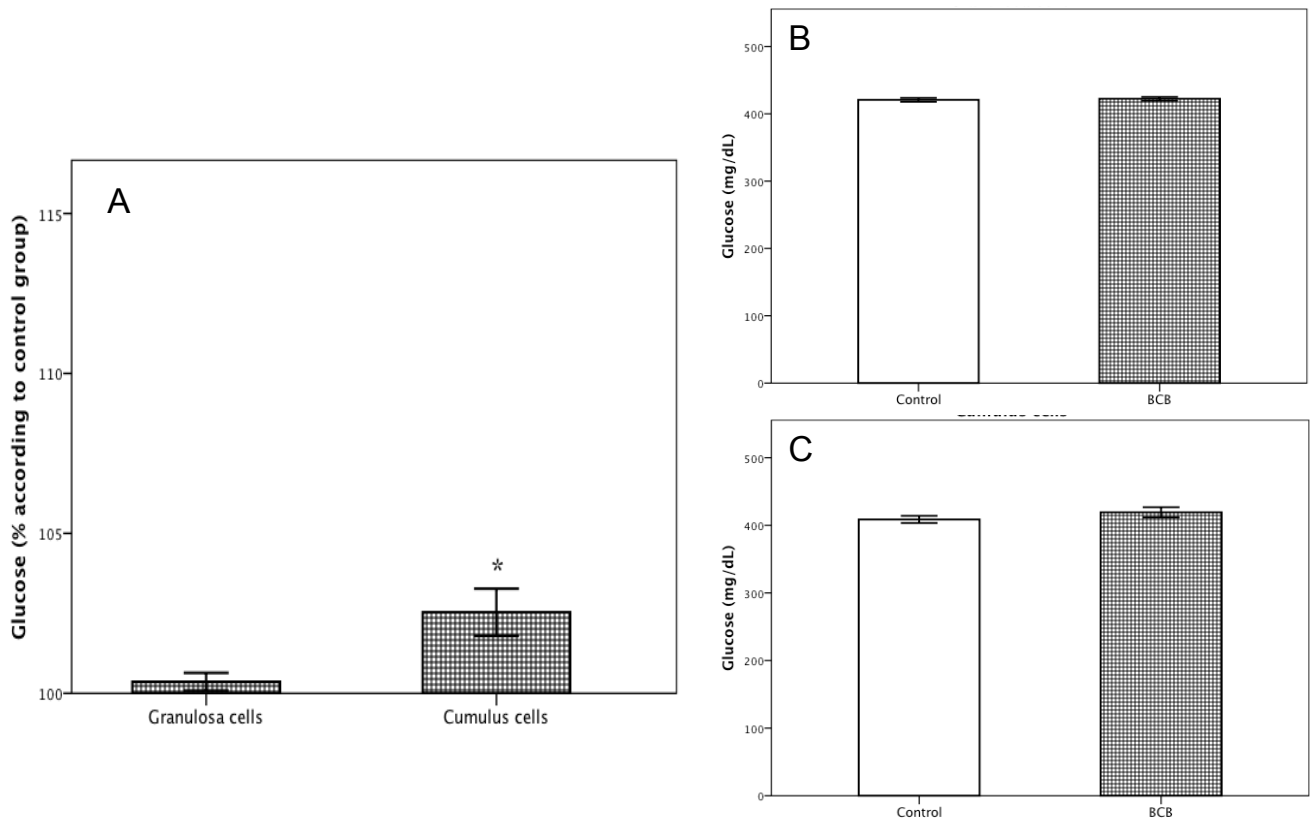


Figure 8 – Glucose content in the supernatant of follicular cells. GCs (n = 10 patients) and CCs (n = 8 patients) treated with BCB compared with the control group in percentage (A). Raw values (mg/dL) of glucose in the supernatant of GCs (B) and CCs (C), comparing control and BCB groups. * different from control group ($P = 0.011$).

All progesterone dosages (n = 10) were higher than the detection limit (>60 ng/mL), independently of group or cell type (data not shown).

4. Discussion and Conclusion

The selection of competent fully-grown oocytes for IVM remains a bottleneck in the *in vitro* production of mammalian embryos. Ideally, this method should be simple, rapid, effective and should not present toxicity neither for the oocyte nor for follicular cells [3, 19]. Unfortunately, we do not have such a method to date [3, 20].

The selection of competent oocytes using BCB appears to be promising, but its clinical applicability on humans is too far away [9], owing to its questionable safety [12, 13]. Because the quality of follicular cells (based on their molecular structure) is related to oocyte and embryo characteristics [21, 22], the effect of BCB staining on GCs and CCs may help us to elucidate whether BCB shows toxicity to human oocytes [17]. Additionally, oocytes exchange inorganic ions and small molecules with CCs through gap junctions [16] and they present a complex communication with all somatic cells surrounding them; therefore, any negative effect of BCB on CCs could be indirectly passed to the egg /and should be evaluated [14].

It is well known that cellular viability of cultivated mammalian cells can be impaired in the presence of toxic agents [23]. In an earlier publication from our group, we showed that exposure of GCs and CCs to 13 μ M BCB (diluted in mDPBS) for 60 min does not impair cell quality and it is the safest BCB staining protocol for use in humans [17]. We only evaluated cell proliferation (cell count with Trypan blue) and cellular viability (MTT assay); however, the MTT assay has been questioned as a suitable method as the results can be influenced by many biases [24, 25]. Therefore, it is important to examine the effect of BCB staining on human follicular cells by applying more reliable tests and checking the cell protein content by SRB assay, which is an effective way to observe cellular toxicity and presents good cost benefit [18]. It has already been shown that the SRB assay is able to detect small differences between groups, even with a small number of cells. Additionally, comparing four different cytotoxicity assays (including MTT), it has been demonstrated that SRB is the most accurate method [25]. Corroborating our previous results [17], cellular viability, evaluated by SRB assay, of GCs and CCs exposed to BCB was not different from that of the control group, demonstrating that the cellular protein content was not altered by exposure to BCB. Since embryos use proteins derived from the oocytes at the beginning of the cleavage stage, the

amount of protein in the cell is one important safety parameter to be checked in the techniques applied to the egg.

Another way to verify cellular toxicity is to evaluate the effect of agents on cellular membranes [23]. The concentration of the vital dye neutral red (NR), which remains in the cells, is directly related to the number of viable cells, as cellular stresses will negatively affect lysosomal membranes and consequently, impair the capacity of NR incorporation by the lysosome [23]. According to our results, we conclude that BCB staining does not impair membrane integrity, confirming the safety of this protocol.

The importance of examining not only toxicity tests but also molecular markers in order to confirm the safety of one substance should be pointed out. The tumor protein p53 (*TP53*) is considered a guardian of the genome, because in the wake of cell stresses (such as DNA damage), it can upregulate genes that can interrupt the cell cycle or promote cell death, such as *CDKN1A* and *BAX*, respectively [26]. The former encodes the p21 protein, which is considered as one *checkpoint protein* because it can inhibit cyclin-dependent kinases (CDKs) and consequently, interrupts DNA synthesis and cell cycle. This protein is responsible for verifying DNA quality before cells undergo mitosis (between G2 and M phases), avoiding the proliferation of DNA-damaged cells [27, 28]. We hypothesized that BCB could cause DNA damage and increase the expression of *TP53*, which would consequently increase *CDKN1A* gene expression, in order to interrupt cell cycle. However, according to our results, based on gene expression of *TP53* and *CDKN1A*, the cell cycle of follicular cells exposed to BCB was not compromised. This is in agreement with previous results, which have shown that the cell proliferation rate is similar between GCs and CCs exposed or not to BCB [17].

We should keep in mind that cell cycle is a crucial balance between cell proliferation and cell death [27]. Therefore, it is important to evaluate not only *checkpoint proteins* but also elements involved in apoptosis. It is well established that the BCL2 family regulates apoptosis, acting as proapoptotic factors (such as Bax) or inhibiting this process and

consequently, acting as antiapoptotic factors (such as Bcl-2) [29]. In our study, BAX gene and protein expression was not different between cells treated or not with BCB and these results corroborate another study that compared *Bax* expression between BCB-positive and -negative oocytes [30]. It is important to note that we did not find any difference in the *BAX/BCL2* gene expression ratio, in accordance with protein results already described in the literature [31]. Bax is one well-known target of p53, causing cell death. However, another alternative pathways triggering apoptosis should be also evaluated. One of these alternative pathways involves GAPDH, but the precise mechanism underlying the involvement of GAPDH in apoptosis is still unclear. It has already been demonstrated that pro-apoptotic agents increase not only BAX gene and protein expression but also GAPDH: both of these elements can cause cell death, but act through different pathways [32]. Therefore, we evaluated BAX and GAPDH protein expression in order to confirm that BCB does not promote cell death. Protein expression of both elements (BAX and GAPDH) of follicular cells exposed to BCB was not altered between treated and control groups, corroborating the results of gene expression and cytotoxicity tests.

In spite of the extraglycolytic functions of GAPDH, *i.e.*, those associated with cell proliferation [33] and cell death [32], we should keep in mind the main function of GAPDH, which is to regulate cellular metabolism. It is one important enzyme for ATP and pyruvate production through anaerobic glycolysis [33], which is the main pathway of glucose metabolism in ovarian follicles. Pyruvate produced by follicular cells (after glucose metabolism) is transported to the egg and it is important for oocyte metabolism [34]. Negative effects of BCB on this enzyme could reflect a lower amount of pyruvate for the oocyte; hence, we checked GAPDH protein expression. Independently of cell type, GAPDH protein expression was similar between treated and control groups, indicating that available pyruvate for the oocyte would not suffer under the influence of BCB staining.

The aforementioned results indicate that BCB staining seems to be safe for human follicular cells. Nevertheless, an evaluation of estrogen secretion and glucose consumption could refute this conclusion. From these results, we should highlight two points: firstly, estrogen secretion and glucose consumption presented statistically significant differences between control and BCB groups only when we evaluated the results as percentages (raw values did not present differences among groups). We can assume that this percentage difference between groups is negligible (approximately 2%), and thus it may have no clinical significance. The second important point to highlight is that we divided follicular cells between exposed and not exposed to BCB (control and treated group). The treated group is composed not only of BCB positive-follicular cells but also of BCB-negative follicular cells, and they could indirectly impair the quality of the good ones [2], culminating in the statistical difference that was found.

As a whole we can conclude that BCB staining, applying the correct protocol, seems to be safe for use in humans. We have already largely checked the BCB safety on human follicular cells and now it is time to check the benefits of using BCB in selecting human competent eggs. For that, further investigations are needed.

5. Acknowledgments

The authors thank the *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* for statistical advice and financial support. Edison Capp, Ilma Simoni Brum, Diego Alcoba and Júlia Schneider received scholarships from CNPq. Diego Alcoba received a scholarship from CAPES (process number 12907/13-8).

6. References

- [1] Ola, S.I. and Q.Y. Sun, *Factors influencing the biochemical markers for predicting mammalian oocyte quality*. J Reprod Dev. 58 (2012) 385-92.
- [2] Salviano, M.B., et al., *Bovine non-competent oocytes (BCB-) negatively impact the capacity of competent (BCB+) oocytes to undergo in vitro maturation, fertilisation and embryonic development*. Zygote. 24 (2016) 245-51.
- [3] Goovaerts, I.G., et al., *Noninvasive bovine oocyte quality assessment: possibilities of a single oocyte culture*. Theriogenology. 74 (2010) 1509-20.
- [4] Hyttel, P., *Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle*. Theriogenology. 47 (1997) 23-32.
- [5] Mangia, F. and C.J. Epstein, *Biochemical studies of growing mouse oocytes: preparation of oocytes and analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase activities*. Dev Biol. 45 (1975) 211-20.
- [6] Tsutsumi, O., et al., *Determination of enzyme activities of energy metabolism in the maturing rat oocyte*. Mol Reprod Dev. 33 (1992) 333-7.
- [7] Williams, T.J., *A technique for sexing mouse embryos by a visual colorimetric assay of the X-linked enzyme, glucose 6-phosphate dehydrogenase*. Theriogenology. 25 (1986) 733-9.
- [8] Ericsson, S., *Assessment of porcine oocytes using brilliant cresyl blue*. Theriogenology. 39 (1993) 214.
- [9] Abazari-Kia, A.H., et al., *Intracellular glutathione content, developmental competence and expression of apoptosis-related genes associated with G6PDH-activity in goat oocyte*. J Assist Reprod Genet. 31 (2014) 313-21.
- [10] Sadeesh, E., *Expression profile of developmentally important genes between hand-made cloned buffalo embryos produced from reprogramming of donor cell with oocytes extract and selection of recipient cytoplasm through brilliant cresyl blue staining and in vitro fertilized embryos*. Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 31 (2014) 1541-1552.
- [11] Fu, B., et al., *Subcellular Characterization of Porcine Oocytes with Different Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Activities*. Asian-Australas J Anim Sci. 28 (2015) 1703-12.
- [12] Opiela, J. and L. Katska-Ksiazkiewicz, *The utility of Brilliant Cresyl Blue (BCB) staining of mammalian oocytes used for in vitro embryo production (IVP)*. Reprod Biol. 13 (2013) 177-83.
- [13] Pawlak, P., et al., *Differences in cytoplasmic maturation between the BCB+ and control porcine oocytes do not justify application of the BCB test for a standard IVM protocol*. J Reprod Dev. 60 (2014) 28-36.
- [14] Stefansdottir, A., et al., *Use of ovary culture techniques in reproductive toxicology*. Reprod Toxicol. 49 (2014) 117-35.
- [15] Catala, M.G., et al., *Effect of oocyte quality on blastocyst development after in vitro fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in a sheep model*. Fertil Steril. 97 (2012) 1004-1008.
- [16] Winterhager, E. and G.M. Kidder, *Gap junction connexins in female reproductive organs: implications for women's reproductive health*. Hum Reprod Update. 21 (2015) 340-52.
- [17] Alcoba, D.D., et al., *Safety of brilliant cresyl blue staining protocols on human granulosa and cumulus cells*. Zygote. 24 (2016) 83-8.
- [18] Vichai, V. and K. Kirtikara, *Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening*. Nat Protoc. 1 (2006) 1112-1116.

