

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – FISILOGIA

**Leticia Schmidt Arruda**

**AÇÃO DO IGF-1 SOBRE O TRANSPORTE DO ÁCIDO  $\alpha$ -  
METILAMINOISOBUTÍRICO ( $[^{14}\text{C}]\text{MeAIB}$ ) E A PRODUÇÃO DE 17 $\beta$ -ESTRADIOL  
EM CÉLULAS DO *CUMULUS OOPHORUS* HUMANAS CULTIVADAS *IN VITRO* E  
ESTIMULADAS PELO FSH**

Porto Alegre

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – FISILOGIA

**Letícia Schmidt Arruda**

**AÇÃO DO IGF-1 SOBRE O TRANSPORTE DO ÁCIDO  $\alpha$ -  
METILAMINOISOBUTÍRICO ( $[^{14}\text{C}]\text{MeAIB}$ ) E A PRODUÇÃO DE 17 $\beta$ -ESTRADIOL  
EM CÉLULAS DO *CUMULUS OOPHORUS* HUMANAS CULTIVADAS *IN VITRO* E  
ESTIMULADAS PELO FSH**

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação como requisito  
parcial à obtenção do Grau de Mestre em  
Ciências Biológicas: Fisiologia.

Orientadora: BSc. MSc. PhD. Eloísa da  
Silveira Loss

Co-orientadora: BSc. MSc. PhD. Adriana Bos-  
Mikich

Porto Alegre

2015

## **AGRADECIMENTOS**

À todas as pessoas de alguma forma foram importantes na minha formação pessoal.

À minha orientadora, Eloisa da Silveira Loss, pelos ensinamentos e confiança no meu trabalho.

À minha co-orientadora, Adriana Bos-Mikich pela dedicação e ajuda na execução deste trabalho.

Ao Dr. Milvo Pozzer pela amizade e por me transmitir todo seu conhecimento. Pela confiança depositada em mim e pela oportunidade de evoluir como profissional.

À minha mãe, Elisa, que nunca mediu esforços pra me ajudar. Pelo exemplo de caráter e trabalho. Pelo amor e sorrisos incondicionais.

Ao meu pai, Chico, pelo carinho e apoio para que buscasse sempre me aperfeiçoar.

Às minhas irmãs pelo grande amor. À Natalia pela amizade e companheirismo aliado ao grande exemplo de profissional. Pelos ensinamentos na área de reprodução que foram fundamentais para minha carreira profissional. À Bia, pelo carinho e despertar para coisas novas.

À minha Vó Luiza, por me mostrar o sentido de querer viver. Ao seu carinho que me acolheu por tanto tempo.

Ao Dionísio, pelo grande apoio para o meu crescimento tanto profissional quanto afetivo. Pelo amanhecer ensolarado e amor.

À Fernanda, pela grande amizade, apoio e presença nos meus dias.

À todos meus amigos, que sempre me mostram que estão por perto pra me ajudar.

À Pandora, Capitu e Freud pelo amor incondicional.

À todos da Clínica Proser. Dr. Link, Dra. Noeli pela oportunidade de convivência e trabalho.

À Patricia, Rejane, Rafaela, Dona Beth e Ana, pela amizade e apoio de todos os dias.

Ao Diego Alcoba, Grace Pardo e Lúcia Meireles, pela amizade e ajuda fundamental em diferentes etapas dos experimentos.

Aos colegas de trabalho do Labenex: Fernanda, Laura e Luciana. Ao Gustavo, motivação e amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia da UFRGS pela oportunidade e infra-estrutura para realizar os experimentos.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela excelência nos seus docentes e formação profissional.

Ao CNPq/UFRRGS, o qual foi de extrema importância para a realização deste trabalho.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AKT: proteína quinase

AMH: hormônio anti-muleriano

AMP: monofosfato de adenosina cíclico

AMPc: monofosfato de adenosina

AREG: amfirregulina

BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro

BMP-15: proteína morfogenética óssea 15

CG: células da granulosa

CGM: células da granulosa murais

CO<sub>2</sub>: gás carbônico

COL: colesterol

CP: corpúsculo polar

CREB: proteína ligante ao elemento de resposta do AMPc

CYP11A1: enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol

CYP19A1: enzima aromatase

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA: ácido desoxirribonucleico

EGF: fator de crescimento epidermal

EREG: epiregulina

ERK1/2: proteína quinase regulada por sinal extracelular

FSH: hormônio folículo estimulante

FSHR: receptor do hormônio folículo estimulante

FSO: fatores secretados pelos oócitos

GDF-9: fator de diferenciação do crescimento 9

GH: hormônio de crescimento

GnRH: hormônio liberador de corticotrofinas

HBSS: solução salina balanceada de Hank's

hCG: gonadotrofina coriônica humana

HSD3B1: Gene humano que codifica para a 3βhidroxiesteroide desidrogenase tipo 1

HTF: do inglês human tubal fluid

ICSI: injeção intracitoplasmática de espermatozoide

IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1

IGF-1R: receptor do IGF do tipo 1

IGF: fator de crescimento semelhante à insulina

IGFBP: proteína ligante de IGF

LH: hormônio luteinizante

LHR: receptor do hormônio luteinizante

mCI: mili curri

[<sup>14</sup>C]MeAIB: ácido metilaminoisobutírico marcado com carbono 14 radioativo

MIV: maturação *in vitro*

MI: metáfase I

MII; metáfase II

mL: mililitros

mmol: mili mol

mUI: mili unidades internacionais

ng: nanograma

pg: picograma

pH: Potencial Hidrogeniônico

PI3K: Fosfatidil Inositol-3-quinase

PTX: toxina pertússica

PTZ: projeção transzonal

RNA: ácido ribonucleico

SOP: síndrome de ovário policístico

STAR: proteína reguladora aguda da esteroidogênese

TGF-β: fator de transformação de crescimento beta

UI: unidade internacional

VG: vesícula germinativa

VGBD: quebra da vesícula germinativa

α: Alfa

β: Beta

μL: microlitro

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 2.1</b> Estágios da foliculogênese e oogênese em mamíferos, a partir do desenvolvimento das células germinativas primordiais (PGC) até o estágio de vesícula germinativa (VG) no oócito dentro do folículo antral.....	17
<b>FIGURA 5.2.1</b> Esquema com os grupos experimentais para o transporte de MeAIB.....	43
<b>FIGURA 5.3.1</b> Esquema com os grupos experimentais para a dosagem de 17β-estradiol no meio de cultura após 24 horas em exposição aos hormônios.....	45
<b>FIGURA 6.2.1</b> Correlação entre a captação basal de [ <sup>14</sup> C]MeAIB e o número de oócitos MII coletados .....	49
<b>FIGURA 6.3.1</b> Correlação entre a idade das pacientes e a captação basal de [ <sup>14</sup> C]MeAIB	49
<b>FIGURA 6.4.1</b> Ação da adição do IGF-1 (24h, 25ng/mL) no meio de cultivo de células do <i>cumulus</i> humanas na captação de [ <sup>14</sup> C]MeAIB estimulado pelo FSH .....	50
<b>FIGURA 6.5.1</b> Ação do FSH e do IGF-1 na produção de 17β-estradiol em células do <i>cumulus</i> humanas.....	51
<b>FIGURA 6.6.1</b> Correlação entre o número de oócitos MII e a dosagem de 17β-estradiol em células do <i>cumulus</i> humanas não tratadas .....	52
<b>FIGURA 6.6.2</b> Correlação entre idade das pacientes e a dosagem de 17β-estradiol no meio de cultivo das células do <i>cumulus</i> .....	52

## **LISTA DE TABELAS**

**TABELA 6.1.1** Dados das pacientes do experimento de transporte de aminoácido ..... 48

**TABELA 6.1.2** Dados das pacientes do experimento de mensuração de 17 $\beta$ -estradiol..... 48



## RESUMO

O oócito e as células do *cumulus* apresentam uma comunicação bi-direcional através de projeções que atravessam a zona pelúcida, sendo fundamental no transporte de aminoácidos para o crescimento e maturação oocitária. O oócito regula diversas funções das células do *cumulus* que o rodeiam e é o responsável por mantê-las diferenciadas das demais. Desta forma, estas células têm se mostrado de grande utilidade para pesquisa, pois podem manter o estado menos indiferenciado *in vitro*, semelhantes às fases iniciais de desenvolvimento folicular e, portanto, ideais para estudos que visam entender melhor o processo de diferenciação celular durante a foliculogênese, bem como as interações hormonais que ocorrem neste período. Diversos trabalhos têm sugerido a ação sinérgica do FSH e do IGF-1 na esteroidogênese, através da estimulação das mesmas vias metabólicas, porém com grande variabilidade dos resultados entre as espécies. Neste trabalho, as células do *cumulus* foram coletadas durante o procedimento de FIV na Clínica Proser, e posteriormente cultivadas em meio DMEM modificado, na concentração final de  $5 \times 10^4$  células/poço. Para ambos experimentos as células foram cultivadas em incubadora por 24h antes dos tratamentos específicos de cada grupo. Para o transporte de [ $^{14}\text{C}$ ]MeAIB foram feitos 3 grupos: 1) grupo controle; 2) grupo FSH; 3) grupo IGF-1+FSH. Todos os grupos foram cultivados por 24h em meio DMEM, sendo acrescido 25ng/mL de IGF-1 ao grupo IGF-1+FSH. Posteriormente, as células foram incubadas à 37°C por 45 min em meio HBSS acrescido de 0,2  $\mu\text{Ci/mL}$  de [ $^{14}\text{C}$ ]MeAIB por amostra. Foi adicionado ao meio de incubação 75 mIU/ml de FSH nos grupos FSH e IGF-1+FSH. A reação foi encerrada com colocação das placas em gelo e o meio foi retirado da placa e congelado. As células foram lavadas com HBSS à 4°C e 0,5 mL/poço de água foi adicionado antes de serem congeladas à -20°C. Para a contagem do radioativo, as células foram descongeladas, sonicadas e centrifugadas à 800g por 10min. Alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  foram retiradas de todas as amostras (meio interno e externo) e colocadas em 1,5mL de líquido de cintilação para a mensuração da radioatividade em espectrômetro de cintilação líquida LKB beta modelo 1215. A dosagem de proteína das amostras foi realizada segundo o método de Lowry. Os resultados foram expressos pela relação entre radioatividade das células e a radioatividade do meio de incubação. Para a dosagem de 17 $\beta$ -estradiol as células foram cultivadas nas mesmas condições conforme o experimento anterior. Após 24 horas de cultivo, as células foram divididas em quatro grupos: 1) grupo controle: somente o meio de cultivo; 2) grupo FSH: foi adicionado 75mUI de FSH ao meio; 3) grupo IGF-1: foi adicionado na concentração de 25ng IGF-1/mL ao meio; 4) grupo

FSH+IGF-1: foi adicionado FSH (75mUI/mL) e IGF-1 (25ng/mL) ao meio. Ao final de 24h de cultivo, o meio foi congelado à -20°C. O meio foi diluído na proporção 1:10 no meio tampão do kit. Posteriormente, a mensuração do 17β-estradiol foi feita por Elisa, utilizando-se o kit comercial 17β-estradiol EIA kit. Foram utilizados os seguintes itens para correlação com os parâmetros experimentais: a idade e o número de oócitos MII que foram submetidos à ICSI. Para a análise estatística foram feitos os testes: ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Bonferroni, Shapiro-Wilk para avaliação da distribuição dos dados, Kruskal-Wallis e coeficiente de correlação de Pearson's. As diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ . Foi encontrado uma forte correlação negativa entre o número de oócitos MII e o transporte de [<sup>14</sup>C]MeAIB (n=5;  $P=0,03$ ). Não foi encontrada correlação entre o transporte de [<sup>14</sup>C]MeAIB com a idade das pacientes, sendo o valor de  $P > 0,05$ . A incubação com FSH (75 mUI/mL) e o cultivo com IGF-1 (25ng/mL) durante 24h não estimularam o transporte de [<sup>14</sup>C]MeAIB nas células do *cumulus* humanas (n=5;  $P=0,620$ ). O cultivo com a adição de FSH, IGF-1 ou ambos por 24h não aumentou a secreção de 17β-estradiol (pg/mL) no meio de cultura, comparado ao grupo controle (n= 7;  $P = 0,855$ ). Em relação à concentração de 17β-estradiol nas células do *cumulus* não tratadas, não foi encontrada nenhuma correlação entre os parâmetros avaliados de idade e número de oócitos MII (n=7)  $P > 0,05$ . Podemos concluir que o sistema A de transporte de aminoácidos está presente em células do *cumulus* humanas, sendo que a taxa basal é inversamente proporcional ao número de oócitos MII coletados. Provavelmente, o IGF-1 não ocasiona um aumento direto na expressão do FSHR, uma vez que quando adicionado ao meio de cultivo não estimulou os parâmetros analisados comparados aos grupos com somente FSH. Além disso, quando adicionado IGF-1 sozinho ao meio de cultura das células do *cumulus*, nenhuma alteração na produção de 17β-estradiol foi observada, sugerindo que o IGF-1 não tenha um efeito direto na esteroidogênese destas células. Portanto, embora existam diversos trabalhos que tem auxiliado na compreensão da interação entre o IGF-1 e o FSH na diferenciação celular durante a foliculogênese, ainda faltam pontos cruciais neste processo em células humanas. Da mesma forma, são necessários mais estudos que caracterizem as células do *cumulus*, bem como a sua interação com o oócito, para que possamos aplicar estes conhecimentos com a finalidade de melhorar as taxas de MIV oocitária.