- [19] Bols, J., *High throughput non-invasive oocyte quality assessment: the search continues*. *Animal Reproduction*. 9 (2012) 420-425.
- [20] Torner, H., et al., *Molecular and subcellular characterisation of oocytes screened for their developmental competence based on glucose-6-phosphate dehydrogenase activity*. *Reproduction*. 135 (2008) 197-212.
- [21] Li, Y., et al., *Increased GDF9 and BMP15 mRNA levels in cumulus granulosa cells correlate with oocyte maturation, fertilization, and embryo quality in humans*. *Reprod Biol Endocrinol*. 12 (2014) 81.
- [22] Xu, X., et al., *Molecular signature in human cumulus cells related to embryonic developmental potential*. *Reprod Sci*. 22 (2015) 173-180.
- [23] NIEHS, N.I.o.E.H.S., *Test Method Protocol for the NHK Neutral Red Uptake Cytotoxicity Test*, in *A Test for Basal Cytotoxicity for an In Vitro Validation Study Phase III*. 2003.
- [24] Stepanenko, A.A. and V.V. Dmitrenko, *Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability*. *Gene*. 574 (2015) 193-203.
- [25] van Tonder, A., A.M. Joubert, and A.D. Cromarty, *Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays*. *BMC Res Notes*. 8 (2015) 47.
- [26] Golubovskaya, V.M. and W.G. Cance, *Targeting the p53 pathway*. *Surg Oncol Clin N Am*. 22 (2013) 747-64.
- [27] Vermeulen, K., Z.N. Berneman, and D.R. Van Bockstaele, *Cell cycle and apoptosis*. *Cell Prolif*. 36 (2003) 165-175.
- [28] Cmielova, J. and M. Rezacova, *p21Cip1/Waf1 protein and its function based on a subcellular localization*. *J Cell Biochem*. 112 (2011) 3502-3506.
- [29] Zinkel, S., A. Gross, and E. Yang, *BCL2 family in DNA damage and cell cycle control*. *Cell Death Differ*. 13 (2006) 1351-9.
- [30] Mohammadi-Sangcheshmeh, A., et al., *Association of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity with oocyte cytoplasmic lipid content, developmental competence, and expression of candidate genes in a sheep model*. *J Assist Reprod Genet*. 31 (2014) 1089-98.
- [31] Opiela, J., et al., *Interactions among activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in immature oocytes, expression of apoptosis-related genes Bcl-2 and Bax, and developmental competence following IVP in cattle*. *Theriogenology*. 69 (2008) 546-55.
- [32] Chen, R.W., et al., *Involvement of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and p53 in neuronal apoptosis: evidence that GAPDH is upregulated by p53*. *J Neurosci*. 19 (1999) 9654-9662.
- [33] Nicholls, C., H. Li, and J.P. Liu, *GAPDH: a common enzyme with uncommon functions*. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 39 (2012) 674-679.
- [34] Dumesic, D.A., et al., *Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health*. *Fertil Steril*. 103 (2015) 303-316.

7.5 - Artigo 5: *“Putative functional link between FMR1 expression and AKT/mTOR-signaling pathway during follicular control in human granulosa cells”*

Artigo com intenção de submissão para a revista *“Human Reproduction”*.

1. Title Page

Putative functional link between *FMR1* expression and AKT/mTOR– signaling pathway during follicular control in human granulosa cells

Rehnitz J. *, Alcoba D.D. */**, Brum I.S. **, Strowitzki T. ***, Vogt P.H.*

* Reproduction Genetics Unit, Dept. Gynecological Endocrinology and Reproductive
Medicine,

University Women's Hospital 69120 Heidelberg, Germany

** Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral, Instituto de Ciências
Básicas da Saúde, Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande
do Sul, 90050-170 Porto Alegre, Brazil.

*** Dept. Gynecological Endocrinology and Reproductive Medicine, University
Women's Hospital 69120 Heidelberg, Germany

Corresponding author: julia.rehnitz@med.uni-heidelberg.de

2. Abstract

Putative functional link between *FMR1* expression and AKT/mTOR – signaling pathway during follicular control in human granulosa cells

Study question: Assessment of *FMR1*/FMRP expression and the putative linked AKT/mTOR-signal-pathway in human granulosa cells modulated by FSH-stimulation.

Summary answer: FSH-stimulation activates *AKT-/mTOR*-expression but represses *S6K*- and *FMR1*-expression, while FMRP-expression increases during granulosa cellular growth. Results suggest a functional-link between them during follicular-maturation-process. Specific pathway inhibitor assays support these findings.

What is known already: In rodents AKT/mTOR regulates early folliculogenesis by maintaining primordial follicles in dormancy induced by FSH for further differentiation and maturation. Consequently, FSH is used to stimulate oocyte-maturation in women for ART. Increased FSH-dosages are used in cases of diminishing ovarian reserve (DOR). Increased *FMR1*-expression in women carrying an *FMR1*-CGG_n-premutation (n>54) in exon1 is known to reduce FMRP-expression and it is associated with premature ovarian insufficiency/failure (POI/F). FMRP is mainly expressed in human granulosa cells within female ovary. As further studies suggest that CGG-triplet-numbers below or above n=26-34 also affect ovarian reserve, the level of *FMR1*/FMRP-expression can be considered as novel ovarian-reserve-marker.

Study design, size, duration: Human COV434 granulosa cell line was used as model system for FSH-stimulated cell-growth-control. Specific gene expression

profiles of *AKT*, *mTOR* and *S6K*, as part of the AKT/mTOR-signaling pathway are compared to profiles of *FMR1*/FMRP before and after inhibiting specific AKT/mTOR-components.

Participants/materials, setting, methods: COV434 cell-line was treated with recFSH or the AKT-, mTOR-specific inhibitors MK-2206-2HCL and Rapamycin, respectively. TaqMan-analysis was performed to compare mRNA expression levels of *AKT*, *mTOR*, *S6K* and *FMR1* genes before and after FSH stimulation and inhibitor treatment. Protein expression was determined using specific ELISAs. Statistical analysis including Mann-Whitney U and T-test were carried out with SPSS statistic software; statistical significance was set as $P \leq 0.05$.

Main results and the role of chance: Expression profiles of *AKT* and *mTOR* in COV434 increased significantly ($P=0.05$ and $P=0.015$) after treatment with recFSH. Surprisingly, *S6K*-expression decreased during the same treatment like *FMR1* expression ($P=0.05$ and $P=0.031$). After cell-line treatment with mTOR/AKT-inhibitors *FMR1*- and *S6K*-expression both significantly increased ($P \leq 0.05$). These findings suggest a putative functional link between expression of the mTOR/AKT signaling-pathway and the ovarian reserve marker gene *FMR1* indicated by the *S6K* expression level. Both are potentially involved in human folliculogenesis and oocyte maturation, as well as in ovarian reserve. Results are helpful to elucidate how FSH affects molecular mechanisms during follicular growth and under controlled ovarian stimulation. This suggests new starting points for functional research of human folliculogenesis and its disorders like POI/POF and DOR.

Limitations, reasons for caution: Presented description of a putative link of mTOR/AKT signal-pathway to *FMR1*-expression after FSH stimulation is based on the use of the COV434 granulosa cell line model. Before drawing conclusions for any

clinical application these results have to be confirmed on primary granulosa-cell-cultures of women with different ovarian reserve.

Wider implications of the findings: Besides suggesting a potential functional link of *FMR1*- and *mTOR-AKT*-expression in human granulosa cells, presented data offer novel starting points for further functional assays of human folliculogenesis. They reveal putative novel interferences between follicular maturation and molecular control to maintain the follicular pool after FSH stimulation.

Study funding/competing interest(s): This study was supported by the DFG (German Research Foundation) research grant – reference number: RE 3647/1-1 (to J. Rehnitz). D. Duarte Alcoba was scholarship recipient from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES/PDSE, Brazil. I. Simoni Brum is a scholarship recipient from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, Brazil. The authors declare no conflict of interest.

Trial registration number: not applicable

3. Key words: *FMR1*, mTOR, FSH stimulation, POI/POF, Granulosa Cell

4. Introduction

Human ovarian reserve is determined early during fetal development where female primordial follicles are formed including primordial germ cells. Within these follicles immature oocytes already surrounded by pre-granulosa cells form a functional entity and represent the female reproductive potential. The follicular maturation up to early antral follicle is mainly independent of gonadotropins first while later the cyclic maturation up to ovulatory follicles depends on follicle stimulating hormone (FSH) [Zelevnik, 2004]. FSH acts via its specific receptor on follicular granulosa cells and increases gap junction between them and the oocyte in mice. It thereby controls communication between these two cellular departments during folliculogenesis [El-Hyek and Clarke, 2015]. In human these mechanisms are putative likewise. This and their better availability compared to human oocytes makes granulosa cells attractive for research concerning folliculogenesis and its disorders.

Recombinant FSH (RecFSH) is used therapeutically to stimulate women from early antral follicles during ART (assisted reproduction treatment). In women with diminishing ovarian reserve the use of increasing FSH-dosages seems to be limited to a maximum dose [Lefebvre et al., 2015].

The mTOR-/Pi3K- (mammalian Target Of Rapamycin / Phosphatidylinositol 3-Kinase) signaling pathway is thought to be a major regulator mechanism initiating on the one hand the dormant follicles to activation and on the other hand further follicular growth and maturation [reviewed in Hsueh et al., 2015]. Activity of mTORC1, the rapamycin sensitive mTOR complex 1, is suppressed by the heterodimeric Tuberosclerosis Complex 1 (hamartin) and 2 (tuberin) (TSC1 and 2). mTORC1 gets activated by phosphorylated TSC1+2 and further on initiates the phosphorylation of S6K (ribosomal protein S6 kinase), which induces the protein translation and oocyte growth [Sobinoff et al., 2013, Gorre et al., 2014, Adhikari and

Liu, 2010]. Deletion of TSC in oocyte of mice results in premature ovarian failure phenotype [Adhikari et al., 2009]. Synergistically to mTOR-signaling pathway AKT/PTEN (protein kinase B/phosphatase and tensin homolog) regulates oocyte growth and follicular development by direct induction of S6K phosphorylation and also via mTORC1, increasing the effect of mTOR alone [Adhikari et al., 2010]. TSC mutation in granulosa cells of mice resulted in an increase of ovulations and offspring [Huang et al., 2013]. The importance of the mTOR signaling as trigger for primordial follicle activation and development just within the granulosa cells was recently reported [Zhang et al., 2014]. It was described that FSH induces mTOR-signaling cascade in rat granulosa cells resulting in a 2fold increase of S6K phosphorylation [Kayampilly and Menon, 2007]. Rapamycin (mTOR inhibitor) is able to inhibit granulosa cellular proliferation dose depending and decreases the level of S6K in concentrations higher than 1 nM in rat [Yu et al., 2012].

Stimulation of AKT and Hippo pathway was recently reported to be a therapeutic option in treatment of women suffering from premature ovarian failure or insufficiency (POF/I) [Suzuki et al., 2015]. POF/I is defined as hypergonadotropic amenorrhea for at least four month, accompanied by elevated FSH levels (> 25IU/ml) on two occasions > 4 weeks apart before the age of 40 [from: management of women with premature ovarian insufficiency guideline of the European Society of Human Reproduction and Embryology]. The intranuclear located Hippo pathway interferes with the AKT-mTOR-signaling pathway. By inhibition of Hippo pathway the expression of miRNA-29 increases targeting PTEN-RNA. mTORC gets activated by inhibition of PTEN [reviewed in Shimobayashi and Hall, 2014]. In rats stimulation and specific inhibition of AKT are described to induce, respectively reduce phosphorylation of S6K [Choi et al., 2014]. In contrast, others describe, that inhibition

of AKT in rat granulosa cells do not interfere in the FSH-stimulated activation of mTOR via TSC2 phosphorylation [Kayampilly and Menon, 2007].

This supports our aim to explore for the first time in human mTOR, AKT and S6K-expression profiles in granulosa cells under FSH-stimulation and specific inhibition of mTOR and AKT as interesting landmarks of follicular regulation and putative predictive for the reproductive potential.

It is well established on the literature that women carrying a CGG-base triplet premutation ($n > 54$) in the 5'-UTR (untranslated region) of exon 1 of the *FMR1*- (Fragile X Mental Retardation 1) gene are frequently suffering from POF/I [Sullivan et al., 2005]. This is also called FXPOI (Fragile X associated premature ovarian insufficiency (see also OMIM accession numbers: #300624 and #615723). In leukocytes of premutation carriers *FMR1* gene expression is overexpressed, while protein expression is inversely down regulated [Kenneson et al. 2001]. This is explained by the "gain of function model", a theory that explains pathologies in premutation carriers by a loss of function and toxicity of premutated mRNAs [Hagermann and Hagermann, 2004]. Other studies suggested that triplet numbers below or above 26-34 within the *FMR1* gene also affect ovarian reserve and fertility [Gleicher et al., 2012]. FMRP is mainly expressed in human granulosa cells [Schuettler et al., 2011] hypothesizing its important role for female fertility just in these cells of the female ovary. A mouse model carrying *FMR1* premutation showed recently a possible linkage between *FMR1* and mTOR-pathway [Lu et al., 2012]. These mice present fertility impairment and show reduced phosphorylation of AKT- and mTOR-protein.

In this study we aimed mainly to evaluate a putative functional mTOR-AKT-*FMR1*-link in human granulosa cells by using a cell culture model system and

investigating if FSH-stimulation and specific inhibition is able to influence it.