## **ABSTRACT**

*Oocyte and the cumulus cells have a bi-directional communication through projections that cross the zona pellucida, being fundamental for the transport of amino acids necessary for gamete growth and maturation. Oocyte plays a dominant role in establishing the heterogeneity of the granulosa cells found in preovulatory follicles by preventing the differentiation of the cumulus granulosa cells. Thus, culturing cumulus cells from preovulatory follicles is a suitable approach to study granulosa cell differentiation as well as the hormonal interactions that occur in folliculogenesis. Several studies have suggested the synergic action of FSH and IGF-1 in steroidogenesis, through the stimulation of the same metabolic pathways, but with great variability of results among species. We evaluate the basal transport and the transport stimulated by FSH [<sup>14</sup>C]MeAIB in human cumulus cells, observing whether the addition of IGF-1 to the culture medium alters this parameter. Cumulus cells were collected during the IVF procedures at Proser Assisted Reproduction Center, and cultured in modified DMEM, at a final concentration of 5x10<sup>4</sup> cells/well. For both experiments, cells were cultured in an incubator for 24h before the specific treatment of each experimental group. For the transport of [<sup>14</sup>C]MeAIB 3 groups were made: 1) control group; 2) FSH group; 3) IGF-1 + FSH group. All groups were further cultured for 24h. Twenty five mg/mL of IGF-1 were added to the to the culture medium of the IGF-1 + FSH group. Cells were incubated at 37°C for 45 min in HBSS medium plus 0,2 µCi/mL of [<sup>14</sup>C] MeAIB per sample, wherein FSH and FSH + IGF-1 groups had 75 mIU/mL of FSH added to the incubation medium. The reaction was terminated by placing the plates on ice and the medium was removed from the plate and frozen. Cells were washed with HBSS at 4°C and 0.5 mL/well of water were added before being frozen at -20°C. For radioactive counting, cells were thawed, sonicated and centrifuged at 800g for 10min. Aliquots of 100 uL were taken from all samples (internal and external medium) and placed in 1.5 mL of scintillation liquid for measurement of radioactivity in a liquid scintillation spectrometer LKB beta 1215 model. Protein dosage of the samples was performed according to the method of Lowry. Results were expressed by the ratio between the radioactivity of cells and the radioactivity of the incubation medium. For the 17β-estradiol dosage, cells were cultured under the same conditions as the previous experiment. After 24 hours of culture, the cells were divided into four groups: control group = only the culture medium; FSH group = it was added 75mUI of FSH to the medium; IGF-1 group = it was added IGF-1 at a concentration of 25ng/mL to the medium; FSH + IGF-1 group = it was added FSH (75mUI/mL) and IGF-1 (25ng/mL) to the*

medium. After of 24 hours of cultivation, the medium was frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$ . The medium was diluted in a 1:10 ratio in the kit buffer medium. Afterwards, measurement of  $17\beta$ -estradiol was made by ELISA using a  $17\beta$ -estradiol EIA commercial kit. The following items were used for correlation with the experimental parameters: the age of the patients and the number of MII oocytes that underwent ICSI. For statistical analysis two tests were used: One-way ANOVA followed by Bonferroni post-test, Shapiro-Wilk for evaluation of data distribution, Kruskal-Wallis and Pearson's correlation coefficient. Differences were considered significant when  $P < 0.05$ . A strong negative correlation was found between the number of MII oocytes and the transport of [ $^{14}\text{C}$ ]MeAIB ( $n = 5$ ;  $p = 0.03$ ). No correlation was observed between the transport of [ $^{14}\text{C}$ ]MeAIB and the age of patients ( $P > 0.05$ ). The incubation with FSH (75 mIU/mL) and the cultivation with IGF-1 (25ng/mL) for 24 hours did not stimulate the transport of [ $^{14}\text{C}$ ]MeAIB in human cumulus cells ( $n = 5$ ;  $P = 0.620$ ). The culture with the addition of FSH, IGF-1, or both for 24 hours did not increase the secretion of  $17\beta$ -estradiol (pg/mL) in the culture medium compared to the control group ( $n = 7$ ;  $P = 0.855$ ). Regarding the  $17\beta$ -estradiol concentration in the untreated cumulus cells, it was not found any correlation between the evaluated parameters of age and number of MII oocytes ( $n = 7$ )  $P > 0.05$ . We conclude that the A system amino acid transport is present in human cumulus cells, and that the basal rate is inversely proportional to the number of MII collected oocytes. Probably, IGF-1 does not cause a direct increase in FSHR expression, once when added to the culture medium it did not stimulate the parameters analyzed compared to the groups with FSH alone. Moreover, when IGF-1 is added alone to the culture medium of cumulus cells, no change in  $17\beta$ -estradiol production was observed, suggesting that IGF-1 has not a direct effect on these cells steroidogenesis. Therefore, although there are several studies that have assisted in understanding the interaction between IGF-1 and FSH in cell differentiation during folliculogenesis, there are still crucial unknown points in this process in human cells. Likewise, more studies are needed to characterize the cumulus cells, as well as their interaction with the oocyte, so we can apply this knowledge to improve oocyte IVM rates.

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	3
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	5
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	7
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	8
<b>RESUMO</b> .....	9
<b>ABSTRACT</b> .....	11
<b>SUMÁRIO</b> .....	13
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	17
<b>2.1 Foliculogênese e oogênese</b> .....	17
<b>2.2 Maturação oocitária</b> .....	22
<b>2.3 Interação entre o oócito e as células da granulosa</b> .....	24
<b>2.4 Maturação <i>in vitro</i> de oócitos</b> .....	25
<b>2.5 Sistema IGF</b> .....	26
2.5.1 A importância do sistema IGF para a foliculogênese .....	28
<b>2.6 Cultura de células da granulosa</b> .....	31
<b>2.7 Transporte de aminoácidos</b> .....	35
<b>3 HIPÓTESES</b> .....	39
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	40
<b>4.1 Objetivo geral</b> .....	40
<b>4.2 Objetivo específico</b> .....	40
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	41
<b>5.1 Obtenção e cultivo das células do <i>cumulus</i></b> .....	41
<b>5.2 Transporte de aminoácidos</b> .....	42
5.2.1 Processamento das amostras para contagem de radioatividade .....	43
<b>5.3 Dosagem de 17<math>\beta</math>-estradiol no meio de cultivo celular</b> .....	44
<b>5.4 Banco de dados das pacientes</b> .....	45
<b>5.5 Análise estatística</b> .....	45
<b>5.6 Biossegurança</b> .....	46
<b>5.7 Aspectos éticos</b> .....	46
<b>6 RESULTADOS</b> .....	48
<b>6.1 Dados gerais da paciente e do respectivo desenvolvimento de cada ciclo</b> .....	48

<b>6.2</b>	<b>Correlação entre o número de oócitos MII e o transporte basal de [<sup>14</sup>C]MeAIB....</b>	<b>49</b>
<b>6.3</b>	<b>Correlação entre a idade das pacientes e o transporte basal de [<sup>14</sup>C]MeAIB.....</b>	<b>49</b>
<b>6.4</b>	<b>Efeito da adição do IGF-1 por 24h ao meio de cultivo das células do <i>cumulus</i> humanas no transporte de [<sup>14</sup>C]MeAIB estimulado pelo FSH.....</b>	<b>50</b>
<b>6.5</b>	<b>Efeito da adição do IGF-1 e do FSH no meio de cultura das células do <i>cumulus</i> humanas sobre a concentração de 17β-estradiol .....</b>	<b>51</b>
<b>6.6</b>	<b>Correlação entre o número de oócitos MII e a idade com a concentração de 17β-estradiol no meio de cultura .....</b>	<b>51</b>
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>8</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>66</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>67</b>
	<b>ANEXO 1.....</b>	<b>85</b>
	<b>ANEXO 2.....</b>	<b>89</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Estima-se que aproximadamente 15% dos casais em idade reprodutiva tenha algum problema relacionado à fertilidade, o que tem levado ao aumento da procura pelos serviços de reprodução assistida. Com o avanço de novas técnicas, a maturação *in vitro* (MIV) tem sido amplamente estudada visando beneficiar alguns casos específicos, como pacientes com síndrome do ovário policístico (SOP). Entretanto, as taxas de gestação alcançadas na maioria dos centros de reprodução por esta técnica ainda são mais baixas que as técnicas tradicionais, fazendo com que seja pouco utilizada na rotina clínica. Embora a MIV não tenha sido correlacionada com uma redução da habilidade oocitária de fertilização (FADINI *et al.*, 2009; DAL CANTO *et al.*, 2012), diversos trabalhos sugerem que os embriões provenientes de MIV apresentam uma menor taxa de implantação e gestação comparados aos embriões gerados de oócitos maturados *in vivo* (FADINI *et al.*, 2009; GREMEAU *et al.*, 2012). Em pacientes com SOP, têm sido relatadas taxas de gestação de 20-30% com oócitos de MIV, porém estas taxas são obtidas com a transferência de um número maior de embriões, de 3 à 5 (CHIAN *et al.*, 2000; TAN e CHILD, 2002). Portanto, estes dados sugerem que os embriões de MIV têm uma capacidade de implantação menor que embriões provenientes de oócitos maturados *in vivo*.

Diversas pesquisas têm sido realizadas visando entender melhor os mecanismos envolvidos na foliculogênese e na maturação oocitária a fim de aprimorar a eficiência da MIV. Sabe-se que o microambiente ovariano é influenciado por vários fatores que agem localmente, dentre eles os fatores de crescimento semelhante à insulina (IGFs). Tem sido sugerido que o IGF do tipo 1 (IGF-1) age estimulando o transporte de aminoácidos nas células da granulosa humanas (HILLENSJO *et al.*, 1992) porém não se sabe se há algum efeito somatório quando o IGF-1 é adicionado ao meio de cultivo das células da granulosa anteriormente à estimulação pelo FSH. A interação entre estes dois hormônios vem sendo esclarecida, tanto pela influência que exercem modulando a expressão de seus receptores, quanto através da convergência das mesmas vias estimulatórias, havendo grande variabilidade entre as espécies.

As células da granulosa na fase folicular final são diferenciadas em células murais e do *cumulus*, sendo que as murais revestem a parede do folículo. Já as células do *cumulus* envolvem o oócito, apresentando características e funções bem distintas das

células murais. Este complexo formado pelo oócito e células do *cumulus* apresenta uma comunicação bi-direcional através de projeções que atravessam a zona pelúcida, as projeções transzonais (PTZ). Esta comunicação é fundamental no transporte de moléculas para o crescimento e maturação oocitária, bem como diversos aminoácidos que passam através das junções comunicantes ou junções *gap*. Pouco se sabe a respeito do transporte de aminoácidos nas células do *cumulus* humanas, bem como da sua estimulação pelo FSH e IGF-1.

As células da granulosa foliculares são responsáveis pela produção de hormônios esteroides durante o desenvolvimento folicular, dentre eles o 17 $\beta$ -estradiol. Através da influência do FSH, há uma estimulação para a síntese e secreção de 17 $\beta$ -estradiol, durante o crescimento dos folículos ovarianos. Esta secreção é essencial para a proliferação das células da granulosa e posteriormente para o pico do hormônio luteinizante (LH). Após a ovulação, por ação do LH, as células da granulosa murais se diferenciam e juntamente com as células da teca interna formam o corpo lúteo, que por sua vez secretará progesterona. As células da granulosa têm sido utilizadas em sistemas de cultivo para estudar os mecanismos hormonais ovarianos, pois desempenham funções essenciais para a oogênese. Em contrapartida, o oócito regula diversos mecanismos, controlando as células do *cumulus* que o rodeiam e diferenciando-as das demais. Estas células têm se mostrado de grande utilidade para pesquisa, pois podem manter o estado menos indiferenciado *in vitro*, semelhantes às fases iniciais de desenvolvimento folicular (BAUMGARTEN *et al.*, 2014). Uma das formas de demonstrar o estágio de diferenciação destas células *in vitro*, seria através da avaliação da expressão de receptores para FSH. Em estados onde elas se encontram menos indiferenciadas, há uma maior expressão de FSHR e uma maior produção de 17 $\beta$ -estradiol.

Desta forma, novas pesquisas são necessárias para compreender a influência destes hormônios no transporte de aminoácidos, bem como se eles de fato atuam em sinergismo na esteroidogênese destas células. A partir dessas pesquisas, novos ambientes de cultivo *in vitro* que mimetizem o ambiente *in vivo* podem ser desenvolvidos, de forma a obterem-se oócitos maduros e capazes de gerar um feto.



## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Foliculogênese e oogênese

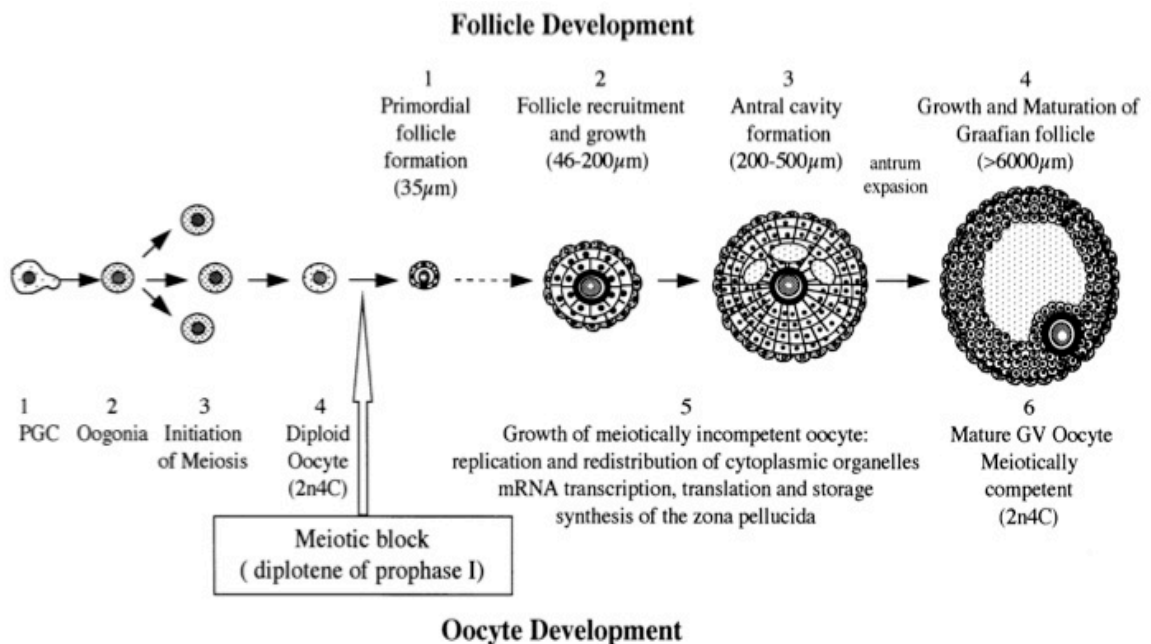
As primeiras descrições de reprodução que se tem registro foram feitas por Hipócrates no século XV a.C., onde se afirmou que a “geração” ocorria através da união do ejaculado masculino com o sangue menstrual feminino. Depois de quase um milênio, William Harvey descreveu “*ex ovo omnia*”, uma expressão na qual ele referia que o “ovo” era o responsável pela geração de uma nova vida. No final de 1600, durante o Iluminismo, Regnier Graaf reconheceu o ovário como o local de produção dos “ovos”. Estes cientistas acreditavam que o folículo feminino sozinho conseguiria se desenvolver em um bebê. Somente em 1827, Karl Ernst von Baer descobriu que o oócito mamífero estava dentro de um folículo ovariano (COOB, 2006). Em humanos, as primeiras descrições do desenvolvimento folicular somente foram feitas no século 20 (BLOCK, 1951).

A duração da foliculogênese humana, desde a fase de folículo primordial até a pré-ovulatória, tem sido estimada em 175 dias (GOUGEON, 1986). A figura 1 elucida os eventos da foliculogênese em paralelo ao desenvolvimento oocitário. O desenvolvimento folicular se inicia por volta do quarto mês no feto (BAKER, 1963). Primeiramente as células primordiais germinativas migram do endoderma do saco vitelino para a crista gonadal, diferenciando-se em oogônias ou espermatogônias, de acordo com os cromossomos sexuais. No embrião feminino, essas células passam por diversas divisões mitóticas, formando grupos de oogônias conectadas umas nas outras (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). As células somáticas, originárias da gônada primitiva, circundam as oogônias e dão origem às células epiteliais, às células da granulosa e da teca, às células intersticiais e aos fibroblastos, originando assim o folículo ovariano rudimentar (<0,1mm de diâmetro) (GOUGEON, 1979). Juntamente com as células foliculares, que apresentam uma forma achatada, as oogônias iniciam a replicação do ácido desoxirribonucléico (DNA) e entram na primeira divisão meiótica, tornando-se oócitos primários. Os folículos primordiais contendo os oócitos estacionados na fase de diplóteno da prófase da primeira meiose constituem a reserva folicular ovariana, que serão os folículos disponíveis durante a idade reprodutiva da mulher. Este paradigma de que não há produção de novas células germinativas na vida

adulta tem sido questionado, embora ainda não se tenha fatos conclusivos para rebatê-lo (BYSKOV *et al.*, 2005).

O número de folículos primordiais totais é de aproximadamente 7 milhões na vigésima semana de gestação. Porém, devido à extrema vulnerabilidade dos oócitos nesta fase, muitos acabam degenerando. A diminuição desta reserva iniciada durante a vida fetal faz com que aproximadamente 90% dos oócitos degenerem antes do nascimento, estimando-se que o número de oócitos nos ovários humanos ao nascer seja de 700 mil (BAKER, 1963).

Os folículos primordiais ficam quiescentes nos ovários até o momento do recrutamento folicular. A transição de folículos primordiais para primários é marcada pela transição histológica do formato das células foliculares de achatadas para cuboidais. A partir do momento em que duas ou mais camadas de células da granulosa se desenvolvem ao redor do oócito, estes passam a se chamar folículos secundários. Neste período o oócito entra em uma fase de crescimento, as células da granulosa tornam-se mais proliferativas e passam a expressar receptores de FSH. A camada da teca, por sua vez, se desenvolve ao redor das células da granulosa (EDSON; NAGARAJA; MATZUK, 2009).



**Fig. 2.1** Estágios da foliculogênese e oogênese em mamíferos, a partir do desenvolvimento das células germinativas primordiais (PGC) até o estágio de vesícula germinativa (VG) no oócito dentro do folículo antral (PINCTON; BRIGGS; GOSDEN, 1998).

Para que os oócitos se tornem aptos à maturação e posteriormente possam ser fertilizados e sigam o desenvolvimento embrionário, é necessário que passem por uma fase de crescimento. Nesta fase, além de terem seu volume aumentado, os oócitos sofrem uma reorganização citoplasmática, que depende da produção de novos produtos gênicos e organelas, bem como da modificação e da redistribuição das já existentes (PICTON; BRIGGS; GOSDEN, 1998). Nesta fase há um aumento no ácido ribonucléico (RNA) e na síntese proteica, no número de ribossomos, mitocôndrias e outras organelas. A acumulação disseminada de vesículas, grânulos de glicogênio, gotas lipídicas e corpos multivesiculares, são um indicativo de estocagem e do transporte molecular através de membrana oocitária. Muitas organelas se dispersam na periferia (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005) e ao término do estágio folicular pré-antral o oócito termina sua fase de crescimento e torna-se apto a completar a Meiose I (ELVIN; MATZUK, 1998). Uma das modificações mais importantes desta fase de crescimento oocitário, compreende a formação da zona pelúcida, um envoltório glicoproteico que circunda o oócito (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Esta camada desempenha diversas funções importantes, estando envolvida na reação acrossomal do espermatozoide e na prevenção da poliespermia (BLEIL; WASSARMAN, 1980).

Os mecanismos fundamentais responsáveis pela progressão no desenvolvimento dos folículos primordiais para folículos primários ainda não foram completamente explicados (BAERWALD; ADAMS; PIERSON, 2012). Entretanto, a maioria dos estudos sugere que o destino de cada folículo seja dependente de um balanço delicado entre a expressão e a ação de fatores promotores de proliferação celular, crescimento e diferenciação, além daqueles que promovem apoptose. Um desses fatores é o hormônio anti-mülleriano (AMH) que tem um papel fundamental para a regulação do desenvolvimento e da seleção folicular, atuando na inibição do recrutamento folicular e na fase de crescimento folicular dependente de FSH (revisado por KEDEM-DICKMAN *et al.*, 2012).

Os folículos pré-antrais (~0,1-0,2mm) se desenvolvem independentemente das gonadotrofinas (GOUGEON, 1979). Com aproximadamente 0,2 a 0,4 mm, uma cavidade de líquido (antro) começa a ser formada, e os folículos agora dito antrais, tornam-se responsivos às gonadotrofinas (GOUGEON, 1979; CRAIG *et al.*, 2007). Os folículos podem se desenvolver até a formação do antro inicial durante a vida fetal ou a infância, mas acabam entrando em atresia (GOUGEON, 1996). Na puberdade, a

maturação do eixo hipotálamo-hipófise-ovário resulta na liberação pulsátil do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e consequentemente de FSH e do LH da hipófise, culminado com o desenvolvimento cíclico de folículos antrais ( $\geq 2\text{mm}$ ), com o início das ovulações e o ciclo menstrual (GOUGEON, 2004). O estágio antral inicial é marcado pela responsividade e dependência folicular da regulação extra-ovariana comandada pelo eixo hipotálamo-hipófise-ovário, o qual secreta FSH em resposta à estimulação pulsátil de GnRH do hipotálamo (ELVIN; MATZUK, 1998). O FSH promove o crescimento folicular, a expressão dos receptores de LH e a expressão da aromatase P450 também conhecida como CYP19A1, que é responsável por converter os andrógenos em estrógenos (RICHARDS, 1994).

O avanço no desenvolvimento de um grupo de folículos antrais de tamanho médio (2-5mm) é chamado de recrutamento folicular, já a dominância folicular, é a seleção de um folículo dentre os tantos que foram recrutados. Diversas teorias tentam explicar como ocorre esta dinâmica de recrutamento e seleção folicular. Inicialmente alguns autores sugeriram que folículos antrais pequenos crescem e regridem continuamente durante o ciclo menstrual, sendo que o folículo dominante é selecionado ao acaso, independente de gonadotrofinas. Entretanto, outros autores sugerem que o folículo dominante é selecionado de uma única onda folicular que emerge depois da regressão luteal. A terceira teoria sugere que há uma ou duas ondas de recrutamento folicular durante o ciclo menstrual (BAERWALD; ADAMS; PIERSON, 2012). O folículo dominante se desenvolve ao final de uma onda ovulatória (que representam a minoria), enquanto as demais ondas são anovulatórias (BAERWALD; ADAMS; PIERSON, 2012).

O processo de seleção ou dominância de um folículo dentre os folículos recrutados ocorre normalmente entre o início e o meio da fase folicular do ciclo menstrual, levando este folículo selecionado à ovulação (revisado por BAERWALD; ADAMS; PIERSON, 2012). No momento da seleção, o perfil de crescimento do folículo dominante diverge dos demais no diâmetro aproximado de 10mm (dia 6-7 da fase folicular), enquanto os folículos subordinados entram em atresia. As mudanças morfológicas na dinâmica de crescimento do folículo dominante em humanos são semelhantes às descritas em outras espécies monovulatórias (ADAMS; PIERSON, 1995; GINTHER *et al.*, 2001).

Enquanto que um aumento na concentração de FSH é um requisito para o recrutamento folicular, o declínio posterior da concentração deste hormônio é o fator crucial para a seleção do folículo dominante. A duração da concentração de FSH acima de um limiar crítico determina o número de folículos dominantes, ou seja, fisiologicamente a duração que o FSH se encontra acima do limiar é curta, para que somente um folículo seja dominante. Tem sido postulado que o folículo dominante tem mais células da granulosa e mais receptores de FSH, o que o torna mais sensível que os demais folículos (revisado por BAERWALD; ADAMS; PIERSON, 2012). Quando o FSH diminui, os demais folículos entram em atresia, enquanto o dominante consegue sobreviver. Além disso, o folículo dominante secreta mais  $17\beta$ -estradiol e inibina B no meio do ciclo, os quais são responsáveis pelo *feedback* negativo na secreção de FSH hipofisário. O aumento de  $17\beta$ -estradiol estimula a expressão dos receptores de LH nas células da granulosa do folículo dominante, tornando-o menos dependente de FSH e mais responsivos ao LH que os demais (revisado por BAERWALD; ADAMS; PIERSON, 2012).