5. Materials and methods

Cell culture model

The COV434 cell line with immortalized granulosa cells derived from adult granulosa cell tumor with a nearly normal karyotype (46 XX +5) [van den Berg-Bakker et al., 1993] was used as model system for human mature granulosa cells. It fulfills important characterizations of fresh human granulosa cells [Zhang H. et al., 2000] like FSH depending 17β estradiol production, formation of intercellular connections and presentation of specific molecular markers including *FMR1*-expression. This cell line was chosen instead of primary culture because of its above named characterization and the bigger cell numbers needed for our experiments. Thereby, a putative bias produced by pooling primary granulosa cells of different women with different ovarian reserve parameters was avoided. The cells were cultivated using DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Biochrom GmbH, Germany) supplemented with 10% FBS (Heat Inactivated Fetal Bovine Serum, Gibco by life technologies, USA), 1% antibiotics-antimycotics (Anti-Anti 100x from Gibco by life technologies, USA), 1 mM L-Alanyl-L-Glutamine (Sigma, A4159) and 3 mM glutamine (L-Alanyl-glutamine, Gibco K 0302) with daily media change under specific conditions (5% CO₂ atmosphere in air in 100% relative humidity at 37°C) until confluence was reached in 250ml filter-flasks (from Greiner Bio-one, Germany). They were then split up, seeded in 24 multi-well plates (from Greiner Bio-one, Germany) with 2×10^3 cells per well (in order to perform cell count) or with 2×10^5 cell per flask (in order to perform RNA and protein isolation) and cultivated again with DMEM for 4 days prior to FSH-stimulation. The culture was carried out for two days, according to L. Ophir [Ophir L et al., 2014]. The experiments were repeated 3 times under the

same conditions. In case of inhibitor treatment experiment cells were seeded in 75cm² flask (Greiner Bio-one, Cat. No. 658175) with 1x10⁵ cells per flask with 30 mL of DMEM for 4 days prior to inhibitor treatment for three days. This experiment was performed in quadruples and repeated under the same condition.

FSH stimulation

FSH-supplement for 2 days was used to induce a preovulatory-like-stage of granulosa cells according the data of L. Ophir et al. [Ophir L et al., 2014] made in primary culture. RecFSH (Gonal f from Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was used in a 0.3 IU/ml concentration according to Suzuki and Kawamura [Suzuki et al., 2015 and Kawamura et al., 2013], after 4 days of cell culture without hormone stimulation. Control group was cultivated during these 2 days without hormone. After treatment RNA and protein were isolated and cell proliferation was checked by cell count.

Cell Count

In order to check cell proliferation, cell count was performed using trypan blue assay. Briefly, supernatant was removed and cells were exposed to 250 µL of trypsin and incubated for 5 minutes. After this time the enzyme was inactivated with 500 µL of medium and the liquid was centrifuged. Cells were resuspended in 100 µL of medium and counted in a hemocytometer chamber, using trypan blue.

Inhibitor treatment

In order to check direct influences of the mTOR/AKT signaling on *FMR1*-gene expression specific inhibitors of the different steps of above named pathway were used in cell culture. An amount of 10⁵ cells were cultivated for four days, with daily media change, and then cells were exposed for 3 days to different mTOR/AKT

inhibitors: control, 1 μ M Rapamycin (mTOR inhibitor) or 5 μ M MK – 2206 2HCl (AKT inhibitor). The concentration of the inhibitors were based on previous studies [Lin et al., 2014; Hahne et al., 2014] and on our pilot study, which was aimed to check the optimal concentration showing an inhibiting effect on proliferation (data not shown). After treatment RNA and protein were isolated.

RNA/ protein isolation, cDNA synthesis and protein measurement

RNA and protein were directly isolated from adherent cells in culture using TRIzol[®] Reagent (Life Technologies, Carlsbad, California 92008, USA) after DMEM removal and PBS washing [Chomczynski and Sacchi, 1987 and 1993]. The isolation of RNA and protein was carried out after the TRIzol[®] Reagent manual of Ambion[®] by life Technologies for adherent cells. RNA was dissolved in RNase-free water, concentration and purity were detected using NanoDrop 2000c UV-spectrometer (NanoDrop products, Wilmington, DE 19810, USA). Protein was dissolved in 1% SDS. The yield was determined using the Pierce[™] Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit from Thermo Fisher Scientific Inc. (Cat. Number: 23200) by life Technologies (Life Technologies, Carlsbad, California 92008, USA) according to Bradford [Bradford et al., 1976].

All cDNA samples were synthesized from total RNA samples after oligo dT priming with the SuperScript[®] III First-Strand Synthesis System from Invitrogen[®] (Cat. Number: 18080-051) by life Technologies (Life Technologies, Carlsbad, California 92008, USA) and the M-MLV Reverse Transcriptase RNase H Minus, Point Mutant of Promega[®] (Cat. Number: M 3683) (Promega Corporation, 2800 Woods Hollow Road, Madison, WI 53711-5399 USA).

Quantitative RT-PCR analyses

TaqMan predesigned gene expression assays for *FMR1*, *mTOR*, *S6K*, *AKT* (Hs00924544_m1; Hs00235408_m1; Hs00177357_m1; Hs00178289_m1) and the two endogenous control genes *HPRT* and *TBP* (Hs99999909_m1; Hs00427620_m1) as well as the TaqMan universal PCR master mix (Applied Biosystems, 4324018) were purchased from Applied Biosystems® by life Technologies (Life Technologies, Carlsbad, California 92008, USA) and used according to manufacturers' instructions. They were analyzed in triplicates and run under standard PCR conditions of Applied Biosystems by life Technologies (Life Technologies, Carlsbad, California 92008, USA) using an Applied Biosystem Fast forward 7500 real-time PCR-system. Relative quantitative expression analysis was analyzed using $\Delta\Delta$ Ct-method. Untreated COV 434 cDNA was used as calibrator in each run.

FMRP measurement

ELISA measurement was performed in duplicates in predesigned sandwich ELISA Kit for FMRP (Dunwoody Park, Suite 145, Atlanta, GA 30338, United States) in order to detect protein expression in dependence of different cellular treatment, according to manufacturer's protocol. To evaluate the results we used the CurveExpert® program.

Statistics

Data distribution was checked by Shapiro-Wilk-Test and evaluated using Mann-Whitney-U or paired t-test, according to data distribution. Results are presented as mean \pm standard error or median and interquartile range. Statistical analysis was carried out with SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences V. 22.0*) and statistical significance was set at $P \leq 0.05$.

6. Results

FSH-stimulation results

Cell count

FSH was able to stimulate proliferation of COV434 demonstrating a significant difference between untreated control and FSH-treated group (0.3 I.U. of FSH) ($P=0.011$), (Figure 1).

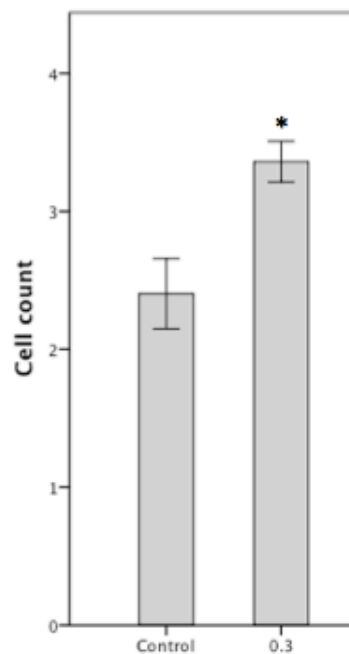


Figure 1 – Results of cell count ($\times 10^4$ cells = y-axis) among groups (x-axis= control-group versus stimulated group with 0.3 IU FSH).

* different from control group ($P=0.011$)

Gene- and Protein Expression

We analyzed the quantitative gene expression of *FMR1* and the key genes of the mTOR-AKT signaling pathway *S6K*, *AKT* and *mTOR* in dependence of a FSH-stimulation in human granulosa cell line.

FMR1 and *S6K* gene expression were significantly decreased ($P=0.031$ and $P=0.05$, respectively) when cells were treated with 0.3I.U. of recFSH, while *mTOR1* and *AKT1* gene expressions were increased ($P=0.05$ and $P=0.015$, respectively) after hormone exposure and proliferation (Figure 2).

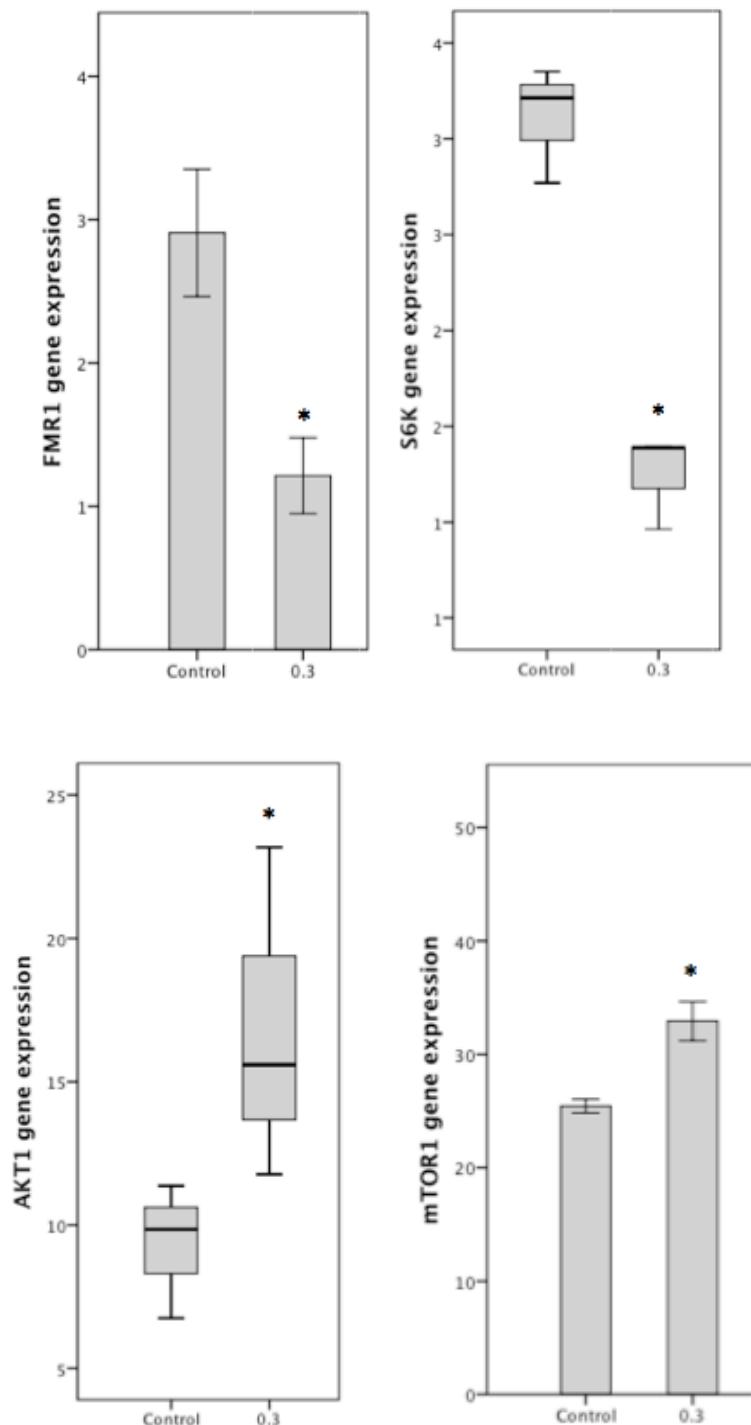


Figure 2 – y-axis = $\Delta\Delta$ Ct of gene expression (compared to calibrator expression of untreated COV434) of *FMR1* ($P=0.031$), *S6K* ($P=0.05$), *AKT* ($P=0.05$) and *mTOR*

($P=0.015$) among groups treated with 0.3 I.U. of FSH and control group (x-axis) in human granulosa cells.

* different from control group.

FMRP expression analysis by ELISA showed increased protein expression of FMRP under the stimulation of FSH in human granulosa cells, however not reaching statistic significance ($P = 0.115$).

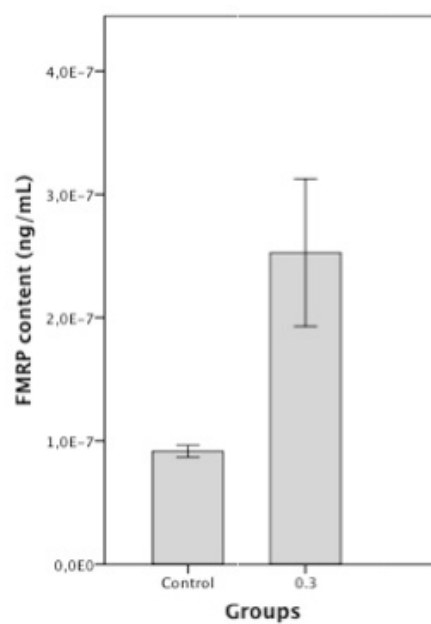


Figure 3 - FMRP expression among groups (x-axis) treated with 0.3 I.U of FSH ($P=0.115$)

These results indicate a possible regulation of the *FMR1*/FMRP expression via the mTOR/Akt signaling in relation to S6K, as shown in Figure 4.

Gene/Protein-expression modification under FSH stimulation

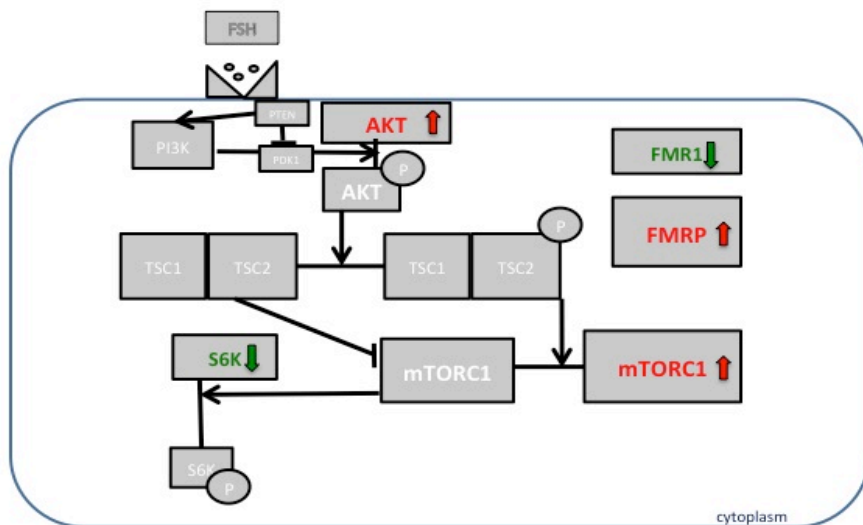


Figure 4 – Expression profile modulation of *FMR1/P* and the mTOR/AKT signalling pathway under FSH-stimulation

Inhibitor treatment results

Expression analysis after inhibiting the key steps of the mTOR/AKT signal-pathway assessed the influence of this inhibition on *FMR1/FMRP* expression.

Cell count

1 μ M Rapamycin and 5 μ M MK were able to inhibit proliferation of COV434 demonstrating a significant decrease in treated groups ($P=0.001$ for both), (Figure 5).

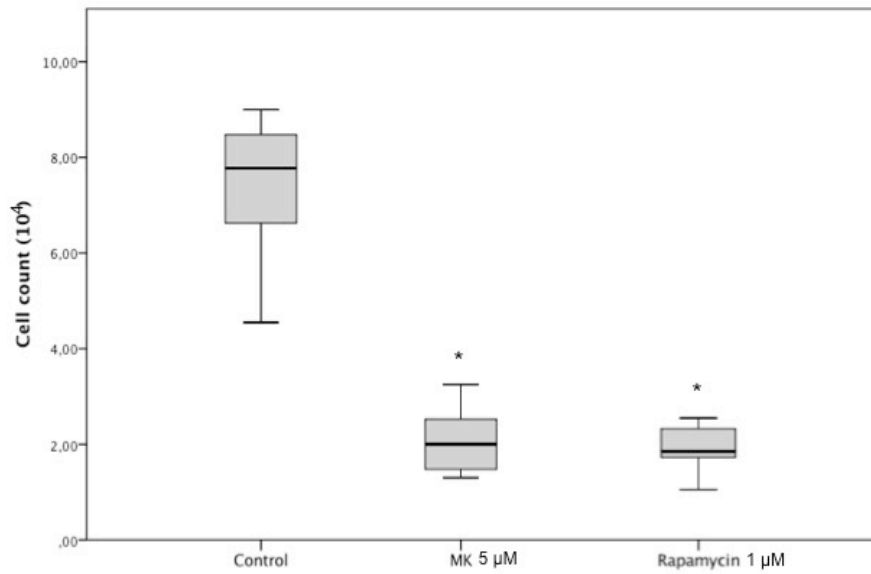


Figure 5 – Results of cell count ($\times 10^4$ cells = y-axis) among groups (x-axis= control-group versus MK- and Rapamycin-inhibited group).

* different from control group ($P=0.001$)

Gene- and Protein Expression

To confirm the inhibitor effect of MK and Rapamycin we evaluated the total RNA and protein amount after cell count, which both significantly decreased, (Figure 6).

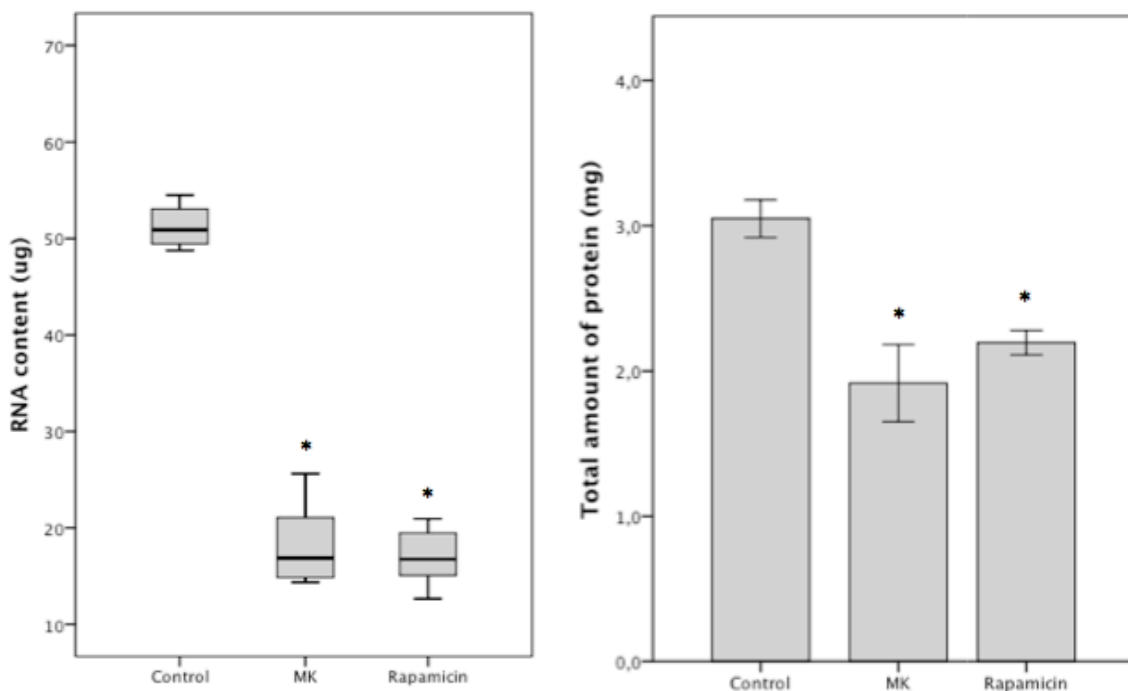


Figure 6 – Difference among control and groups (x-axis) treated with inhibitors MK and Rapamycin ($P < 0.05$).

* different from control group.

Specific inhibition of mTORC1 with 1 μ M Rapamycin and AKT with 5 μ M MK led both to a significant increase of *FMR1* and *S6K* gene expression ($P=0.003$ and $P=0.001$ for *FMR1* and $P=0.003$ and $P=0.016$ for *S6K*) (Figure 7).

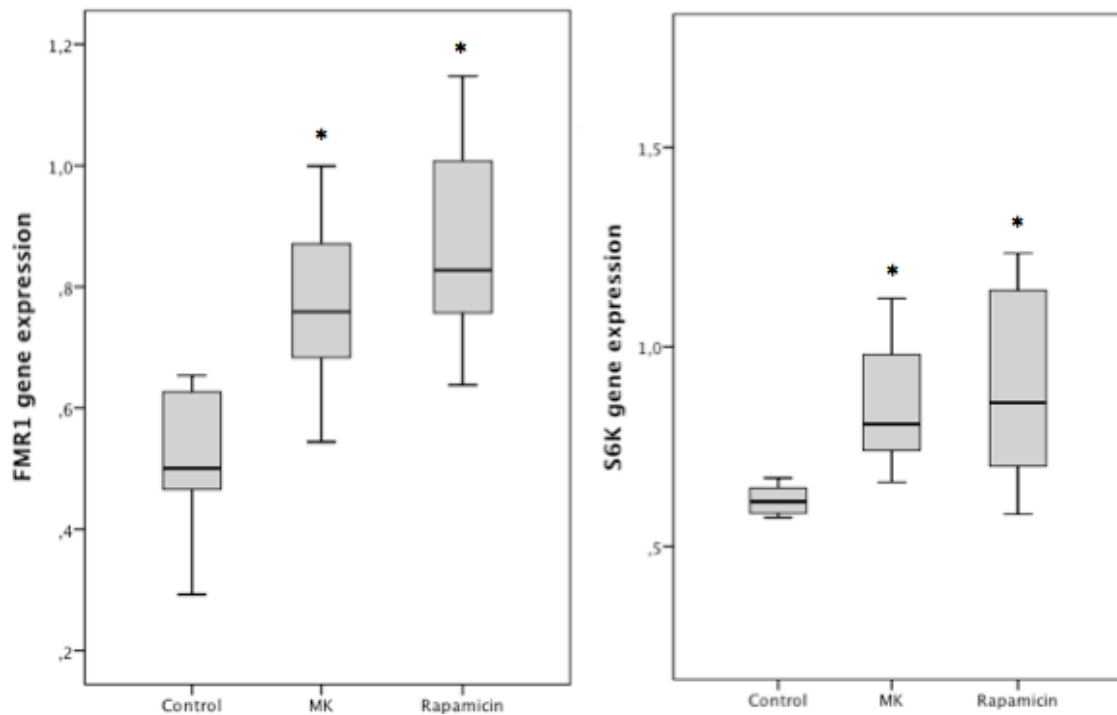


Figure 7 – y-axis = $\Delta\Delta$ Ct of gene expression of *FMR1* ($P=0.003$ and $P=0.001$), *S6K* ($P=0.003$ and $P=0.016$) among groups treated with MK and Rapamycin, respectively.
* different from control group.

This effect was also seen on protein level where treatment with Rapamycin significantly increased FMRP content, Figure 8.

FMRP in the MK group was under the detectable level and could therefore not be evaluated

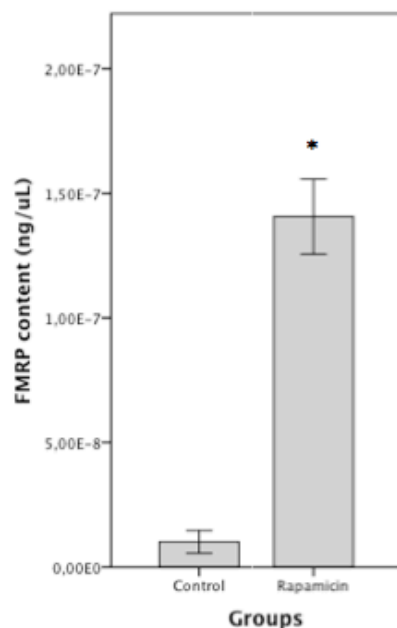


Figure 8 – FMRP expression among groups treated with and without mTOR inhibitor-Rapamycin ($P < 0.05$).

Gene expression of *AKT* and *mTOR* did not change after inhibitor treatment with MK and Rapamycin, respectively (Figure 9).

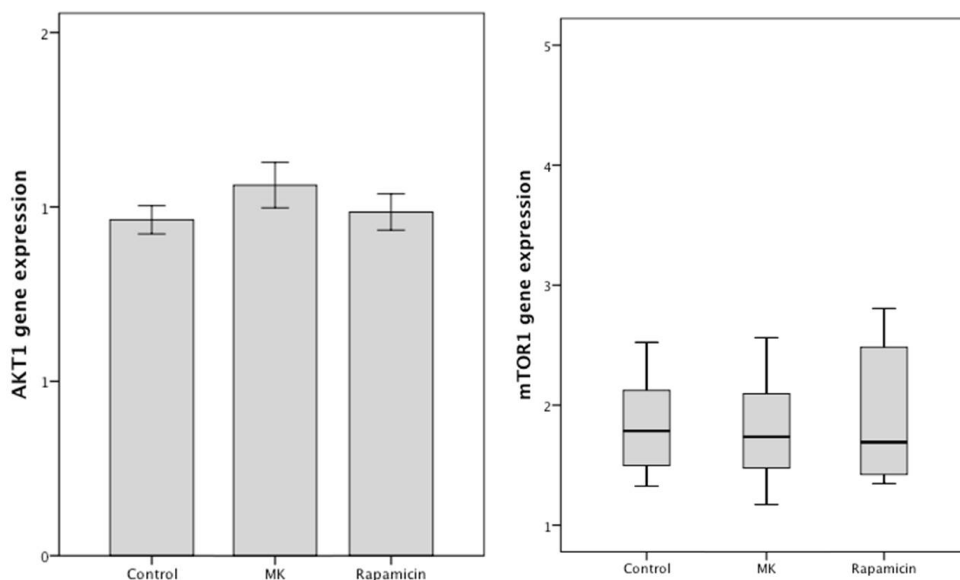


Figure 9 – y-axis = $\Delta\Delta$ Ct of gene expression of *AKT* and *mTOR* among groups treated with MK and Rapamycin, respectively.

7. Discussion

mTOR and FMRP are mainly expressed in granulosa cells in the ovary [Zhang et al., 2014; Schuettler et al., 2011]. During folliculogenesis granulosa cells continuously proliferate forming a functional entity together with the oocyte. This and the fact that granulosa cells are quite simple available in comparison to human oocytes, where ethical limitations do exist, were our main reasons to design our study in granulosa cells. The decision of using COV434 instead of primary culture was based on its characterization like FSH sensibility, formation of intercellular connections [Zhang H. et al. 2000] and *FMR1*-expression. Also the bigger cell numbers needed for our experiments and prevention of putative bias, produced by pooling primary granulosa cells of women with different fertility reserve parameters, were crucial factors.

As expected, FSH showed a significant stimulating effect on cell proliferation of COV434 in our experiments, what beyond supports the quality of our human granulosa cell model.

In general mTORC1 is thought to be a stimulator of translation by inducing phosphorylation of S6K. In our study *mTOR*-expression increased significantly after FSH-stimulation as expected under cellular proliferation. Interestingly, its downstream signal *S6K* and the ovarian reserve marker gene *FMR1* got decreased under the same treatment. This result is contradictive to results made in rodent granulosa cells, where FSH supplementation causes a 2fold increase of S6K-phosphorylation [Kayampilly and Menon, 2007]. But it corresponds to results after DHEA stimulation in rats. DHEA-stimulation, in order to mimic PCOS, there, caused granulosa cell proliferation, increased mTOR protein-levels and surprisingly decreased S6K protein levels. Authors explained this effect by a decrease in FSH in PCOS-subtypes [Yaba and Demir, 2012]. In our opinion the mechanism leading to a

decrease of S6K under proliferation might differ. Interestingly *FMR1* behaves similar to *S6K* under stimulation suggesting a possible linkage between these two components. So intensive stimulation might cause a loss of function of this regulation via an unknown mechanism maybe associated with FMRP functions. FMRP controls translation of other mRNAs by interacting with pre-messenger ribonucleoprotein (pre-mRNP) complexes escorting them into cytoplasm. It includes 3 RNA-binding domains – 2 KH-domains and 1 RGG-box. Phosphorylated FMRP binds specific RNA-structures (like G-quadruplex RNA) and regulates translation by forming a RISC (RNA-induced silencing complex). mRNA /messenger RiboNucleoProteins (mRNP) complexes like RISC process, transport and translational regulate RNA tissue specific [reviewed in Melko and Bardoni, 2010].

After the treatment with 1 μ M Rapamycin or 5 μ M MK COV434 shows a significant decrease of proliferation in our study. Studies on rat granulosa cells showed that only concentrations from 1nM Rapamycin were able to reduce cellular proliferation and level of S6K. Lower concentrations in picomolar range lead to acceleration [Yu et al., 2012]. Granulosa cells showed a significant decrease of RNA and protein content after treatment with both inhibitors, too. This is in accordance to the effect seen on other protein coding RNAs after mTOR-inhibition [Thoreen CC et al., 2012]. Gene expression of *AKT* and *mTOR* did not change after inhibition, what is likely because of the fact that these inhibitors act on protein not RNA-level. Surprisingly in our study *S6K* and *FMR1* got upregulated significantly during a significant cellular decrease. However, it fits to our results after proliferation induction with recFSH where *FMR1* and *S6K* decreased despite an increase of *AKT* and *mTOR*-expression.