No folículo dominante, o oócito é circundado por uma camada próxima de células da granulosa que se diferenciaram, chamadas de células do *cumulus oophorus*. As camadas de células do *cumulus* mais próximas ao oócito são conhecidas como células da corona radiata, que juntamente com as demais células do *cumulus* e o oócito formam o complexo *cumulus*-oócito (CCO). Este complexo é como uma península, circundado pelo fluido folicular e conectado às células murais da granulosa que circundam o folículo (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005).

O folículo dominante cresce até o período pré-ovulatório, chegando a 16-19 mm. Um dia antes do pico de LH, a produção de  $17\beta$ -estradiol atinge os níveis máximos, que provoca o *feedback* positivo no hipotálamo e na hipófise, levando ao pico de LH necessário para que ocorra a ovulação. O folículo dominante altamente vascularizado é responsivo ao LH, levando o oócito a terminar a meiose I, seguindo com a extrusão do primeiro corpúsculo polar (CP) (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Embora a ovulação ocorra em média 24 horas após o pico de LH, a luteinização das células da granulosa é iniciada anteriormente, logo após o aumento do  $17\beta$ -estradiol (revisado por BAERWALD; ADAMS; PIERSON, 2012).

## 2.2 Maturação oocitária

Para se tornarem aptos à fertilização e ao desenvolvimento embrionário, os oócitos devem passar tanto pela maturação nuclear quanto pela citoplasmática. Ainda na vida fetal, os oócitos iniciam a meiose I que somente será terminada na ovulação. Durante a foliculogênese, os oócitos são mantidos em dictióteno da prófase I da primeira meiose para que cresçam completamente até o estágio antral folicular e adquiram a habilidade de completar a meiose I antes da ovulação. Estes oócitos apresentam um núcleo visível chamado vesícula germinativa (VG). É na VG que estão os cromossomos descondensados, dispersos e com atividade transcricional (GRØNDAHL, 2008).

Antes dos sinais ovulatórios, as células do *cumulus* são conectadas entre si e com o oócito por junções do tipo *gap* compostas por conexinas (EPPIG; SCHROEDER; O'BRIEN, 1992). Estas junções *gap* são responsáveis pelo transporte de moléculas pequenas, como o monofosfato de adenosina (AMP) (ALBERTINI *et al.*, 2001). A regulação dos níveis de AMP cíclico (AMPc) intracelular é fundamental para a maturação oocitária, sendo que os altos níveis de AMPc são responsáveis pela manutenção do oócido estacionado em prófase I (SCHULTZ; MONTGOMERY; BELANOFF, 1983). Com o sinal do LH, o nível intracelular de AMPc diminui no oócito enquanto aumenta nas células do *cumulus* (RICHARDS, 1994), promovendo a retomada da meiose I e o início da maturação oocitária.

A inibição da secreção de LH ou a inativação dos receptores de LH resultam na prevenção da maturação oocitária e da ovulação. O fato de que não são encontrados receptores de LH nos oócitos mostra a importância na transmissão do sinal através das células foliculares. O folículo responde ao LH aumentando a produção de progesterona e de ácido hialurônico, responsável pela mucificação e expansão das células do *cumulus*. Há uma diminuição do contato oócito-*cumulus* pelas junções *gap* através de uma retração das projeções citoplasmáticas transzonais, anteriormente à quebra da VG (PICTON; BRIGGS; GOSDEN, 1998).

A maturação nuclear compreende as modificações nucleares que ocorrem durante a retomada da meiose, produzindo um único complemento cromossômico, ou seja, uma célula haploide de uma prévia célula diploide. A maturação inicia com a retomada a meiose I, sendo dividida nas seguintes fases: prófase, anáfase e telófase. Ao iniciarem a

maturação nuclear os oócitos retomam a meiose I, onde estavam em prófase. A continuidade se dá com a dissolução do envelope nuclear, ocorrendo a chamada “quebra da vesícula germinativa”, ou do inglês “*germinal vesicle breakdown*” (GVBD), seguida da condensação da cromatina e o alinhamento dos pares de cromossomos homólogos no fuso meiótico da fase metáfase I. Posteriormente, nas fases de anáfase a telófase, há a segregação dos cromossomos homólogos, sendo completada com a extrusão do primeiro CP e o início da metáfase II (MII). Portanto, a maturação nuclear é considerada completa quando o oócito já expulsou o primeiro CP e encontra-se em MII. Em humanos, a meiose II só será finalizada após a fertilização, com a extrusão do segundo CP (GRØNDAHL, 2008). A primeira divisão meiótica no oócito é particularmente um ponto importante no desenvolvimento oocitário. Quando as divisões ocorrem corretamente, há uma grande chance de ser produzido um oócito normal maturo (MII) que pode ser fertilizado e se desenvolverá normalmente. Entretanto, caso haja algum erro na divisão meiótica I, provavelmente haverá a formação de um embrião aneuploide que pode ser incapaz de completar o seu desenvolvimento ou pode gerar um indivíduo com alteração cromossômica (GRØNDAHL, 2008).

A maturação citoplasmática que ocorre durante a fase de crescimento oocitário compreende a migração de organelas e mudanças moleculares para tornar o oócito apto a retomar a meiose. A aquisição da competência meiótica envolve a síntese e a estocagem de uma vasta gama de moléculas durante a fase de crescimento, a relocação de organelas citoplasmáticas e modificações pós-transcricionais do RNAm acumulado durante a oogênese (GRØNDAHL, 2008). A maturação citoplasmática é descrita como essencial para a fertilização e a competência embrionária pré-implantacional (GILCHRIST; LANE; THOMPSON, 2008).

Na rotina clínica, os oócitos são separados das células do *cumulus* e da corona radiata para serem avaliados antes da injeção intra-citoplasmática de espermatozoide (ICSI). Esta avaliação leva em consideração somente o estado da maturação nuclear, observando a presença da VG ou do 1º. (primeiro) CP. O oócito é considerado maturo e apto para realização da ICSI caso o 1º. CP seja observado, sendo então chamado de MII. Aqueles oócito em que não é visualizada a VG nem o 1º. CP são considerados MI, ou seja, ainda não iniciaram a meiose II. Entretanto, sabe-se que a extrusão do 1º. CP não pode ser considerada como preditiva de maturação nuclear, mas sim a observação do fuso meiótico, certificando-se que o mesmo encontra-se em metáfase II. Além disso, a

maturação citoplasmática deve ocorrer de forma completa e coordenada com a nuclear para que o oócito seja considerado apto à fertilização (RIENZI *et al.*, 2012).

### **2.3 Interação entre o oócito e as células da granulosa**

Como citado anteriormente, as células do *cumulus* apresentam projeções citoplasmáticas transzonais altamente especializadas, as quais penetram através da zona pelúcida e atingem a membrana oocitária (ALBERTINI *et al.*, 2001). As junções *gap* estão presentes no final destas projeções e são responsáveis pela transferência de moléculas de baixo peso molecular entre o oócito e as células do *cumulus*, incluindo íons, metabólitos, aminoácidos necessários para o crescimento oocitário, além de moléculas regulatórias responsáveis pelo controle do desenvolvimento oocitário (como o AMPc) (GILCHRIST; RITTER; ARMSTRONG, 2004). Este modelo de comunicação ovariana é essencial para o desenvolvimento e a fertilidade (SIMON *et al.*, 1997), tendo um importante papel na disseminação local e sinalização endócrina para o oócito. Ainda não se sabe exatamente como se dá o controle das funções destas projeções, bem como qual seria exatamente a sua função. Entretanto sabe-se que elas contêm organelas citoplasmáticas e que há uma variação estrutural durante a foliculogênese e a maturação oocitária (MOTTA *et al.*, 1994). Em folículos pré-antrais humanos as PTZs encontram-se em um número maior e formam tanto junções de adesão quanto *gap* com o oolema. Além disso, durante o período de crescimento oocitário, as PTZs formam profundas invaginações que alcançam a vesícula germinativa. Porém, após o desenvolvimento antral as PTZs são retraídas, mantendo poucas conexões terminais com o oócito. Durante a ovulação, há uma retração definitiva das PTZs, culminando com a interrupção da comunicação entre o oócito e as células foliculares (MOTTA *et al.*, 1994).

A partir da última década tornou-se claro que o oócito é o principal regulador da foliculogênese, através de uma via bi-direcional de comunicação entre as células somáticas e o oócito. Além das junções *gap*, a comunicação entre o oócito e as células do *cumulus* pode ser via sinalização parácrina (GILCHRIST; RITTER; ARMSTRONG, 2004). Os oócitos atuam primeiramente secretando fatores de crescimento solúveis (conhecidos genericamente como fatores secretados pelos oócitos - FSOs), os quais pertencem à superfamília dos fatores de transformação do crescimento (TGF $\beta$ ), onde o fator de crescimento diferenciado 9 (GDF 9) e a proteína óssea morfogenética 15 (BMP



15) parecem ser os mais importantes. Dois estudos de referência mostraram que a ausência destes dois fatores de crescimento oócito-específico pode causar esterilidade (DONG *et al.*, 1996; GALLOWAY *et al.*, 2000). Estas moléculas são reguladores centrais da diferenciação das células da granulosa e do *cumulus*, podendo ter potenciais contraceptivos e serem associados com a patogênese da disfunção ovariana (GILCHRIST; RITTER; ARMSTRONG, 2004).

## 2.4 Maturação *in vitro* de oócitos humanos

O processo de maturação *in vitro* (MIV) de oócitos é uma tecnologia que torna possível maturar oócitos no laboratório utilizando ciclos sem estimulação com gonadotrofinas ou com uma baixa dose hormonal (EDWARDS, 1965). Existe uma demanda em potencial para a realização da MIV nos centros de reprodução assistida, sendo uma possibilidade de preservação da fertilidade feminina, através da estocagem de oócitos imaturos e posterior fertilização, além de beneficiar pacientes com risco de hiperestímulo (YEO, 2010). Segundo Demirtas *et al.* (2008), esta seria uma alternativa para pacientes com câncer, que poderiam criopreservar os oócitos imaturos, sem passar pela estimulação hormonal e sem cessar o seu tratamento quimioterápico.

O primeiro nascimento de um bebê proveniente de um oócito doado maturado *in vitro* foi relatado por Cha *et al.* (1991), enquanto no Brasil o primeiro sucesso de MIV ocorreu em 2008 (FRANTZ *et al.*, 2008). Quase duas décadas se passaram e a eficiência das técnicas de MIV, em termos de gestação e nascimentos, ainda são pouco satisfatórias comparadas à fertilização *in vitro* tradicional, onde os oócitos são maturados *in vivo* (BANWELL; THOMPSON, 2008). Em geral, as taxas de implantação de embriões gerados a partir de oócitos provenientes de MIV, raramente excedem 7-15% e apresentam altas taxas de aborto (CHIAN, 2004; LIN *et al.*, 2003; SMITZ *et al.*, 2011).

Tem sido sugerido que este fator se deve à comprometida capacidade de desenvolvimento ou à citogenética dos embriões originados de oócitos maturados *in vitro*, embora as taxas de maturação nuclear, fertilização e clivagem após a MIV sejam geralmente satisfatórias (NOGUEIRA *et al.*, 2000). Segundo Gilchrist *et al.* (2008) as baixas taxas de gestação a partir de oócitos maturados *in vitro* se devem principalmente à baixa qualidade oocitária ao término da maturação, uma vez que estes oócitos

apresentam uma maior incidência de fertilizações anômalas (aneuploidias e poliploidias) comparado aos maturados *in vivo* após a ICSI. Os autores sugerem que este fato ocorre devido às anormalidades no citoesqueleto, possivelmente causada pela manipulação ou por uma maturação citoplasmática incompleta (BOS-MIKICH *et al.*, 2011).

A maioria das pesquisas com MIV em humanos têm utilizado oócitos imaturos desprovidos das células do *cumulus*, que foram obtidos em protocolos com estimulação ovariana por gonadotrofinas (CHA; CHIAN, 1998; TROUNSON; ANDERIESZ; JONES, 2001). Segundo Combellese *et al.* (2002), estes oócitos desnudos exibem uma acelerada retomada da meiose *in vitro*, uma deficiência na habilidade citoplasmática em manter as características da metáfase enquanto a meiose progride, uma propensão em ativar espontaneamente depois da metáfase e uma falha na coordenação entre a maturação citoplasmática e nuclear. O que contribui para que estes fenômenos ocorram ainda não é conhecido, mas pode ser relacionado com a falta da interdependência do oócito e das células do *cumulus* para seu desenvolvimento (EPPIG, 1991).