To our knowledge this is the first study using a human granulosa cell model system investigating AKT-mTOR signaling pathways after induction and inhibition of

proliferation. Our results are controversial to the results made in animal models, but regulation of follicular and granulosa cellular maturation differ in human compared to rodents and therefore need to be evaluated in human separately before drawing conclusion.

Interestingly, *FMR1* behaves similar to *S6K* under induction and also inhibition hypothesizing a putative coupled regulation in human granulosa cells.

In neurons such a linkage between *S6K* and *FMRP* is already described in rodents [Narayanan et al., 2008]. There, *S6K* acts as major kinase of *FMRP* phosphorylation. Phosphorylated *FMRP* is depending on *mTOR* activity inputs for interaction with potentially stalled ribosomes, inhibiting further translation of interacting mRNAs.

To our knowledge in gonadal tissue this coupling isn't investigated yet in animals and human. Here, we remark first hints describing a putative linked regulation of *FMR1* and the *mTOR*-pathway in human gonadal tissue with a possible impact on ovarian reserve regulation. Thereby, our data support prior results made in a mouse-model carrying *FMR1*-premutation postulating a linkage of *mTOR* and *FMR1* and also supports the results in human received by *AKT*-activator-treatment in *POI/POF*-women of other research groups [Lu et al., 2012; Suzuki et al., 2015].

So our results provide novel insights in human granulosa cell regulation system. Especially, they show for the first time a putative functional link of *AKT*-*mTOR*-signaling pathways via *S6K* to the marker of ovarian reserve *FMR1/FMRP* during human granulosa cell proliferation.

On protein level the results concerning *FMRP* were contradictive. Both, proliferation under *FSH* stimulation and inhibition with Rapamycin, result in an increase of *FMRP*, independently from the diverse results of mRNA-expression under these different treatments. Underlying explanation might be a decoupling of the

formerly described inverse coupled RNA-protein-expression by the usage of inhibitors by unknown mechanisms.

The specified results of our study are mainly based on RNA-expression analysis and are therefore only first hints concerning a putative link between regulation of *FMR1*/FMRP and mTOR-/AKT signaling pathways. Further studies including protein and phosphorylation analysis on COV434 and fresh granulosa cells of women divided in different ovarian reserve parameter groups are needed to substantiate these results.

8. Reference list

- Zeleznik AJ. The physiology of follicle selection. *Reprod Biol Endocrinol*. 2004 Jun 16;2:31.
- El-Hayek S, Clarke HJ. Follicle-Stimulating Hormone Increases Gap Junctional Communication Between Somatic and Germ-Line Follicular Compartments During Murine Oogenesis. *Biol Reprod*. 2015 Aug;93(2):47.
- Hsueh AJ, Kawamura K, Cheng Y, Fauser BC. [Intraovarian control of early folliculogenesis](#). *Endocr Rev*. 2015 Feb;36(1):1-24.
- Lefebvre J, Antaki R, Kadoch IJ, Dean NL, Sylvestre C, Bissonnette F, Benoit J, Ménard S, Lapensée L. 450 IU versus 600 IU gonadotropin for controlled ovarian stimulation in poor responders: a randomized controlled trial. *Fertil Steril*. 2015 Sep 8.
- Gorre N, Adhikari D, Lindkvist R, Brännström M, Liu K, Shen Y. mTORC1 Signaling in oocytes is dispensable for the survival of primordial follicles and for female fertility. *PLoS One*. 2014 Oct 22;9(10):e110491.
- Adhikari D & Liu K . mTOR signaling in the control of activation of primordial follicles, *Cell Cycle* 2010, 9:9, 1673-1674
- Sobinoff AP, Sutherland JM, and Mclaughlin EA. Intracellular signalling during female gametogenesis. *Molecular Human Reproduction*, Vol.19, No.5 pp. 265–278, 2013
- Adhikari D, Flohr G, Gorre N, Shen Y, Yang H, Lundin E, Lan Z, Gambello MJ, Liu K. Disruption of Tsc2 in oocytes leads to overactivation of the entire pool of primordial follicles. *Mol Hum Reprod*. 2009 Dec;15(12):765-70.
- Adhikari D, Zheng W, Shen Y, Gorre N, Hämäläinen T, Cooney AJ, Huhtaniemi I, Lan ZJ, Liu K. Tsc/mTORC1 signaling in oocytes governs the quiescence and activation of primordial follicles. *Hum Mol Genet*. 2010 Feb 1;19(3):397-410.
- Adhikari D, Zheng W, Shen Y, Gorre N, Hämäläinen T, Cooney AJ, Huhtaniemi I, Lan ZJ, Liu K. Tsc/mTORC1 signaling in oocytes governs the quiescence and activation of primordial follicles. *Hum Mol Genet*. 2010 Feb 1;19(3):397-410.

- Huang L, Wang ZB, Jiang ZZ, Hu MW, Lin F, Zhang QH, Luo YB, Hou Y, Zhao Y, Fan HY, Schatten H, Sun QY. Specific disruption of Tsc1 in ovarian granulosa cells promotes ovulation and causes progressive accumulation of corpora lutea. *PLoS One*. 2013;8(1):e54052.
- Zhang H, Risal S, Gorre N, Busayavalasa K, Li X, Shen Y, Bosbach B, Brännström M, Liu K. Somatic cells initiate primordial follicle activation and govern the development of dormant oocytes in mice. *Curr Biol*. 2014 Nov 3;24(21):2501-8.
- Kayampilly PP, Menon KM. Follicle-stimulating hormone increases tuberin phosphorylation and mammalian target of rapamycin signaling through an extracellular signal-regulated kinase-dependent pathway in rat granulosa cells. *Endocrinology*. 2007 Aug;148(8):3950-7
- Yu J, Thomson TC, Johnson J. Cross talk between estradiol and mTOR kinase in the regulation of ovarian granulosa proliferation. *Reprod Sci*. 2012 Feb;19(2):143-51.
- Suzuki N, Yoshioka N, Takae S, Sugishita Y, Tamura M, Hashimoto S, Morimoto Y, Kawamura K. Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrification in patients with primary ovarian insufficiency. *Hum Reprod*. 2015 Mar; 30(3):608-15.
- Shimobayashi M, Hall MN. Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014 Mar;15(3):155-62. doi: 10.1038/nrm3757. Review.
- Choi J, Jo M, Lee E, Choi D. AKT is involved in granulosa cell autophagy regulation via mTOR signaling during rat follicular development and atresia. *Reproduction*. 2013 Nov 20;147(1):73-80.
- Sullivan AK, Marcus M, Epstein MP, Allen EG, Anido AE, Paquin JJ, Yadav-Shah M, Sherman SL. Association of FMR1 repeat size with ovarian dysfunction. *Hum Reprod*. 2005 Feb;20(2):402-12.
- Kenneson A, Zhang F, Hagedorn CH, Warren ST. Reduced FMRP and increased FMR1 transcription is proportionally associated with CGG repeat number in intermediate-length and premutation carriers. *Hum Mol Genet*. 2001 Jul 1;10(14):1449-54.
- Hagerman PJ1, Hagerman RJ. The fragile-X premutation: a maturing perspective. *Am J Hum Genet*. 2004 May;74(5):805-16.
- Gleicher N, Weghofer A, Kim A, Barad DH. Comparison of ovarian FMR1 genotypes and sub-genotypes in oocyte donors and infertile women. *J Assist Reprod Genet* (2012) 29:529–532.
- Lu C, Lin L, Tan H, Wu H, Sherman SL, Gao F, Jin P, Chen D. Fragile X premutation RNA is sufficient to cause primary ovarian insufficiency in mice. *Hum Mol Genet*. 2012 Dec 1;21(23):5039-47. Lu C, Lin L, Tan H, Wu H, Sherman SL, Gao F, Jin P, Chen D. Fragile X premutation RNA is sufficient to cause primary ovarian insufficiency in mice. *Hum Mol Genet*. 2012 Dec 1;21(23):5039-47.
- Schuettler J, Peng Z, Zimmer J, Sinn P, von Hagens C, Strowitzki T, Vogt PH.. Variable expression of the Fragile X Mental Retardation 1 (FMR1) gene in patients with premature ovarian failure syndrome is not dependent on number of (CGG)_n triplets in exon 1. *Hum Reprod*. 2011 May;26(5):1241-51.
- Zhang H, Vollmer M, De Geyter M, Litzistorf Y, Ladewig A, Dürrenberger M, Guggenheim R, Miny P, Holzgreve W, De Geyter C. Characterization of an immortalized human granulosa cell line (COV434). *Mol. Hum. Reprod*. 2000;6:146-153.
- van den Berg-Bakker CAM, Hegemeijer A, Franken-Meijer A, Franken-Postma

- EM, Smit VTHBM, Kuppen PJK, Ravenswaay-Claasen HH, Cornelisse CJ, Schrier PI. Establishment and characterization of 7 ovarian carcinoma cell lines and one granulosa tumor cell line: Growth features and cytogenetics. *Int. J. Cancer* 1993;53:613-620.
- Ophir L, Yung Y, Maman E, Rubinstein N, Yerushalmi GM, Haas J, Barzilay E, Hourvitz A. Establishment and validation of a model for non-luteinized human mural granulosa cell culture. *Mol Cell Endocrinol.* 2014 Mar 25;384(1-2):165-74. doi: 10.1016/j.mce.2014.01.018. Epub 2014 Feb 5.
 - Suzuki N, Yoshioka N, Takae S, Sugishita Y, Tamura M, Hashimoto S, Morimoto Y and Kawamura K. Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrification in patients with primary ovarian insufficiency. *Human Reproduction*, Vol.30, No.3 pp. 608–615, 2015
 - Kawamura K, Cheng Y, Suzuki N, Deguchi M, Sato Y, Takae S, Ho CH, Kawamura N, Tamura M, Hashimoto S et al. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:17474–17479.
 - Chomczynski, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques* 15, 532-537, 1993
 - Chomczynski, P. and Sacchi, N. Single Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159, 1987
 - Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* Bd. 72, S. 248-254.
 - Lin HY, Chang KT, Hung CC, Kuo CH, Hwang SJ, Chen HC, Hung CH, Lin SF. Effects of the mTOR inhibitor rapamycin on monocyte-secreted chemokines. *BMC Immunol.* 2014 Sep 26;15:37.
 - Hahne JC, Kurz A, Meyer SR, Dietl J, Engel JB, Honig A. Anti-tumour activity of phosphoinositide-3-kinase antagonist AEZS-126 in models of ovarian cancer. *Arch Gynecol Obstet.* 2015 Jan;291(1):131-41.
 - Yaba A, Demir N.. The mechanism of mTOR (mammalian target of rapamycin) in a mouse model of polycystic ovary syndrome (PCOS). *J Ovarian Res.* 2012 Nov 27;5(1):38. doi: 10.1186/1757-2215-5-38.
 - Melko M, Bardoni B. The role of G-quadruplex in RNA metabolism: involvement of FMRP and FMR2P. *Biochimie.* 2010 Aug;92(8):919-26.
 - Thoreen CC, Chantranupong L, Keys HR, Wang T, Gray NS, Sabatini DM.. A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature.* 2012 May 2;485(7396):109-13. doi: 10.1038/nature11083.
 - Narayanan U, Nalavadi V, Nakamoto M, Thomas G, Ceman S, Bassell GJ, Warren ST. S6K1 phosphorylates and regulates fragile X mental retardation protein (FMRP) with the neuronal protein synthesis-dependent mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling cascade. *J Biol Chem.* 2008 Jul 4;283(27):18478-82.

8. Discussão Conclusiva

Os resultados presentes nessa Tese permitem a ampliação do conhecimento científico em duas áreas da fisiologia da reprodução:

- Com relação às técnicas de seleção de oócitos imaturos destinados à maturação *in vitro*, conseguimos demonstrar a segurança de aplicação do BCB na espécie humana, através da utilização de modelo experimental (cultura primária de células foliculares ovarianas luteinizadas). Ressaltamos a necessidade de aplicação de correto protocolo de coloração (BCB 13 μ M diluído em DPBS modificado por 60 minutos), uma vez que diferentes autores utilizam distintos protocolos de exposição dos oócitos ao BCB. A padronização do correto protocolo de coloração com BCB é imprescindível para que possamos, no futuro, comparar de forma mais adequada os resultados obtidos por diferentes autores/grupos de pesquisa e, principalmente, para que esse método de seleção de oócitos possa ter aplicação clínica para a espécie humana e seja considerado como possível técnica de reprodução assistida a ser oferecida para as pacientes. É apenas com o aprimoramento e com o desenvolvimento de novas tecnologias que conseguimos ofertar para as nossas pacientes mais terapias de tratamento e, dessa forma, aumentar as suas chances de obtenção de gestação.

Através da observação dos nossos resultados similares entre o grupo de células controle e o grupo de células tratadas com BCB em todos os testes de viabilidade, de citotoxicidade e de vitalidade celular aplicados (além dos resultados similares entre os grupos nas avaliações de expressão gênica e de expressão proteica e demais ensaios realizados), concluímos que o BCB é seguro para aplicação na espécie humana, assim como demonstrado por vários autores para espécies animais. Essa conclusão é de extrema importância, pois instiga a comunidade científica a avaliar a eficácia do método de seleção oocitária baseado na coloração com o BCB, estimulando futuros estudos com essa molécula. De forma similar, a aplicação do BCB em espécies animais iniciou de forma bastante cautelosa, pois os pesquisadores não tinham informações suficientes sobre a segurança de seu uso. Atualmente, no entanto, muitos autores já utilizam, em espécies animais, o método de seleção de gametas competentes com o BCB como rotina em seus experimentos, a fim de aumentar a taxa de sucesso das técnicas de reprodução assistida; acreditamos que sejam necessários estudos para demonstrar o mesmo benefício para a espécie humana. No entanto, infelizmente, até o presente momento, não temos descrição na literatura do uso do BCB na espécie humana, pois a comunidade científica preocupa-se com a qualidade dos embriões e das crianças geradas a partir de oócitos expostos ao BCB. Nossos resultados, contudo, amenizam essa insegurança e instigam futuros estudos desse corante em nossa espécie.