## 2.5 O sistema IGF

O sistema do IGF é composto por dois ligantes (IGF-1 e 2), dois receptores (IGF-1R e 2R) e por proteínas ligantes ao IGF (IGFBP) (GENC *et al.*, 2011). O receptor de IGF-1 é uma tirosina quinase transmembrana com alta homologia ao receptor da insulina, sendo composto por duas subunidades extracelulares ( $\alpha$  e  $\beta$ ), que consiste em duas subunidades transmembrana e duas citoplasmáticas (YOSHIMURA, 1998). O receptor tipo 1 é o mediador da maioria das ações tanto do IGF-1 quanto do IGF-2. A afinidade do IGF-1R é superior ao IGF-1 comparada ao IGF-2, porém é também alta à insulina. Os efeitos do IGF-2 são provavelmente mediados pelo IGF-1R. O receptor tipo 2 liga o IGF-2 com maior afinidade que liga o IGF-1 e não se liga à insulina. Portanto, é provável que o receptor do IGF-2 não seja o responsável por mediar as ações do IGF-1 *in vivo* (IZADYAR; ZEINSTRA; BEVERS, 1998).

Geisthovel *et al.* (1989) reportaram que o IGF-2, ao contrário do IGF-1, é expresso em células da granulosa humanas, coletadas imediatamente antes da ovulação. De acordo com el-Roeiy *et al.* (1993), em folículos dominantes humanos, o IGF-2 é expresso em abundância exclusivamente nas células da granulosa, enquanto o gene do

IGF-2R é expresso tanto nas células da teca quanto da granulosa. Em humanos, os folículos antrais pequenos expressam tanto o IGF-1 quanto o 2, porém o IGF-2 é restrito as células da teca. Este fato deixa claro que estes fatores atuam de forma autócrina nas células da teca e de forma parácrina nas células da granulosa. Segundo Hernandez *et al.* (1992), não foi encontrada expressão do IGF-1 em células da granulosa luteinizadas humanas, porém foi constatado que o IGF-2 é expresso no corpo lúteo. Além disso, culturas celulares de células da granulosa humana produzem IGF-1 *in vitro* (SIROTKIN *et al.*, 1996).

Os receptores de IGF-1 podem ser encontrados nas células da granulosa de mulheres submetidas à FIV, mostrando que a regulação da foliculogênese se deve a essa interação do IGF-1 com as gonadotrofinas e as células da granulosa (WEI; ZHANG; LI, 1997). Qu *et al.* (2000), observaram por imunohistoquímica a presença de receptores de IGF-1 tanto nos oócitos quanto em células da granulosa independente do estágio folicular em humanos. Os mesmos autores observaram que o IGF-1R está presente também em células da teca de folículos pré-antrais e antrais. Recentemente, Yu *et al.* (2012) também mostraram a presença de receptores para IGF-1 tanto nas células do *cumulus* quanto nos oócitos humanos submetidos à MIV. Neste mesmo estudo, os autores concluíram que possivelmente as células do *cumulus* e da granulosa secretam IGF-1 que atua de forma autócrina nestas células e de forma parácrina nos oócitos. Em primatas não humanos, a expressão do IGF-1 tem sido mostrada em oócitos provenientes de folículos primordiais em diante, enquanto que o IGF-1R foi detectado em todos oócitos, inclusive aqueles de folículos primordiais (ZHOU; BONDY, 1993; VENDOLA *et al.*, 1999). Segundo el-Roeiye *et al.* (1993), não há expressão de IGF-1 em folículos dominantes humanos, tanto nas células da teca quanto da granulosa, mas o IGF-1R é expresso nas células da granulosa.

A biodisponibilidade do IGF é regulada pela família das proteínas intrafoliculares ligantes (IGFBPs), as quais se ligam ao IGF 1 e 2 com alta afinidade, inibindo-os ou potencializando-os. As IGFBPs (IGFBP de 1 a 6) estão presentes em todos os fluidos biológicos, sendo que a IGFBP 3 é a predominante encontrada no plasma (GENC *et al.*, 2011). Segundo o mesmo autor, a concentração da IGFBP 3 é regulada positivamente pelo hormônio de crescimento (GH), ao contrário das IGFBP 1 e 2. Estas proteínas podem inibir a ação do IGF por seqüestro, desde que a afinidade das IGFBPs ao IGF seja da mesma magnitude que a do receptor do tipo 1. Devido ao fato destas proteínas

ligantes aumentarem a biodisponibilidade dos IGFs através da diminuição da sua afinidade pelos IGFs, podem levar a uma potencialização na ação do ligante, ao invés de uma inibição (MONGET *et al.*, 2002).

A concentração de IGFBPs tem quatro funções essenciais na regulação das atividades do IGF: (1) atuam como transportadores de proteínas no plasma, (2) prolongam a meia-vida dos IGFs por regular o seu metabolismo de depuração, (3) proporcionam e conferem especificidade, (4) modulam diretamente a interação com os receptores de IGFs, controlando indiretamente as suas biorreatividades (SILVA; FIGUEIREDO; VAN DEN HURK, 2009; PORETSKY *et al.*, 1999).

Adicionalmente, em macacos, há uma maior concentração de IGFBP-1 nas células da teca intersticiais e a IGFBP-2 é expressa na superfície do epitélio ovariano de folículos antrais e não antrais. O RNAm para IGFBP-3 é também localizado em oócitos de ambos os estágios foliculares e no endotélio vascular ovariano. As células da granulosa e da teca de folículos dominantes maduros e ovulatórios seletivamente expressam IGFBP-5. O RNAm para IGFBP-6 está presente em baixos níveis no interstício ovariano, na granulosa e teca externa, e é mais abundante na superfície do epitélio ovariano (ARRAZTOA *et al.*, 2002).

### 2.5.1 A importância do sistema IGF para a foliculogênese

O envolvimento do sistema IGF como um regulador intra-ovariano da foliculogênese vem sendo estudado extensivamente, elucidando que o ovário é o sítio de expressão de IGF-1 e da sua recepção (ADASHI, 1998). Embora os níveis de IGF-1 e 2 não variem durante o ciclo menstrual, mudanças nas suas concentrações no fluido folicular têm sido reportadas.

Os efeitos do IGF na transição de folículos primordiais para primários têm sido reportados de maneira diferente entre as espécies de mamíferos. Em macacos Rhesus, o IGF-1 e seu receptor, podem estar envolvidos nesta transição enquanto o mesmo não foi comprovado para bovinos e ratos (MUÑOZ-GUTIÉRREZ *et al.*, 2005; ADASHI, 1998; ARMSTRONG *et al.*, 2002). Segundo Stubbs *et al.* (2003) o IGF-1 tem um efeito estimulatório no crescimento de folículos primordiais humanos *in vitro*, mostrando ser um fator importante do crescimento folicular inicial. O IGF-1 tem sido considerado um modulador local da foliculogênese inicial em bovinos, ratos e cabras, onde *in vitro*, o

IGF-1 aumentou o desenvolvimento de folículos secundários, sendo este efeito dose-dependente (ZHOU; ZHANG, 2005; THOMAS *et al.*, 2007; ZHAO *et al.*, 2001; ZHAO *et al.*, 2002).

O IGF-1 age localmente em sinergismo com o FSH estimulando a atividade da aromatase, a produção de  $17\beta$ -estradiol e de progesterona nas células da granulosa humanas em folículos antrais, além de promover a produção de andrógenos nas células da teca de folículos dominantes em crescimento (GENC *et al.*, 2011). Zhou *et al.* (1997) sugeriram que o efeito sinérgico com o FSH, se deve ao fato de que a expressão intra-ovariana de IGF-1 aumenta a expressão dos receptores de FSH, aumentando também a resposta das células da granulosa a este hormônio. Além disso, em ratos, a expressão dos receptores de LH nas células da teca e granulosa tem sido estimulada pelo IGF-1 (MAGOFFIN; WEITSMAN, 1994; TSUCHIYA *et al.*, 1999). Em folículos subordinados o IGF-1 é seqüestrado pela IGFBP-4, inibindo a esteroidogênese e ocasionando a atresia (revisado por SILVA; FIGUEIREDO; VAN DEN HURK, 2009). Segundo alguns autores, o aumento da concentração de IGF-1 pode modificar a regulação da foliculogênese através das seguintes ações: a ativação e o desenvolvimento de folículos pré-antrais, a manutenção de um maior número de pequenos folículos antrais, o recrutamento de mais folículos e a seleção de dois ou mais folículos dominantes em uma onda folicular (SILVA; FIGUEIREDO; VAN DEN HURK, 2009).

O FSH e o sistema IGF atuam juntos para regular a produção de  $17\beta$ -estradiol e progesterona em células da granulosa de diversas espécies, incluindo roedores (ADASHI *et al.*, 1985) suínos (MARUOT *et al.*, 1988) e bovinos (SPICER *et al.*, 2002). Esta conservação através das espécies mostra a importância das interações entre o FSH e o IGF na diferenciação destas células. Estudos anteriores demonstraram que os IGFs poderão funcionar em sinergia com FSH para estimular a atividade da aromatase (CYP19A1) (ERICKSON *et al.*; 1989), a produção de progesterona (ERICKSON *et al.*; 1991) e a secreção de inibina B (WELT; SCHNEYER, 2001) em seres humanos; no entanto, os mecanismos subjacentes a esta relação sinérgica não foram exploradas.

Além disso, utilizando células da granulosa de ratos, foi demonstrado que o FSH não foi capaz de estimular a expressão da enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol (CYP11A1), da CYP19A1 e a produção de  $17\beta$ -estradiol quando o receptor do IGF-1 (IGF-1R) foi inibido (ZHOU *et al.*, 2013). Em humanos e ratos, foi sugerido

que é necessário que o IGF-1R seja ativado para que ocorra a ativação da proteína quinase AKT (do inglês, murine thymoma viral oncogene homolog 1) induzida pelo FSH e subsequente diferenciação das células da granulosa pré-ovulatórias (ZELEZNIK *et al.*, 2003; BAUMGARTEN *et al.*, 2014). Na presença de um inibidor da atividade do IGF-1R, o FSH foi incapaz de estimular a expressão de genes e produção esteroidogênicas de 17 $\beta$ -estradiol, que são essenciais para o funcionamento das células da granulosa murais pré-ovulatórias. Estes resultados proporcionam um possível mecanismo para explicar o efeito inibitório de proteínas de ligação ao IGF-1 ou anticorpos anti-IGF-1R na esteroidogênese induzida por FSH em seres humanos (YUAN E GIUDICE, 1999; WILLIS *et al.*, 1998). No entanto, os mecanismos moleculares envolvidos na integração de IGF-1R e na sinalização do FSHR não são conhecidos.

O sistema IGF prepara o folículo dominante para a redução de FSH e o aumento do LH disponível como mostra o trabalho feito por Hastie e Heresing (2008). Segundo os autores, o tratamento de ovelhas com GnRH aumentou a expressão de mRNA para IGF-1, IGF-2, e IGF-2R em folículos antrais, e diminuiu a expressão de mRNA para IGF-1R. Estes resultados mostram o papel do FSH e do LH endógenos na regulação da expressão do gene ligante e do receptor de IGF no folículo ovino. As IGFBPs são inibitórias no crescimento e diferenciação folicular induzido pelas gonatotrofinas, além de inibir a ação dos IGFs nas células alvo (SPICER; ECHTERNKAMP, 1995). Portanto, as mudanças intrafoliculares de IGFBPs conduzem as mudanças na biodisponibilidade de IGF e o seu efeito inibitório ou estimulatório nas ações das gonatotrofinas nas células foliculares (GENC *et al.*, 2011).

A relação entre a dinâmica folicular e o IGF-1 é evidenciada pelo fato de que a concentração de IGF-1 no fluido folicular é maior em pacientes que respondem melhor à estimulação ovariana, com um maior número de crescimento folicular resultando em um número maior de oócitos recuperados, além de necessitarem um período menor de estimulação ovariana com uma dose menor de FSH (OOSTERHUIS *et al.*, 1998). Controversamente, em um estudo recente, Genc *et al.* (2011) não encontraram correlação entre IGF-1, IGFBP3 e o número de oócitos recuperados, maturados e fertilizados.

Várias associações entre a resposta à estimulação ovariana e as anormalidades na concentração de IGF-1 e IGFBP-3 têm sido discutidas, mas não há um consenso neste

assunto (GENC *et al.*, 2011). Segundo diversos estudos, a concentração sérica de IGFBP-3 diminui no fluido folicular durante a estimulação ovariana e pode ser um fator preditivo do sucesso da FIV (AMATO *et al.*, 1998; SALOBIR *et al.*, 1996). Corroborando com este achado, Nardo *et al.* (2001) mostraram que pacientes com uma alta concentração de IGFBP-3 no líquido folicular necessitaram de uma dose maior de FSH durante a estimulação ovariana.

O IGF-1 está em uma concentração mais alta no fluido folicular de folículos com maior tamanho e maior volume de líquido folicular em relação aos menores (RABINOVICI *et al.*, 1990). Outro aspecto importante é o de que folículos dominantes apresentam uma concentração maior de IGF-1 comparado aos folículos subordinados em mulheres com ciclo normal (EDEN *et al.*, 1988). Além disso, tem sido mostrada uma forte correlação entre as concentrações de IGF-1 no fluido folicular e no plasma (GEISTHOVEL *et al.*, 1989; RABINOVICI *et al.*, 1990; HAMORI *et al.*, 1991) e ambas as concentrações diminuem com a idade reprodutiva avançada (KLEIN *et al.*, 1996).

O IGF-1 interage de forma autócrina ou parácrina com os oócitos, e a expressão de IGFR-1 pode ser encontrada em oócitos de folículos pré-antrais e antrais de bovinos e ratos (ZHAO *et al.*, 2002; ARMSTRONG *et al.*, 2002). O IGF-I mostrou-se benéfico na MIV e no desenvolvimento pré-implantacional em suínos, ratos e bovinos (DEMEESTERE *et al.*, 2004; XIA; TEKPETEY; ARMSTRONG, 1994; MAKAREVICH; MARKKULA, 2002). Recentemente, Yu *et al.* (2012) mostraram que a associação do fator de crescimento epidermal (EGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e o IGF-1 podem melhorar as taxas de maturação oocitária e a qualidade *in vitro*, e conseqüentemente ser benéfico ao desenvolvimento embrionário e à formação de blastocisto.

## **2.6 Cultura de células da granulosa**

A utilização de culturas de células da granulosa murais (CGM) é uma grande ferramenta para pesquisa sobre a fisiologia ovariana, uma vez que há uma relativa facilidade de acesso e disponibilidade destas células que são captadas do fluido folicular durante o procedimento de aspiração folicular para realização da FIV. Outro ponto fundamental, é que embora as linhagens celulares existentes sejam tecnicamente mais

fáceis de trabalhar do que as culturas primárias, sabe-se que elas podem adquirir diferentes padrões de expressão gênica e não representam as características fisiológicas das células foliculares, particularmente quando estas células são manipuladas por uma variedade de métodos incluindo co ou tripla transfecção, com oncogenes ou genes supressores de tumor (HAVELOCK *et al.*, 2004). Portanto, a cultura primária destas células é o modelo experimental mais próximo para se estudar o efeito de diversos hormônios na foliculogênese além da determinação da regulação da expressão gênica das CGMs (EDSON *et al.*, 2009; DIMATTINA *et al.*, 1986; MONGA *et al.*, 2011). Entretanto, deve-se observar com cuidado qual tipo de células mimetizam os eventos foliculares que ocorrem *in vivo* que se deseja testar no trabalho.

As células da granulosa sofrem profundas alterações morfológicas e funcionais ao longo do desenvolvimento folicular devido à complexa dinâmica do folículo, apresentando distintos graus de diferenciação de acordo com sua localização folicular, estágio de crescimento do folículo ovariano e também de acordo com a fase do ciclo menstrual (VIREQUE *et al.*, 2013). Os primeiros eventos de diferenciação das CG durante o desenvolvimento folicular incluem mobilização de colesterol (COL), reorganização do complexo de Golgi, lisossomos, gotas lipídicas e retículo endoplasmático liso e rugoso (AMSTERDAM, ROTMENSCH e BEN-ZEEV, 1989; GUTIERREZ *et al.*, 1997a; GUTIERREZ *et al.*, 1997b) os quais promovem o transporte e o armazenamento intracelular do COL para sua conversão a hormônios esteroides (AMSTERDAM, ROTMENSCH e BEN-ZEEV, 1989).

Essas mudanças ultraestruturais são acompanhadas pela expressão das enzimas CYP11A1 e CYP19A1 (XU *et al.*, 1995). Na fase final do desenvolvimento folicular, os folículos pré-antrais maturam, tornando-se folículos pré-ovulatórios, que se caracterizam pela diferenciação das células da granulosa em células murais e células do *cumulus*. O FSH juntamente com IGFs são os principais responsáveis pela diferenciação das células pré-antrais da granulosa em murais (MATSUDA *et al.*, 2012), que se encontram na parede do folículo. Após o pico de LH *in vivo*, as células murais pré-ovulatórias transformam-se em luteínicas originando o corpo lúteo. Essas células tornam-se hipertrofiadas, sofrem modificações ultraestruturais e secretam grandes quantidades de progesterona, típicas da fase lútea do ciclo (VIREQUE *et al.*, 2013).

As células da granulosa provenientes de folículos isolados são o sistema ideal para estudar o processo de diferenciação, e, de fato, este modelo experimental tem sido



utilizado extensivamente em roedores. Apesar da possibilidade de isolar folículos humanos a partir de biópsias corticais do ovário ou ooforectomia (RICE *et al.*, 2008), o acesso a este tecido é extremamente limitado. Devido à escassez de uma fonte de células granulosas indiferenciadas de folículos pré-antrais para estudo, muitos aspectos do processo de diferenciação das células da granulosa não são bem compreendidos em seres humanos (BAUMGARTEN *et al.*, 2014).

Diversos trabalhos examinaram o efeito do FSH sobre a função de células da granulosa humanas a partir do aspirado folicular recuperado durante a coleta dos oócitos para fertilização *in vitro*; portanto, esses estudos foram realizados em células da granulosa murais que sofreram previamente o estímulo pelo hCG para simulação do pico de LH e indução da maturação oocitária. Com o estímulo, elas iniciam o processo de luteinização e podem não responder da mesma forma ao FSH como as células da granulosa pré-antrais *in vivo*. A produção endócrina dessas culturas é portanto, característica da segunda fase do ciclo e não pode ser comparada à função endócrina da fase folicular. Este fato é essencial para o extrapolamento dos resultados, uma vez que se sabe que as diferentes fases de desenvolvimento folicular são caracterizadas por marcadores moleculares específicos e perfis hormonais que diferenciam folículos antrais jovens de folículos pré-ovulatórios e folículos luteinizados (OPHIR *et al.*, 2014).

Segundo diversos trabalhos, o folículo antral jovem apresenta baixa expressão do receptor do FSH (FSHR) (ABDENNEBI *et al.*, 1999; CAMP *et al.*, 1991; O'SHAUGHNESSY *et al.*, 1996; WEIL *et al.*, 1999), do receptor de LH (LHR) (ABDENNEBI *et al.*, 1999; CAMP *et al.*, 1991), da enzima CYP11A1 (OONK *et al.*, 1990), da CYP19A1, amfirregulina (AREG) e epiregulina (EREG), (ASHKENAZI *et al.*, 2005; ZAMAH *et al.*, 2010). O aumento da secreção hipofisária de FSH no decorrer do crescimento folicular para o estágio pré-ovulatório leva à preparação do folículo para o pico de LH (CAMP *et al.*, 1991; HILLIER, 2001; HSUEH *et al.*, 2000), através de um aumento na expressão do FSHR e LHR (ASHKENAZI *et al.*, 2005; ZAMAH *et al.*, 2010) com um aumento concomitante na expressão das enzimas CYP11A1 (OONK *et al.*, 1990) e CYP19A1 (CLEMENT e MONNIAUX, 2012; KAWAI *et al.*, 2012; NAGASHIMA *et al.*, 2011)

Após a luteinização, o perfil gênico é alterado com a finalidade de promover a síntese e secreção de progesterona, através da tradução dos genes da amfirregulina (AREG) e epirregulina (EREG) (ZAMAH *et al.*, 2010; CLEMENT e MONNIAUX,

2012; CONTI *et al.*, 2006; SU *et al.*, 2010). A produção endócrina dessas culturas, portanto, é característica da segunda fase do ciclo e não pode ser comparada à função endócrina da fase folicular.

Por outro lado, as células do *cumulus oophorus*, que rodeiam o oócito no folículo pré-ovulatório recebem a influência dos fatores secretados pelo oócito, que por sua vez atuam diminuindo os efeitos do FSH e IGF e prevenindo a diferenciação destas células (DIAZ *et al.*, 2007). Este fato tem sido comprovado por diversos trabalhos que mostram que a presença do oócito diminui a expressão de LHR nas células do *cumulus*, além de diminuir a expressão dos marcadores de diferenciação, como das enzimas CYP19A1, CYP11A1 e da proteína Star (EPPIG *et al.*, 1997; DIAZ *et al.*, 2007; BAUMGARTEN *et al.*, 2014) necessárias para a síntese de progesterona que caracteriza o estado de luteinização. Baumgarten *et al.* (2014) demonstram que diferentemente das células murais, as células do *cumulus* humanas não se encontram em estado luteínico no momento da coleta folicular, após a exposição ao HCG exógeno. Além disso, eles demonstraram que os níveis de expressão do hormônio anti-mulheriano (AMH), o qual é maior em folículos pequenos e pré-antrais e reduzida em folículos pré-ovulatórios, é mantida em níveis mais altos nas células do *cumulus* que nas células murais de folículos pré-ovulatórios.

Um ponto interessante é que esta influência mediada primariamente pelos fatores secretados pelo oócito (dentre eles o GDF-9 e o BMP-15) de impedir a diferenciação das células do *cumulus*, não é dependente de contato íntimo com o oócito (OTSUKA *et al.*, 2001). Este dado foi confirmado em células do *cumulus* humanas que, mesmo em cultivo sem o oócito, se mantiveram indiferenciadas, onde foram capazes de responder *in vitro* ao FSH com um aumento na expressão dos marcadores de diferenciação e com um aumento na produção de 17 $\beta$ -estradiol, enquanto que as células murais não responderam (BAUMGARTEN *et al.*, 2014).

Portanto, as células do *cumulus*, bem como a sua cultura, têm sido consideradas um modelo experimental fisiologicamente relevante quando o objetivo é estudar a diferenciação de células da granulosa humana, pois se comportam como células da granulosa de folículos pré-antrais jovens (BAUMGARTEN *et al.*, 2014). Portanto, em estudos que envolvem as etapas iniciais do desenvolvimento folicular, como a interação entre as gonadotrofinas e IGFs, as células do *cumulus* seriam um modelo experimental mais fisiológico. O perfil esteroidogênico varia conforme o grau de diferenciação das

células, portanto, o processo de luteinização pode ser monitorado através da mensuração da produção de  $17\beta$ -estradiol e progesterona. Culturas de células da granulosa com uma relação  $17\beta$ -estradiol/progesterona aumentada sugerem células menos diferenciadas, mais similares às células de folículos pré-antrais.

## 2.7 Transporte de aminoácidos

O transporte de aminoácidos para o meio intra e extracelular é importante para a manutenção da homeostase, uma vez que desempenham diversos papéis no organismo. Existem diversos transportadores de aminoácidos específicos para garantir um aporte adequado para as células (CASTAGNA *et al.*, 1997), dentre eles o sistema A, o Sistema ASC, o sistema L e o sistema N.

Diversos sistemas de transporte de aminoácidos têm sido descritos em oócitos e embriões, dentre eles um sistema independente de sódio (sistema L), e um dependente de sódio (sistema A). O sistema A é sensível ao pH e reconhece os aminoácidos N-metilados, como o ácido metilaminoisobutírico (MeAIB), um análogo não metabolizável da alanina amplamente utilizado para o estudo destes sistemas (BARKER; ELLORY, 1990). Ambos os sistemas operam no oócito após a ovulação, onde a captação e a transferência de aminoácidos não-polares são mediadas via células da granulosa e as junções *gap* por cooperação metabólica (COLONNA *et al.*, 1984; EPPIG *et al.*, 2005). Os aminoácidos, como a glicina, a alanina, a prolina, a histidina e a serina, podem também ser transportados pelo próprio oócito, entretanto, têm o seu transporte aumentado na presença das células do *cumulus* (COLONNA; MANGIA, 1983; EPPIG *et al.*, 2005; HAGHIGHAT; VAN WINKLE, 1990).