As técnicas de seleção de gametas competentes devem apresentar principalmente, de forma ideal, duas características: segurança e eficácia no seu método. A partir dos nossos resultados conseguimos

demonstrar a segurança dessa molécula para a espécie humana e, agora, torna-se importante demonstrar se esse método de seleção será eficaz na triagem de gametas competentes para a técnica de MIV. A correta distinção dos gametas em dois grupos (competentes e não competentes para a MIV) possibilitaria aumentar a taxa de sucesso no tratamento de infertilidade quando a MIV é aplicada, que ainda é, infelizmente, considerada relativamente baixa, quando comparada com a taxa de sucesso de outras técnicas convencionais de reprodução assistida. A obtenção de benefício ao aplicarmos o BCB seria possível, pois, dessa forma, os gametas classificados como BCB positivos (oócitos competentes) poderiam ser diretamente encaminhados para MIV, enquanto que gametas classificados como BCB negativos (que não sofreram o processo de capacitação) deveriam ser encaminhados para outras técnicas que permitissem a esses oócitos adquirir competência para maturar. Cabe salientar que tais técnicas já estão sendo desenvolvidas e aprimoradas por alguns pesquisadores que utilizam modelos animais para estudos de reprodução assistida, demonstrando o interesse da comunidade científica em utilizar o BCB como método de seleção.

Adicionalmente, a partir dos nossos experimentos, conseguimos caracterizar e padronizar o cultivo primário de células foliculares ovarianas luteinizadas. Esse modelo experimental é amplamente utilizado em estudos que visam elucidar mecanismos da fisiologia do trato reprodutor feminino, sendo imprescindível a sua padronização. Dessa forma, antes mesmo de avaliarmos o efeito do BCB sobre esse modelo celular, foi essencial a padronização e a caracterização desses tipos celulares (GCs e CCs)

e das suas condições ideais de cultivo, a fim de obtermos conhecimento desse modelo experimental.

Apesar de as células da granulosa e de as células do *cumulus oophorus* apresentarem mesma origem celular, conseguimos ressaltar algumas de suas diferenças quando cultivadas em ambiente artificial (como sua morfologia e sua viabilidade celular) - diferenças essas que são salientadas por alguns autores apenas com relação à localização dessas células dentro do folículo ovariano. Essa observação torna-se importante, principalmente, pois muitos autores apenas descrevem em seus estudos a utilização de células foliculares ovarianas (de forma generalizada), sem identificar qual foi o exato modelo experimental utilizado. Ressaltamos que, assim como há diferenças entre esses dois tipos celulares, a escolha de qual modelo experimental a ser aplicado deve ser baseada de acordo com o objetivo principal do estudo. Adicionalmente, conseguimos demonstrar que o estado luteinizado permanece característico nas células quando cultivadas em ambiente artificial, corroborando o descrito na literatura de que, após exposição ao LH (ou a seus análogos) as células apresentam características diferenciadas.

- Com relação ao processo de foliculogênese, sabemos que é apenas com o conhecimento minucioso do maquinário molecular desse processo é que conseguiremos nortear terapias adequadas para os fatores de infertilidade ligados à ele. A partir de nossos resultados, concluímos que a via de controle do *FMR1* (elemento já bastante descrito e relacionado com o controle da diferenciação celular) em células ovarianas de humanos, é similar à via de

controle descrita para neurônios. Essa observação é extremamente importante a fim de traçarmos novas metas terapêuticas (e alvos terapêuticos) para pacientes com Falência/Insuficiência Ovariana Precoce. Os resultados referentes ao controle da FMRP no ovário obtidos nessa Tese são baseados principalmente na avaliação da expressão gênica dos elementos envolvidos na via de proliferação mTOR1-/AKT1/S6K1 e como essa via está interligada ao controle da FMRP. Essa observação já havia sido realizada em ovários de roedores, onde demonstrou-se que animais *knockout* para o gene *FMR1* apresentam características de animais com diminuição da reserva ovariana e alterações nessa via de proliferação. Em contrapartida, animais *knockout* para elementos dessa via também apresentam características de animais com diminuição da reserva ovariana. Nossos resultados corroboram a literatura, atuando como primeiro passo da medicina translacional, iniciando os estudos não mais em modelos animais, mas sim em humanos. Por conseguinte, nossos resultados sugerem a relação entre a via de proliferação celular mTOR1-/AKT1/S6K1 com a via de controle da FMRP.

9. Perspectivas

Os resultados obtidos nessa Tese conseguiram responder várias perguntas que ainda não estavam claras para a sociedade científica; por outro lado, permitiu a criação de novos questionamentos que poderão ser respondidos no futuro, através de novas pesquisas.

No que diz respeito aos experimentos envolvendo a utilização do BCB, apesar de termos demonstrado a sua segurança, ainda permanece questionável se a aplicação desse corante trará benefícios quando utilizado como método de seleção de oócitos humanos destinados à MIV. Dessa forma, temos como perspectiva a aplicação do BCB na espécie humana (utilizando o protocolo descrito nessa Tese como seguro), a fim de avaliar se a sua aplicação proporcionará aumento nas taxas de maturação nuclear e citoplasmática e, em um segundo momento, se conseguirá elevar as taxas de fertilização e de formação de blastocistos. Os resultados dessa Tese permitem instigar novos estudos que visam avaliar os benefícios do BCB, uma vez que a segurança do corante foi amplamente observada através de modelo experimental.

Cabe salientar que o nosso grupo de pesquisa já avaliou a utilização do BCB na espécie humana. Entretanto, utilizamos outro protocolo de coloração, o qual demonstramos agora não ser adequado para as células foliculares, de acordo com resultados dessa Tese. Além disso, o número de oócitos corados com o BCB foi pequeno e a coleta dos gametas foi feita de pacientes que estavam realizando cesárea, fato que altera bastante o perfil hormonal. Por isso, acreditamos ser necessário futuros

experimentos que consigam quantidade suficiente de oócitos humanos que possam ser destinados à coloração com BCB para avaliar o seu real benefício. É preciso salientar que tais experimentos encontram como maior obstáculo as questões éticas, que são bastante rigorosas em nosso País. Consideramos possível, em um primeiro momento, a captação de gametas imaturos de pacientes que realizam tratamento de infertilidade para avaliar a taxa de maturação nuclear e citoplasmática de oócitos expostos ao BCB. Em um segundo momento, uma vez demonstrado benefício da técnica, poderia ser realizada a fertilização desses gametas (uma vez que a paciente aceite doá-los para pesquisa), a fim de avaliar as taxas de fertilização e de formação de blastocisto. Acreditamos que avaliações embrionárias de gametas expostos ao BCB só poderão ser realizadas, em um primeiro momento com caráter experimental, com oócitos de pacientes que estão realizando tratamento de infertilidade. Dessa forma, temos como perspectiva a captação de oócitos de pacientes que estão realizando tratamento de infertilidade, a fim de elucidar os benefícios de aplicação do BCB.

No que diz respeito aos experimentos envolvendo a relação do *FMR1* com a foliculogênese, nossos resultados foram bastante importantes para o entendimento do controle do *FMR1*, a nível de expressão gênica. No entanto, ainda não está completamente esclarecido qual é a rota direta de controle desse elemento. Acreditamos ser necessário estudo mais detalhado da expressão proteica dos elementos controladores do *FMR1*, visto que nosso trabalho foi minucioso com relação à expressão gênica. Adicionalmente, acreditamos ser necessário a comprovação da efetividade dos inibidores da proliferação (MK e rapamicina) não apenas através da avaliação de diminuição da proliferação celular, mas, principalmente, através da avaliação da diminuição da expressão proteica dos elementos inibidos. Essa informação poderá

fortalecer os resultados de expressão gênica e confirmar com maior precisão a via de controle da FMRP.

Além disso, temos como perspectiva a transposição dos nossos experimentos para outro modelo experimental; nessa Tese utilizamos como modelo experimental a linhagem celular COV 434, mas seria interessante a repetição dos experimentos, para comprovação dos resultados, utilizando cultivo primário de células foliculares coletadas de ciclos de RA.

10. Referências Bibliográficas

ABAZARI-KIA, A. et al. Intracellular glutathione content, developmental competence and expression of apoptosis-related genes associated with G6PDH-activity in goat oocyte. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 31, p. 313-321, 2014.

ADONA, P. et al. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I: Effects on meiosis progression, cytoskeleton, organelle distribution and embryo development. *Animal Reproduction Science*, v. 108, n. 1-2, p. 49-65, 2008.

AGDI, M. et al. Effects of ovarian puncture for in vitro maturation on subsequent in vitro fertilization cycle in women with polycystic ovaries. *Fertility and Sterility*, v. 94, n. 1, p. 381-383, 2010.

ALCOBA, D. D. et al. Selection of *Rattus norvegicus* oocytes for in vitro maturation by brilliant cresyl blue staining. *Zygote*, v.21, n. 3, p. 238-245, 2013.

ALCOBA, D. D. et al. Safety of brilliant cresyl blue staining protocols on human granulosa and cumulus cells. *Zygote*, v.24, n. 1, p. 83-88, 2016.

AL-EDANI, T. et al. Female aging alters expression of human cumulus cells genes that are essential for oocyte quality. *BioMed Research International*, v. 2014, p. 1-10, 2014.

ALM, H. et al. Bovine blastocyst development rate in vitro is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Theriogenology*, v. 63, n. 8, p. 2194-2205, 2005.

ALVAREZ, G. et al. Modulation of glycolysis and the pentose phosphate pathway influences porcine oocyte in vitro maturation. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 48, n. 4, p. 545-553, 2012.

ANDERSEN, C.; JENSEN, J.; ORNTOFT, T. Normalization of Real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer research*, v. 64, p. 5245-5250, 2004.

ASHRY, M. et al. Expression of TGF β superfamily components and other markers of oocyte quality in oocytes selected by brilliant cresyl blue staining: Relevance to early embryonic development. *Molecular Reproduction and Development*, v. 82, n. 3, p. 251-264, 2015.

AZARI-DOLATABAD N. et al. Effects of cilostamide and/or forskolin on the meiotic resumption and development competence of growing ovine oocytes selected by brilliant cresyl blue staining. *Theriogenology*, article in press, p. 1-8, 2016.

BAGNI, C.; GREENOUGH, W. From mRNP trafficking to spine dysmorphogenesis: the roots of fragile X syndrome. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 6, n. 5, p. 376-387, 2005.

BEN-AMI, I. et al. In vitro maturation of human germinal vesicle-stage oocytes: role of epidermal growth factor-like growth factors in the culture medium. *Human Reproduction*, v. 26, n. 1, p. 76-81, 2011.

BERNAS, T.; DOBRUCKI, J. Mitochondrial and non-mitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry*, v. 47, n. 4, p. 236-242, 2002.

BHOJWANI, S. et al. Selection of developmentally competent oocytes through brilliant cresyl blue stain enhances blastocyst development rate after bovine nuclear transfer. *Theriogenology*, v. 67, n. 2, p. 341-345, 2007.

BOLS, J. et al. High throughput non-invasive oocyte quality assessment: the search continues. *Animal Reproduction*, v. 9, p. 420-425, 2012.

BROWN, V et al. Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome. *Cell*, v. 107, p. 477-487, 2001.

BUSQUETS-GARCIA, A.; MALDONADO, R.; OZAITA, A. New insights into the molecular pathophysiology of fragile X syndrome and therapeutic perspectives from the animal model. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 53, p. 121-126, 2014.

BUSTIN, S. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*, v. 29, p. 23-39, 2002.

BUSTIN, S.; NOLAN, T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Journal of Biomolecular Techniques*, v. 15, p. 155-166, 2004.

BUSTIN, S. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.

CASTANEDA, C. A. et al. Lipid content, active mitochondria and brilliant cresyl blue staining in bovine oocytes. *Theriogenology*, v. 79, n. 3, p. 417-22, 2013.

CATALÁ, M. T. et al. Brilliant Cresyl Blue stain selects largest oocytes with highest mitochondrial activity, maturation-promoting factor activity and embryo developmental competence in prepubertal sheep. *Reproduction*, v. 142, n. 4, p. 517-27, 2011.

CATALÁ, M. G. et al. Effect of oocyte quality on blastocyst development after in vitro fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in a sheep model. *Fertility and Sterility*, v. 97, n. 4, p. 1004-8, 2012.

CHA, K. Y.; CHIAN, R. C. Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use. *Human Reproduction Update*, v. 4, n. 2, p. 103-20, 1998.

CHIAN, R. C.; BUCKETT, W. M.; TAN, S. L. In-vitro maturation of human oocytes. *Reproductive Biomedicine Online*, v. 8, n. 2, p. 148-66, 2004.

CHIAN, R. C.; LIM, J. H.; TAN, S. L. State of the art in in-vitro oocyte maturation. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, v. 16, n. 3, p. 211-219, 2004.

COY, P. et al. Birth of piglets after transferring of in vitro-produced embryos pre-matured with R- roscovitine. *Reproduction*, v. 129, n. 6, p. 747-55, 2005.

DE JONG, H. et al. Evidence based selection of housekeeping genes. *PLoS ONE*, v. 9, p. e898, 2007.

DEKEL, N. Molecular control of meiosis. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, v. 6, n. 5, p. 165-169, 1995.

DHEDA, K. et al. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *BioTechniques*, v. 37, n. 1, 2004.

DUMESIC, D. et al. Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. *Fertility and Sterility*, v. 103, n. 2, p. 303-316, 2015.

DZIK, A. et al. Tratado de Reprodução Assistida. Editora: Segmento Farma Editores Ltda., São Paulo, 2010.

EDIRISINGHE, W. et al. Birth from cryopreserved embryos following in-vitro maturation of oocytes and intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction*, v. 12, n. 5, p. 1056-1058, 1997.

EGERSZEKI, I. et al. Meiotic progression, mitochondrial features and fertilization characteristics of porcine oocytes with different G6PDH activities. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 22, n. 5, p. 830-838, 2010.

EKART, J. et al. Ranking and selection of MII oocytes in human ICSI cycles using gene expression levels from associated cumulus cells. *Human Reproduction*, v. 28, n. 11, p. 2930-2942, 2013.

EL SHOURBAGY, S. H. et al. Mitochondria directly influence fertilization outcome in the pig. *Reproduction*, v. 131, n. 2, p. 233-245, 2006.