O sistema de transportadores dependentes de sódio são altamente sensíveis a variações no pH. Um exemplo deste transportador é o gene *Slc38a3*, descrito por Eppig *et al.* (2005). Este gene está presente somente nas células do *cumulus* e os seus substratos (histidina e alanina) são acumulados pelos oócitos em altas taxas quando se encontram com as células do *cumulus*. Neste mesmo trabalho, os autores sugerem que os fatores parácrinos secretados pelos oócitos desempenham um papel importante na captação de L-alanina e L-histidina pelas células do *cumulus*. Para tanto, o transporte destes aminoácidos nas células do *cumulus* foi drasticamente estimulado através do co-

cultivo com oócitos desnudos quando comparado ao transporte das células em cultivo separadamente.

Por outro lado, a cooperação metabólica somente se torna aparente para aminoácidos como a valina, a leucina e a fenilalanina quando a concentração aumenta 5 a 10 vezes acima dos níveis plasmáticos (CHAND; LEGGE, 2011). Colonna *et al.* (1984; 1983) mostraram que os canais das junções comunicantes entre as células da granulosa e o oócito transferem a maioria dos aminoácidos através da membrana, com o mesmo fator de permeabilidade (exceto a fenilalanina, a leucina e a valina) e são considerados por Eppig *et al.* (2005), dependentes do sistema de transporte de aminoácidos oócito-células da granulosa.

Segundo Collona *et al.* (1983) a captação de leucina pelos oócitos VG tem características do sistema L, enquanto o transporte da alanina se deve pelo sistema L e pela atividade do sistema ASC. Segundo Colonna *et al.* (1984), a atividade do sistema L diminui quando os oócitos passam de VG para MII. Os trabalhos que relacionaram o estágio oocitário ao transporte de aminoácidos mostraram que a captação de leucina, alanina e glicina, cujos transportes são atribuídos aos sistemas L, ASC e GLY respectivamente, estão presentes em oócitos em crescimento de médio diâmetro (COLONNA; MANGIA, 1983; HAGHIGHAT; VAN WINKLE, 1990). Já a atividade do sistema L foi reportada em oócitos com diâmetro pequeno (COLONNA *et al.*, 1983). Segundo Pelland *et al.* (2009) os sistemas de transporte de aminoácidos L, b0,+ e ASC/asc estão ativos durante o crescimento e a maturação oocitária, aumentando durante a fase de crescimento. O mesmo estudo mostrou que a presença das células foliculares circundando os oócitos em VG, ou de tamanho médio no estágio de crescimento, não apresentaram sistemas de transporte de aminoácidos diferentes daqueles encontrados nos oócitos desnudos. Entretanto, a presença das células foliculares aumentou a taxa de captação nos oócitos, principalmente de glicina, alanina e taurina, utilizando o mesmo transportador que os oócitos desnudos.

Como se sabe que o transporte de aminoácidos é essencial para a maturação e crescimento oocitário, a utilização de marcadores para avaliar esse transporte é uma técnica simples, porém muito útil. Portando, uma vez que o MeAIB é um análogo não metabolizável da alanina marcado radioativamente, esta molécula pode servir de marcador para avaliar e quantificar este sistema de transporte através da membrana em vários tecidos. A atividade dos transportadores de aminoácidos do sistema A (o qual o

MeAIB é transportado) (especialmente da isoforma SNAT2) pode ser modulada a partir de estímulos, como a adaptação à disponibilidade de aminoácidos, choque osmótico e estímulos hormonais (HYDE *et al.*, 2002). Em células de Sertoli de ratos, por exemplo, o efeito estimulatório do FSH no transporte de aminoácidos não-metabolizáveis  $\alpha$ -aminoisobutírico [ $^{14}\text{C}$ ]MeAIB tem sido amplamente descrito (PÉREZ-SÁNCHEZ; WASSERMANN, 1981). Segundo Wassermann *et al.* (1992), o FSH estimula o aumento do cálcio intracelular, sendo o aumento do transporte de aminoácidos dependente deste processo.

Chand e Legge (2011) mostraram que o IGF-1 estimula a captação de L-Leucina pelo Sistema L em folículos inteiros de ratos, porém esse transporte aumenta até a fase antral tardia, diminuído em folículos pré-ovulatórios. Segundo os mesmos autores, este efeito pode ser explicado pelo fato de que uma maior quantidade de aminoácido se faz necessária quando o oócito está em crescimento e as células do *cumulus* estão proliferando, fato que não é observado próximo à ovulação. Hillensjo *et al.* (1992), utilizando células da granulosa luteinizadas humanas, mostraram que o IGF-1 estimula a captação de [ $^{14}\text{C}$ ]MeAIB e aumenta a proliferação das células da granulosa. Do mesmo modo, Jacobus *et al.* (2010) demonstraram que o transporte de [ $^{14}\text{C}$ ]MeAIB é estimulado pelo IGF-1 em células de Sertoli imaturas de ratos.

Desta forma, a execução deste trabalho auxiliou o entendimento dos eventos moleculares que ocorrem entre o IGF-1 e o FSH na esteroidogênese e nos mecanismos de transportes de aminoácido, contribuindo para que sistemas mais eficazes de MIV possam ser desenvolvidos. Em analogia aos avanços nos meios de cultivo de embriões, seria de extrema importância para os oócitos o aprimoramento dos meios de maturação, acrescidos de aminoácidos específicos para cada estágio de desenvolvimento (PELLAND; CORBETT; BALTZ, 2009). A introdução da técnica de MIV na reprodução humana assistida representa uma importante alternativa para pacientes com risco de hiperestímulo, por exemplo, uma vez que a paciente não será submetida aos protocolos com gonadotrofinas exógenas. O oócito é a única célula altamente especializada para criar, ativar e controlar o genoma embrionário, além de servir de suporte para os processos celulares básicos, como a homeostase, o metabolismo e a progressão do ciclo celular no embrião jovem. Portanto é de extrema importância melhorar e promover a qualidade do oócito maturado *in vitro*, possibilitando a reprogramação espermática e o posterior sucesso do programa de reprodução (YU *et al.*,

2012).

A importância das células do cumulus e da sua interação com o oócito vem sendo reportada, mostrando-se ser fundamental para a regulação da foliculogênese e oogênese através de uma via de trocas bi-direcional. Entretanto, a maioria dos trabalhos que elucidam a interação entre o FSH e o IGF-1 em humanos utiliza as células da granulosa mural e não as do *cumulus*, sendo que estes resultados não podem ser extrapolados para sistemas de maturação onde o oócito encontra-se envolto pelas células do cumulus. Dentre os fatores de crescimento que modulam a foliculogênese, sabe-se que o IGF-1 atua sinergicamente no ovário com o FSH e, dentre outras funções, estimula o transporte de aminoácidos em folículos de ratas permitindo um melhor aporte para o crescimento e a maturação oocitária. O mesmo efeito tem sido descrito em células de Sertoli de ratos. Embora diversos trabalhos mostrem similaridades entre espécies em relação às funções dos fatores parácrinos e autócrinos na regulação fisiologia folicular, inúmeras divergências têm sido reportadas. Como visto na revisão bibliográfica, a maioria dos trabalhos que elucidam o transporte de aminoácido foram realizados em ratas, exceto o trabalho desenvolvido por Hillensjo *et al.* (1992). O que mostra a necessidade de melhor compreender estes mecanismos em células humanas.

Cabe salientar que estas células utilizadas são normalmente descartadas na rotina clínica para se realizar a ICSI, o que as torna um excelente modelo de pesquisa, uma vez que a sua utilização não implicaria em nenhum prejuízo para as pacientes e para a clínica de reprodução.

### 3 HIPÓTESES

O FSH altera o transporte de [<sup>14</sup>C]MeAIB em células do *cumulus* humanas cultivadas *in vitro*. O cultivo prévio das células do *cumulus* humanos com IGF-1 também é capaz de alterar a taxa de transporte deste aminoácido análogo não metabolizável da alanina.

O FSH altera a esteroidogênese quando adicionado ao meio de cultivo das células do *cumulus*, aumentando a produção de 17β-estradiol. A adição de IGF-1 sozinho ao meio de cultivo não é capaz de alterar a esteroidogênese, porém a adição dos hormônios concomitantemente provoca um efeito somatório na produção de 17β-estradiol.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do FSH e IGF-1 no transporte de [ $^{14}\text{C}$ ]MeAIB e na produção de 17 $\beta$ -estradiol em células do *cumulus* humanas em cultivo.

### 4.2 Objetivos específicos

- Avaliar a captação basal de [ $^{14}\text{C}$ ]MeAIB nas células do *cumulus* humanas e comparar com a exposição ao FSH;
- Avaliar se o cultivo prévio das células do *cumulus* com o IGF-I altera o transporte de [ $^{14}\text{C}$ ]MeAIB estimulado pelo FSH;
- Avaliar a influência da adição de FSH, IGF-1 ou ambos os hormônios ao meio de cultura das células do cumulus na produção de 17 $\beta$ -estradiol;
- Observar se existe uma correlação entre o número de oócitos MII (maturados) colhidos e a idade das pacientes com a captação basal de [ $^{14}\text{C}$ ]MeAIB e os níveis de 17 $\beta$ -estradiol.



## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Obtenção e cultivo das células do *cumulus*

O presente projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFRGS, cujo número do parecer de aprovação é 797.095.

Foram utilizados as células do *cumulus* humanas provenientes da Clínica ProSer, Fertilidade e Reprodução Assistida situada na cidade de Porto Alegre – RS, conveniada com esta Universidade, cujo o número do convênio é 23078013898/12-11 (como termo aditivo de nº 23078.020650/12-16).

Durante o período de realização da parte experimental deste trabalho, todas as pacientes que procuraram a Clínica ProSer para a realização de coleta oocitária para realização de fecundação *in vitro* foram convidadas pelo seu médico a participar deste trabalho. As pacientes que concordaram em participar, assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1), sendo que o mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética desta Universidade. O termo foi explicado e fornecido pelo médico clínico responsável da paciente antes de iniciar a indução ovariana. Foram realizadas reuniões semanais com as pacientes para esclarecer possíveis dúvidas que elas poderiam ter.

Todas as pacientes que doaram as células do *cumulus* para a realização deste trabalho se enquadraram em todos os itens abaixo:

- 1) Apresentaram idade entre 20 e 39 anos;
- 2) Concordaram em participar da pesquisa (através da assinatura do consentimento livre e esclarecido);
- 3) Obtiveram no mínimo cinco oócitos maduros recuperados durante o procedimento.

A coleta dos COCs foi realizada por punção folicular guiada por ultrassom, aproximadamente 35 horas após a administração do hCG. Após a coleta, os COCs permaneceram em incubadora (37°C, atmosfera com 5,5% de CO<sub>2</sub>) por aproximadamente 2h. A maior parte das células do *cumulus* foram isoladas dos oócitos quimicamente com a adição de 80IU Hialuronidase (Hyaluronidase, Global Life®, Guilford, USA) em meio HTF-Hepes (Human Tubal Fluid Modified, Irvine Scientific®, Santa Ana, USA) acrescido de 10% de Soro Sintético (SSS, Life Global®,

Guilford, USA). O restante das células que permaneceram foi retirado mecanicamente por consecutivas pipetagens.

Posteriormente, foi realizada a coloração para avaliação da viabilidade e concentração celular pelo método de exclusão do Azul de Trypan (Trypan Blue Solution, Sigma-Aldrich®, St. Louise, USA). Uma alíquota de 20µL com suspensão celular foi diluída (1:1) em solução de 0.4% de Azul de Trypan (Trypan Blue Solution, Sigma-Aldrich®, St. Louise, USA) e analisada em câmara de Neubauer. De acordo com os princípios da técnica, as células mortas mostram-se coradas pelo Azul de Trypan, enquanto as células vivas permanecem não coradas, com aspecto refringente à visualização em microscópio óptico. A viabilidade foi estimada dividindo-se o número de células viáveis pelo número total de células.