EPSTEIN, J.; WEGIENKA, A.; SMITH, W. Biochemical development of preimplantation mouse embryos: in vivo activities of fructose 1,6-diphosphate aldolase, glucose 6-phosphate dehydrogenase, malate dehydrogenase, and lactate dehydrogenase. *Biochemical Genetics*, v. 3, n. 3, p. 271-281, 1969.

ERICKSON, G.; CHALLIS, J.; RYAN, K. A developmental study on the capacity of rabbit granulosa cells to respond to trophic hormones and secrete progesterone in vitro. *Developmental Biology*, v. 40, p. 208-224, 1974.

ERICSSON, S. A. et al. Assessment of porcine oocytes using brilliant cresyl blue. *Theriogenology*, v. 39, n. 1, p. 214, 1993.

FAKRUZZAMAN, M. et al. Mitochondrial content and gene expression profiles in oocyte-derived embryos of cattle selected on the basis of brilliant cresyl blue staining. *Animal Reproduction Science*, v. 142, p. 19-27, 2013.

FERRARETTI, A et al. ESHRE consensus on the definition of "poor response" to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Human Reproduction*, v. 26, n.7, p. 1616-1624, 2011.

FERRARETTI, A.; GIANAROLI L. The Bologna criteria for the definition of poor ovarian responders: is there a need for revision? *Human Reproduction*, v. 29, n. 9, p. 1842-1845, 2014.

FRAGOULI, E.; LALIOTI, M.; WELLS, D. The transcriptome of follicular cells: biological insights and clinical implications for the treatment of infertility. *Human Reproduction Update*, v. 20, n. 1, p. 1-11, 2014.

FU, B. et al. Subcellular characterization of porcine oocytes with different glucose-6-phosphate dehydrogenase activities. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, v. 28, n. 12, p. 1703-1712, 2015.

GHANEM, N. et al. Alterations in transcript abundance of bovine oocytes recovered at growth and dominance phases of the first follicular wave. *BMC Developmental Biology*, v. 7, n. 90, p.1-19, 2007.

GLARE, E. et al. Beta-actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalization mRNA levels. *Thorax*, v. 57, n. 9, p. 765-770, 2002.

GLEICHER, N.; BARAD, D. Can the *FMR1* gene predict early ovarian aging? *Women's Health*, v. 6, n. 2, p. 165-169, 2010.

GLEICHER, N; WEGHOFER, A; BARAD, D. Defining ovarian reserve to better understand ovarian aging, *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 9, n. 23, 2011.

GLEICHER, N. et al. How the *FMR1* gene became relevant to female fertility and reproductive medicine. *Frontiers in genetics*, v. 29, n. 5, p. 284, 2014.

GOOVAERTS, I. et al. Noninvasive bovine oocyte quality assessment: possibilities of a single oocyte culture. *Theriogenology*, v. 74, n. 9, p. 1509-1520, 2010.

GOSDEN, R.; KRAPEZ, J.; BRIGGS, D. Growth and development of the mammalian oocyte. *Bioessays*, v. 19, n. 10, p. 875-882, 1997.

GOSWAMI, D.; CONWAY, G. Premature ovarian failure. *Human Reproduction Update*, v. 11, n. 4, p. 391-410, 2005.

HADI, H. et al. Selection of immature bovine oocytes using Brilliant Cresyl Blue enhances nuclear maturity after vitrification. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, v.9, n. 2, p. 2710-2713, 2010.

HAJARIAN, H. et al. The presence of corpus luteum may have a negative impact on in vitro development competency of bovine oocytes. *Reproductive Biology*, v.16, p. 47-52, 2016.

HARRIS, S. et al. Prostaglandin E2 receptors are differentially expressed in subpopulations of granulosa cells from primate periovulatory follicles. *Biology of Reproduction*, v. 85, p. 916-923, 2011.

HE, Q.; GE, W. FMRP: a new chapter with chromatin. *Protein & Cell*, v. 5, n. 12, p. 885-888, 2014.

HELEIL, B. et al. Effect of Prolactin on developmental competence of bovine oocytes selected by Brilliant Cresyl Blue staining. *Journal of Reproduction and Infertility*, v. 1, p.1-7, 2010.

HUANG, J. Y. et al. Retrieval of immature oocytes from unstimulated ovaries followed by in vitro maturation and vitrification: a novel strategy of fertility preservation for breast cancer patients. *The American Journal of Surgery*, v. 200, n. 1, p. 177-183, 2010.

HUGGET, J. et al. Real-time RT-PCR normalization; strategies and considerations. *Genes and Immunity*, v. 6, p. 279-284, 2005.

HSUEH, A. et al. Intraovarian control of early folliculogenesis. *Endocrine Reviews*, v. 36, n.1, p. 1-24, 2015.

HYTTEL, P. et al. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, v. 47, n. 1, p. 23-32, 1997.

ISHIZAKI, C. et al. Developmental competence of porcine oocytes selected by brilliant cresyl blue and matured individually in a chemically defined culture medium. *Theriogenology*, v. 72, n. 1, p. 72-80, 2009.

JANOWSKI, D. et al. Incidence of apoptosis and transcript abundance in bovine follicular cells is associated with the quality of the enclosed oocyte. *Theriogenology*, v. 78, n. 3, p. 656-669, 2012.

JAROUDI, K. et al. Pregnancy after transfer of embryos which were generated from in-vitro matured oocytes. *Human Reproduction*, v. 12, n. 4, p. 857-859, 1997.

JIANG, J. et al. Mural granulosa cell gene expression associated with oocyte developmental competence. *Journal of Ovarian Research*, v. 3, n. 6, p. 1-12, 2010.

KARAMI-SHABANKAREH, H.; MIRSHAMSI, S. Selection of developmentally competent sheep oocytes using the Brilliant Cresyl Blue test and the relationship to follicle size and oocyte diameter. *Small Ruminant Research*, v. 105, p. 244-249, 2012.

KAYTOR, M.; ORR, H. RNA targets of the fragile X protein. *Cell*, v. 107, n. 5, 555-557, 2001.

KEMPISTY, B. et al. Zona pellucida glycoprotein 3 (pZP3) and integrin β 2 (ITGB2) mRNA and protein expression in porcine oocytes after single and double exposure to brilliant cresyl blue test. *Theriogenology*, v. 75, n. 8, p. 1525-1535, 2011.

KHIMANI, A. et al. Housekeeping genes in cancer: normalization of array data. *Biotechniques*, v. 38, n. 5, p. 739-745, 2005.

KIM, B. K. et al. In vitro maturation, fertilization, and development of human germinal vesicle oocytes collected from stimulated cycles. *Fertility and Sterility*, v. 74, n. 6, p. 1153-8, 2000.

KOESTER, M. et al. Evaluation of bovine zona pellucida characteristics in polarized light as a prognostic marker for embryonic developmental potential. *Reproduction*, v. 141, n. 6, p. 779-787, 2011.

LAML, T. et al. Genetic disorders in premature ovarian failure. *Human Reproduction Update*, v. 8, n. 4, p. 483-491, 2002.

LE DU, A. et al. In vitro oocyte maturation for the treatment of infertility associated with polycystic ovarian syndrome: the French experience. *Human Reproduction*, v. 20, n. 2, p. 420-424, 2005.

LI, Y. et al. Increased GDF9 and BMP15 mRNA levels in cumulus granulosa cells correlate with oocyte maturation, fertilization, and embryo quality in humans. *Reproductive Biology and endocrinology*, v. 12, n. 81, p. 1-9, 2014.

LIU, J. et al. Successful in vitro maturation of human oocytes not exposed to human chorionic gonadotropin during ovulation induction, resulting in pregnancy. *Fertility and Sterility*, v. 67, n. 3, p. 566-568, 1997.

MANGIA, F.; EPSTEIN, C. J. Biochemical studies of growing mouse oocytes: preparation of oocytes and analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase activities. *Developmental Biology*, v. 45, n. 2, p. 211-220, 1975.

MANJUNATHA, B. et al. Selection of developmentally competent buffalo oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM. *Theriogenology*, v. 68, n. 9, p. 1299-1304, 2007.

MAURIN, T.; ZONGARO, S.; BARDONI, B. Fragile X syndrome: from molecular pathology to therapy. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 46, n. 2, p. 242-255, 2014.

MIRSHAMSI, S. M. et al. Combination of oocyte and zygote selection by brilliant cresyl blue (BCB) test enhanced prediction of developmental potential to the blastocyst in cattle. *Animal Reproduction Science*, v. 136, n. 4, p. 245-251, 2013.

MLODAWSKA, W.; PAWLOWSKA, A.; KOCHAN, J. Meiotic competence of mare oocytes selected using the Brilliant Cresyl Blue test. *Havemeyer Foundation Monograph Series: 21 - 24*, 2005.

MOHAMMADI-SANGCHESHMEH, A. et al. G6PDH-activity in equine oocytes correlates with morphology, expression of candidate genes for viability, and preimplantative in vitro development. *Theriogenology*, v. 76, n. 7, p. 1215-26, 2011.

MOHAMMADI-SANGCHESHMEH, A. et al. Prediction of oocyte developmental competence in ovine using glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) activity determined at retrieval time. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 29, n. 2, p. 153-8, 2012.

MOHAMMADI-SANGCHESHMEH, A. et al. Association of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity with oocyte cytoplasmic lipid content, developmental competence, and expression of candidate genes in a sheep model. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 31, p. 1089-1098, 2014.

MOTA, G. et al. Developmental competence and expression of the MATER and ZAR1 genes in immature bovine oocytes selected by brilliant cresyl blue. *Zygote*, v. 18, n. 3, p. 209-216, Aug 2010.

MOTTERSHEAD, D. et al. Cumulin, an oocyte-secreted heterodimer of the transforming growth factor- β -family, is a potent activator of granulosa cells and improves oocyte quality. *The Journal of Biological Chemistry*, v.290, n. 39, p. 24007-24020, 2015.

MYRICK, L. et al. Human FMRP contains an integral tandem Agenet (Tudor) and KH motif in the amino terminal domain. *Human Molecular Genetics*, v. 24, n. 6, p. 1733-1740, 2015.

NAGY, R. et al. Presence of bile acids in human follicular fluid and their correlation with embryo development in modified natural cycle IVF. *Human Reproduction*, v. 30, n. 5, p. 1102-1109, 2015.

OLA, S.; SUN, Q. Factors influencing the biochemical markers for predicting mammalian oocyte quality. *Journal of Reproduction and Development*, v. 58, n. 4, p. 385-392, 2012.

OGATA, Y. et al. Effective embryo production from Holstein cows treated with gonadotropin-releasing hormone during early lactation. *Theriogenology*, in press, p. 1-6, 2016.

OPHIR, L. et al. Establishment and validation of a model for non-luteinized human mural granulosa cell culture. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 384, n. 1-2, p. 165-174, 2014.

OPIELA, J. et al. Interactions among activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in immature oocytes, expression of apoptosis-related genes Bcl-2 and Bax, and developmental competence following IVP in cattle. *Theriogenology*, v. 69, n. 5, p. 546-555, 2008.

OPIELA, J. et al. Transcript expression of mitochondria related genes is correlated with bovine oocyte selection by BCB test. *Animal Reproductive Science*, v. 118, n. 2-4, p. 188-193, 2010.

OPIELA, J.; KATSKA-K, L. The utility of Brilliant Cresyl Blue (BCB) staining of mammalian oocytes used for in vitro embryo production. *Reproductive Biology*, v. 13, n. 3, p. 177-183, 2013.

PAPLER, T. et al. No specific gene expression signature in human granulosa and cumulus cells for prediction of oocyte fertilization and embryo implantation. *PLoS ONE*, v. 10, n. 3, p. e0115865, 2015.

PAWLAK, P. et al. Disturbances of nuclear maturation in BCB positive oocytes collected from peri pubertal gilts. *Theriogenology*, v. 75, n. 5, p. 832-840, 2011.

PAWLAK, P. et al. The quality of porcine oocytes is affected by sexual maturity of the donor gilt. *Reproductive Biology*, v. 11, n. 1, p. 1-18, 2011.

PAWLAK, P. et al. Differences in cytoplasmic maturation between the BCB+ and control porcine oocytes do not justify application of the BCB test for standard IVM protocol. *Journal of Reproduction and Development*, v. 60, n. 1, 2014.

PASCIUTO, E.; BAGNI, C. SnapShot: FMRP mRNA targets and diseases. *Cell*, v. 158, n.6, 1446, 2014.

PASTORE, L.; JOHNSON, J. The *FMR1* gene, infertility, and reproductive decision-making: a review. *Frontiers in genetics*, v. 5, n. 195, 2014.

PEPRAH, E. Understanding decreased fertility in women carriers of the *FMR1* premutation: a possible mechanism for Fragile X-Associated Primary Ovarian Insufficiency (FXPOI). *Reproductive Health*, v. 11, n. 67, 2014.

PEREIRA, G. et al. Selection of developmentally competent immature equine oocytes with brilliant cresyl blue stain prior to in vitro maturation with equine growth hormone. *Zygote*, v. 22, p. 500-504, 2013.

PRETTO, D et al. Differential increases of specific *FMR1* mRNA isoforms in premutation carriers. *Journal of Medical Genetics*, v. 52, n. 1, p. 42-52, 2015.

PUJOL, M.; LOPEZ-BEJAR, M.; PARAMIO, M. Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. *Theriogenology*, v. 61, n. 4, p. 735-744, 2004.

QIN, Y. et al. Genetics of primary ovarian insufficiency: new developments and opportunities. *Human Reproduction Update*, v. 21, n. 6, p. 787-808, 2015.

RADONIC, A. et al. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 313, p. 856-862, 2004.

REDDY, P. et al. Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. *Science*, v. 319, n. 5863, p. 611-613, 2008.

REVEL, A. et al. At what age can human oocytes be obtained? *Fertility and Sterility*, v. 92, n. 2, p. 458-463, 2009.

RISS, T. et al. Cell viability assays. *Assay Guidance Manual*, 2015.

ROCA, J. et al. Selection of immature pig oocytes for homologous in vitro penetration assays with the brilliant cresyl blue test. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 10, n. 6, p. 479-485, 1998.

RODRIGUES, B. et al. Preliminary Study in Immature Canine Oocytes Stained with Brilliant Cresyl Blue and Obtained From Bitches with Low and High Progesterone Serum Profiles. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 44, n. 2, p. 255-258, 2009.

RODRIGUEZ-GONZALEZ, E. et al. Selection of prepubertal goat oocytes using the brilliant cresyl blue test. *Theriogenology*, v. 57, n. 5, p. 1397-1409, 2002.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, E. et al. Developmental competence of prepubertal goat oocytes selected with brilliant cresyl blue and matured with cysteamine supplementation. *Reproduction Nutrition Development*, v. 43, n. 2, p. 179- 87, 2003.

RUVOLO, G. et al. New molecular markers for the evaluation of gamete quality. *Journal of Assisted reproduction and Genetics*, v. 30, p. 207-212, 2013.

SADEESH, E. et al. Expression profile of developmentally important genes between hand-made cloned buffalo embryos produced from reprogramming of donor cell with oocytes extract and selection of recipient cytoplasm through brilliant cresyl blue staining and in vitro fertilized embryos. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v.31, n. 11, p. 1541-1552, 2014.

SALIMI, M. et al. The effect of melatonin on maturation, glutathione level and expression of HMGB1 gene in brilliant cresyl blue (BCB) stained immature oocyte. *Cell Journal*, v. 15, n. 4, 2014.

SALVIANO, M. et al. Bovine non-competent oocytes (BCB-) negatively impact the capacity of competent (BCB+) oocytes to undergo in vitro maturation, fertilization and embryonic development. *Zygote*, p. 1-7, 2015.

SÁNCHEZ, F.; SMITZ, J. Molecular control of oogenesis. *Biochemica et Biophysica Acta*, v.1882, p. 1896-1912, 2012.

SANTOS, E. et al. Brilliant cresyl blue staining negatively affects mitochondrial functions in porcine oocytes. *Zygote*, v. 23, p. 352-359, 2013.

SATHANANTHAN, A.; SELVARAJ, K.; TROUNSON, A. Fine structure of human oogonia in the foetal ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 161, n. 1-2, p. 3-8, 2000.

SCALICI, E. et al. Cell-free DNA in human follicular fluid as a biomarker of embryo quality. *Human Reproduction*, v. 29, n. 12, p. 2661-2669, 2014.

SCHUTTNER, J et al. Variable expression of the Fragile x Mental Retardation 1 (*FMR1*) gene in patients with premature ovarian failure syndrome is not dependent of (CGG)_n triplets in exon 1. *Human Reproduction*, v. 26, v. 5, p. 1241-1251, 2011.

SHABANKAREH, H.; AZIMI, G.; TORIKI, M. Developmental competence of bovine oocytes selected based on follicle size and using the brilliant cresyl blue (BCB) test. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, v. 12, n. 11, p. 771-778, 2014.

SILVA, D. S. et al. Selection of bovine oocytes by brilliant cresyl blue staining: effect on meiosis progression, organelle distribution and embryo development. *Zygote*, v. 21, n. 3, p. 250-255, 2013.

SONG, Y. et al. The future potential of cryopreservation for assisted reproduction. *Cryobiology*, v. 60, n. 3, p. S60- S65, 2010.

SPIKINGS, E. C.; ALDERSON, J.; ST JOHN, J. C. Regulated mitochondrial DNA replication during oocyte maturation is essential for successful porcine embryonic development. *Biology of Reproduction*, v. 76, n. 2, p. 327-335, 2007.

SPIRA, A.; MULTIGNER, L. Environmental factors and male infertility - The effect of industrial and agricultural pollution on human spermatogenesis. *Human Reproduction*, v. 13, n. 8, p. 2041-2042, 1998.

STEPANENKO, A.; DMITRENKO, V. Pitfalls of the MTT assay: direct and off-target effects of inhibitors can result in over/understimulation of cell viability. *Gene*, v. 572, n. 2, p. 193-203, 2015.

STROBER, W. et al. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current Protocols in Immunology*, Appendix 3 and 3B, 2001.

SU, J. et al. Oocytes selected using BCB staining enhances nuclear reprogramming and the in vivo development of SCNT embryos in cattle. *PLoS One*, v. 7, n. 4, p. e36181, 2012.

SUGULLE, A. et al. Selection of bovine oocytes by Brilliant Cresyl Blue before in vitro maturation improves blastocyst development. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 19, p. 273, 2006.

SUGULLE, A.; DOCHI, O.; KAYAMA, H. Developmental competence of bovine oocytes selected by Brilliant Cresyl Blue staining: effect on the presence of Corpus Luteum on embryo development. *Journal of Mammalian Ovarian Research*, v. 25, p. 50-55, 2008.

SUNKARA, S. et al. Should androgen supplementation be used for poor ovarian response in IVF? *Human Reproduction*, v. 27, n. 3, p. 637-640, 2012.

TABANDEH, M. R. et al. Gene expression pattern of adiponectin and adiponectin receptors in dominant and atretic follicles and oocytes screened based on brilliant cresyl blue staining. *Animal Reproduction Science*, v. 131, n. 1-2, p. 30-40, 2012.

TANGHE, S. et al. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Molecular Reproduction and Development*, v. 61, n. 3, p. 414-424, 2002.

TIFFIN, G. J. et al. Glucose and glutamine metabolism in pre-attachment cattle embryos in relation to sex and stage of development. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 93, n. 1, p. 125-32, 1991.

TONG, Z. et al. Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR. *BMC Molecular Biology*, v. 10, n. 71, p. 1-13, 2009.

TORNER, H. et al. Molecular and subcellular characterization of oocytes screened for their developmental competence based on glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Reproduction*, v. 135, n. 2, p. 197-212, 2008.

TRAN, S. Trypan blue dye enters viable cells incubated with the pore-forming toxin HIYII of *Bacillus cereus*. *PLoS ONE*, v. 6, n. 9, p. e22876, 2011.

TRICARICO, C. et al. Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Analytical Biochemistry*, v. 309, n. 2, p. 293-300, 2002.

TSUTSUMI, O. et al. Determination of enzyme-activities of energy-metabolism in the maturing rat oocyte. *Molecular Reproduction and Development*, v. 33, n. 3, p. 333-337, 1992.

TURHAN, N. Poor response – the devil is in the definition. *Fertility and Sterility*, v. 86, n. 3, p. 777, 2006.

URDANETA, A. et al. Supplementation with cysteamine during maturation and embryo culture on embryo development of prepubertal goat oocytes selected by the brilliant cresyl blue test. *Zygote*, v. 11, n. 4, p. 347-54, 2003.

UYAR, A.; TORREALDAY, S.; SELI, E. Cumulus and granulosa cells markers of oocyte and embryo quality. *Fertility and Sterility*, v. 99, n. 4, p. 979-997, 2013.

VAN TONDER, A.; JOUBERT, A.; CROMARTY, A. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Research Notes*, v. 8, n. 47, p. 1-10, 2015.

VICHAJ, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, v. 1, n. 3, p. 1112-1116, 2006.

VIREQUE, A. et al. Driving human granulosa-luteal cells recovered from in vitro fertilization cycles towards the follicular phase phenotype. *Reproductive Science*, v. 22, n. 8, p. 1015-1027, 2015.

XU, X. et al. Molecular signature in human cumulus cells related to embryonic developmental potential. *Reproductive Sciences*, v. 22, n. 2, p. 173-180, 2015.

WANG, L. et al. Selection of ovine oocytes by brilliant cresyl blue staining. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2012, , p. 161372, 2012.

WILLIAMS, T. J. A technique for sexing mouse embryos by a visual colorimetric assay of the X-linked enzyme, glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Theriogenology*, v. 25, n. 5, p. 733-9, 1986.

WINTERHAGER, E.; KIDDER, G. Gap junction connexins in female reproductive organs: implications for women's reproductive health. *Human Reproduction Update*, v.21, n. 3, p. 340-352, 2015.

WONGSRIKEAO, P. et al. Effects of single and double exposure to brilliant cresyl blue on the selection of porcine oocytes for in vitro production of embryos. *Theriogenology*, v. 66, n. 2, p. 366-372, 2006.

WU, Y. et al. Selection of oocytes for in vitro maturation by brilliant cresyl blue staining: a study using the mouse model. *Cell Research*, v. 17, n. 8, p. 722-31, 2007.

YANG, Y.; ZHANG, Y.; LI, Y. Ultrastructure of human oocytes of different maturity stages and the alteration during in vitro maturation. *Fertility and Sterility*, v. 92, n. 1, p. 396.e1-6, 2009.

ZHANG, H. et al. Characterization of an immortalized human granulosa cell line (COV434). *Molecular Human Reproduction*, v. 6, p. 146-153, 2000.

www.invitrogen.com/handbook/countess, acessado em janeiro de 2016.

www.sabiosciences.com - *Introduction to Real-Time quantitative PCR (qPCR)* / Qiagen – acessado em dezembro de 2015.

www.redlara.com/aa_portugues/default.asp, acessado em fevereiro de 2016 – *Red Latinoamericana de Reproducción Asistida*.

www.oecd.org/ehs/, acessado em fevereiro de 2016 - OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 129 GUIDANCE DOCUMENT ON USING CYTOTOXICITY TESTS TO ESTIMATE STARTING DOSES FOR ACUTE ORAL SYSTEMIC TOXICITY TESTS.

www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_041461.pdf, acessado em dezembro de 2015 - manual do usuário – *TaqMan® Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems*.

portal.saude.gov.br/portal/sas/mac/area.cmf?id_area=382, acessado em outubro de 2015.

Test Method Protocol for the NHK Neutral Red Uptake Cytotoxicity Assay Phase III - Validation Study: November 4, 2003.

11. Anexos

Anexo 1 – Avaliações da competência oocitária em maturar (taxa de MIV) e de ser fertilizado (taxa de FIV) entre CCOs classificados como positivo, negativo ou controle.

Parâmetro avaliado	BCB + = Controle	BCB + > Controle	BCB + > BCB -
Taxa de MIV	Alm H, 2005		Ericsson S, 1993
	Wu, 2007		Rodríguez-G, 2002 & 2003
	Manjunatha B, 2007		Urdaneta A, 2003
	Ishizaki C, 2009		Alm H, 2005
	Egerszegi I, 2010	Ericsson S, 1993	Wongsrikeao, 2006
	Catalá M, 2011	Rodríguez-G, 2002 & 2003	Wu, 2007
	Alcoba D, 2013	Wongsrikeao, 2006	Manjunatha B, 2007
	Mohammadi-S, 2012	Mohammadi-S, 2011	Ishizaki C, 2009
	Su J, 2012	Silva D, 2013	Egerszegi I, 2010
	Pereira, 2013	Fu B, 2015	Mohammadi-S, 2011 & 2012
	Abazari-Kia A, 2014		Silva D, 2013
	Pawlak P, 2014		Alcoba D, 2013
	Alcoba D, 2016*		Su J, 2012
			Wang L, 2012
			Abazari-Kia A, 2014
			Salimi M, 2014
		Fu B, 2015	
		Alcoba D, 2016*	
Taxa de FIV			Ericsson S, 1993
			Rodríguez-G, 2003
	Wongsrikeao, 2006		Urdaneta A, 2003
	Manjunatha B, 2007		Pujol M, 2004
	Ishizaki C, 2009		Wongsrikeao, 2006
	Egerszegi I, 2010		El Shourbagy, 2006
	Su J, 2012		Spikings E, 2007
	Catalá M, 2012		Manjunatha B, 2007
		Catalá M, 2011	
		Su J, 2012	

* dados ainda não publicados

Anexo 2 – Avaliações do desenvolvimento embrionário (clivagem e formação de blastocisto) entre CCOs classificados como positivo, negativo ou controle.

Parâmetro avaliado	BCB + = Controle	BCB + > Controle	BCB + > BCB -
Clivagem embrionária	Alm H, 2005		Sugulle A, 2006
	Manjunatha B, 2007		Wongsrikeao, 2006
	Bhojwani S, 2007		Manjunatha B, 2007
	Sugulle A, 2008		Bhojwani S, 2007
	Torner, 2008		Sugulle A, 2008
	Mota G, 2010		Opiela J, 2008 & 2010
	Ishizaki C, 2009		Mota G, 2010
	Opiela J, 2010		Heleil B, 2010
	Mohammadi-S, 2011 & 2012	Sugulle A, 2006	Mohammadi-S, 2011, 2012 & 2014
	Silva D, 2013	Wongsrikeao, 2006	Catalá M, 2012
	Su J, 2012	Opiela J, 2008	Janowski D, 2012
	Fakruzzman, 2013	Mirshamsi S, 2013	Wang L, 2012
	Sadeesh EM, 2014	Abazari-Kia A, 2014	Su J, 2012
	Shabankareh H, 2014		Mirshamsi S, 2013
	Ashry M, 2015		Fakruzzman, 2013
	Fu B, 2015		Abazari-Kia A, 2014
	Salviano M, 2015		Sadeesh EM, 2014
Azari-Dolatabad, 2016		Shabankareh H, 2014	
		Ashry M, 2015	
		Salviano M, 2015	
Formação de blastocisto			Pujol M, 2004
			Alm H, 2005
			Sugulle A, 2006
			Wongsrikeao, 2006
			Manjunatha B, 2007
			Bhojwani S, 2007
		Pujol M, 2004	Opiela J, 2008 & 2010
		Alm H, 2005	Torner H, 2008
		Manjunatha B, 2007	Sugulle A, 2008
		Bhojwani S, 2007	Mota G, 2010
		Mohammadi-S, 2012	Heleil B, 2010
		Silva D, 2013	Mohammadi-S, 2011, 2012 & 2014
		Su, 2012	Silva D, 2013
		Sugulle A, 2008	Su J, 2012
		Karami-S, 2012	Janowski D, 2012
		Silva D, 2011	Karami-S, 2012
		Mirshamsi S, 2013	Wang L, 2012
	Abazari-Kia A, 2014	Mirshamsi S, 2013	
	Sadeesh EM, 2014	Fakruzzman, 2013	
	Shabankareh H, 2014	Abazari-Kia A, 2014	
	Salviano M, 2015	Sadeesh EM, 2014	
		Shabankareh H, 2014	
		Ashry M, 2015	
		Fu B, 2015	
		Salviano M, 2015	