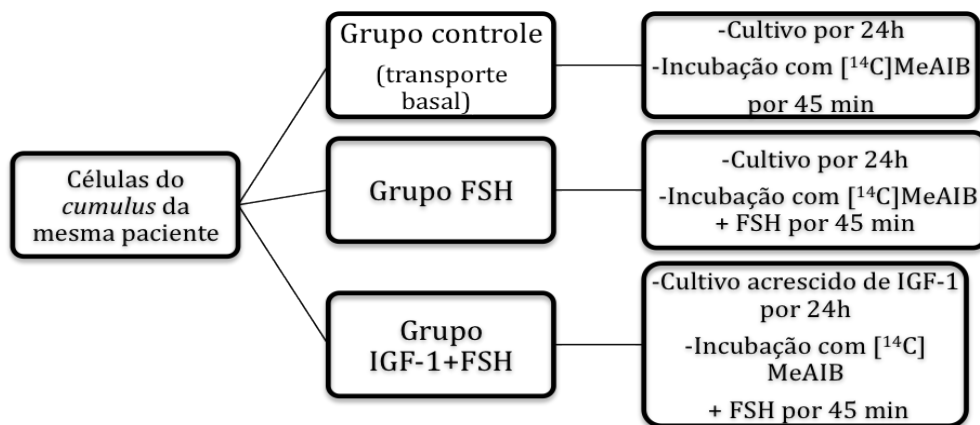
Para o cultivo celular, foi utilizado placas de 24 poços (Costar®, Corning, NY, USA) com 0,5 mL de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose, Gibco®, Auckland, NZ) acrescido de 10% de soro fetal bovino (Fetal Bovine Serum, Gibco®, Auckland, NZ) e 1% de penicilina/estreptomicina (Penicilin Streptomycin, Gibco®, Auckland, NZ). A concentração final das células semeadas foi de  $5 \times 10^4$  células/poço. Todas as amostras de células utilizadas apresentaram viabilidade maior ou igual à 80%. Para ambos experimentos realizados as células foram cultivadas em incubadora (37°C, atmosfera com 5,5% de CO<sub>2</sub>) por 24h antes dos tratamentos específicos de cada grupo.

## 5.2 Transporte de aminoácido

Para este experimento as células de uma mesma paciente foram divididas em 3 grupos experimentais: 1) grupo controle; 2) grupo FSH e 3) grupo IGF-1+FSH. Todos os grupos foram inicialmente cultivados por 24h. Após este período o meio de cultivo foi trocado por DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose, Gibco®, Auckland, NZ) previamente equilibrado em incubadora (37°C, atmosfera com 5,5% de CO<sub>2</sub>), sendo que o grupo IGF-1+ FSH foi cultivado com a adição de 25ng/mL de IGF-1 (IGF-1, Sigma-Aldrich®, St. Louise, USA) ao meio de cultivo.

Posteriormente, os grupos com as células em cultivo foram incubados à 37°C por 45 min em meio HBSS acrescido de 0,2 µCi/mL de ácido α-metilaminoisobutírico [<sup>14</sup>C]: ([<sup>14</sup>C]MeAIB; PerkinElmer NEN® Radiochemicals, Waltham, USA) por amostra.

Os grupos FSH e IGF-1+FSH tiveram 75 mIU/ml de FSH (Puregon®, Merck/Schering-Plough, North Wales, USA) adicionado no meio de incubação. A reação foi encerrada com colocação das placas em gelo. O meio foi cuidadosamente retirado da placa e posteriormente congelado identificado, sendo este o meio externo. As células foram lavadas com Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, componentes do meio no Anexo 2.) à 4°C e o meio foi desprezado. Em seguida, foi adicionado 0,5 mL/poço de água à 4°C e as placas foram raspadas com o auxílio de espátula. A água contendo as células foi armazenada congelada à -20°C. Foram realizados 5 repetições de cada grupo, totalizando a utilização de células provenientes de 5 pacientes, uma vez que células da mesma paciente eram divididas nos 3 grupos experimentais.



**Fig. 5.2.1** Esquema com os grupos experimentais para a captação de  $[^{14}\text{C}]\text{MeAIB}$

### 5.2.1 Processamento das amostras para contagem de radioatividade

Os tubos contendo o meio de incubação e as células provenientes dos experimentos de  $[^{14}\text{C}]\text{MeAIB}$  foram descongelados no dia da contagem. Para lisar as membranas celulares, as células foram sonicadas e posteriormente centrifugadas à 800g por 10min. Estas amostras foram consideradas o meio interno, sendo que o meio externo foi somente descongelado antes da contagem do radioativo. Alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  foram retiradas de todas as amostras (meio interno e externo) e colocadas em

1,5mL de líquido de cintilação (OptiPhaseHiSafe 3® PerkinElmer, Waltham, USA) para a mensuração da radioatividade em espectrômetro de cintilação líquida LKB beta modelo 1215 (LKB-Producter AB, Brommer, Suécia).

A dosagem de proteína das amostras foi realizada segundo o método de Lowry (1951).

Os resultados da acumulação de aminoácido foram expressos pela relação entre radioatividade das células (meio interno) e a radioatividade do meio de incubação (meio externo). Foi feita uma correção com o valor da dosagem de proteína nas amostras, sendo o resultado expresso pela razão pmol/mg de proteína.

### **5.3 Dosagem de 17β-estradiol no meio de cultivo celular**

Para a dosagem de 17β-estradiol, as células foram colocadas em cultivo nas mesmas condições conforme descrito anteriormente. Após 24 horas de cultivo, o meio de todos os grupos foi trocado por meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose, Gibco®, Auckland, NZ) suplementado com 10% soro fetal bovino (Fetal Bovine Serum, Gibco®, Auckland, NZ) previamente equilibrado. Foram feitos quatro grupos de células provenientes da mesma paciente, sendo que cada grupo teve o seguinte tratamento durante as 24 horas subsequentes de cultivo:

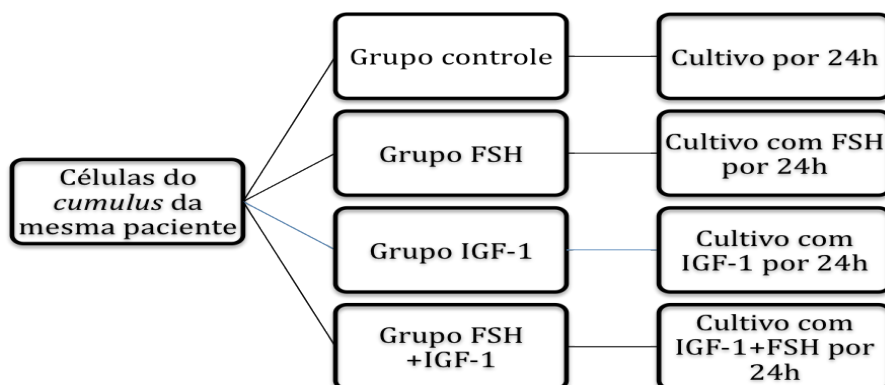
- 1) Grupo controle= somente o meio de cultivo;
- 2) Grupo FSH= foi adicionado 75mUI de FSH (Puregon®; Merck/Schering-Plough, North Wales, USA) ao meio;
- 3) Grupo IGF-1= foi adicionado na concentração de 25ng IGF-1/mL (IGF-1, Sigma-Aldrich®, St. Louise, USA) ao meio;
- 4) Grupo FSH+IGF-1= foi adicionado FSH (75mUI/mL) e IGF-1 (25ng/mL) ao meio.

Ao final deste período, o meio foi armazenado identificado e congelado à -20°C.

Foram realizadas sete repetições dos quatro grupos, ou seja, células de sete pacientes foram utilizadas neste experimento.

Para a dosagem do 17β-estradiol o meio foi coletado e diluído na proporção 1:10 no meio tampão do kit. Posteriormente, a mensuração do 17β-estradiol foi feita por Elisa, utilizando-se o kit comercial 17β-estradiol EIA kit (582251, Cayman Chemical

Company®, Ann Arbor, USA) (sensibilidade analítica 20-125pg/mL). O protocolo utilizado foi idêntico ao descrito no manual do fabricante.



**Fig 5.3.1** Esquema com os grupos experimentais para a dosagem de 17β-estradiol no meio de cultura após 24 horas em exposição aos hormônios

#### 5.4 Banco de dados das Pacientes

Para a realização da análise das informações das pacientes foi utilizado o banco de dados da clínica, as quais tiveram as células do *cumulus oophorus* coletadas. Ressaltando que o material biológico era anonimizado antes de sair da clínica, assim como estes dados provenientes do banco de dados (mais detalhes na sessão: Aspectos éticos).

Foram utilizados os seguintes itens para correlação com os parâmetros experimentais: a idade e o número de oócitos obtidos em meiose II (MII) que foram submetidos à ICSI.

#### 5.5 Análise Estatística

Para o experimento do transporte de [<sup>14</sup>C]MeAIB os dados apresentaram distribuição normal, sendo aplicado o teste de ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Bonferroni. Para o experimento da mensuração do 17β-estradiol foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk para avaliação da distribuição dos dados. Visto que os dados apresentaram distribuição não-paramétrica os resultados estão representados como

mediana e intervalos interquartis e foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis para comparação da secreção de 17 $\beta$ -estradiol. Para avaliar se havia alguma correlação entre o transporte de [<sup>14</sup>C]MeAIB e a concentração de 17 $\beta$ -estradiol com a idade e o número de oócitos MII foi utilizado uma análise de regressão linear e coeficiente de correlação de Pearson's. As diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ .

Os testes estatísticos foram calculados pelo programa Statistical Package Social Sciences (SPSS).

## **5.6 Biossegurança**

Durante a execução dos experimentos propostos, os pesquisadores envolvidos utilizaram luvas de procedimento e aventais para sua própria proteção. No caso de manipulação de substâncias que necessitavam ser preparadas em cabine de segurança biológica, foram utilizados óculos de proteção e máscaras cirúrgicas.

O descarte de resíduos não tóxicos, como soluções salinas que não foram utilizadas, foi feito em esgoto comum. Os resíduos químicos derivados dos experimentos foram acondicionados em frascos e, posteriormente, foram encaminhados para o Centro de Gestão e Tratamento de resíduos químicos da UFRGS para o correto procedimento de descarte. Os resíduos biológicos foram armazenados e enviados à Clínica ProSer para eliminação por uma empresa especializada. Os resíduos radioativos foram encaminhados conforme as instruções do Serviço de Proteção Radiológica da UFRGS.

## **5.7 Aspectos Éticos**

Este trabalho foi conduzido de acordo com o protocolo de pesquisa, com as Boas Práticas Clínicas, com as Boas Práticas de Laboratório e com a Resolução 466/13 e demais normativas do Sistema CEP/CONEP, dentre elas a Norma Operacional CNS n° 001 de 2013;

Todas as pacientes que iniciaram um ciclo pra realizar um procedimento de coleta oocitária na clínica, são cadastradas em um software (Cryolife®) que gerou um código aleatório para cada paciente. Este código foi utilizado para arquivar todas as

informações da paciente. Cada procedimento que a paciente realizou é caracterizado por outro número. Assim, quando o material biológico utilizado nesta pesquisa foi encaminhado aos pesquisadores, havia somente dois números de identificação que posteriormente foram rastreados, assegurando o sigilo das informações de cada paciente. Portanto, somente os membros do corpo clínico tiveram acesso às informações confidenciais das pacientes envolvidas, sendo que os dados foram passados a terceiros somente depois da anonimização. Assim como o material biológico, os demais dados também foram identificados com o mesmo sistema numérico descrito anteriormente.

Somente o médico de cada paciente e o técnico responsável pela coleta das células sabiam quais pacientes foram incluídas na pesquisa, evitando qualquer possível constrangimento em relação à escolha de participar ou não da pesquisa.

Os resultados serão divulgados em periódicos científicos e/ou em encontros, respeitando sempre a privacidade e os direitos individuais dos sujeitos da pesquisa, não havendo qualquer acordo restritivo à divulgação. Da mesma forma, os dados foram expostos e discutidos com os técnicos da clínica conveniada, onde foram combinadas as diretrizes para a publicação destes resultados.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Dados gerais da paciente e do respectivo desenvolvimento de cada ciclo

Nas tabelas abaixo estão os dados gerais das pacientes envolvidas em cada experimento, seguidas dos parâmetros de desenvolvimento embrionário e taxa de gestação química ( $\beta$ -hCG). A tabela 2 corresponde às pacientes do experimento de transporte de aminoácido, enquanto a tabela 3 é referente às pacientes da mensuração do  $17\beta$ -estradiol.

**Tabela 6.1.1:** Dados das pacientes do experimento de transporte de aminoácido

<b>paciente</b>	<b>Idade (anos)</b>	<b>fator infertilidade</b>	<b>Num. oóc. MII</b>	<b>taxa fertilização % (n)</b>	<b>taxa de blastocisto % (n)</b>	<b><math>\beta</math>-hCG</b>
1	35	tubário	20	100 (11/11)	45,4 (5/11)	positivo
2	34	endometriose	8	75 (6/8)	33,33 (2/6)	positivo
3	26	tubário	14	100 (14/14)	42,8 (6/14)	positivo
4	33	tubário	8	100 (8/8)	0 (0/8)	negativo
5	32	tubário	14	100 (14/14)	Transf. 4 dia	negativo
<b>Media</b>	<b>32</b>					

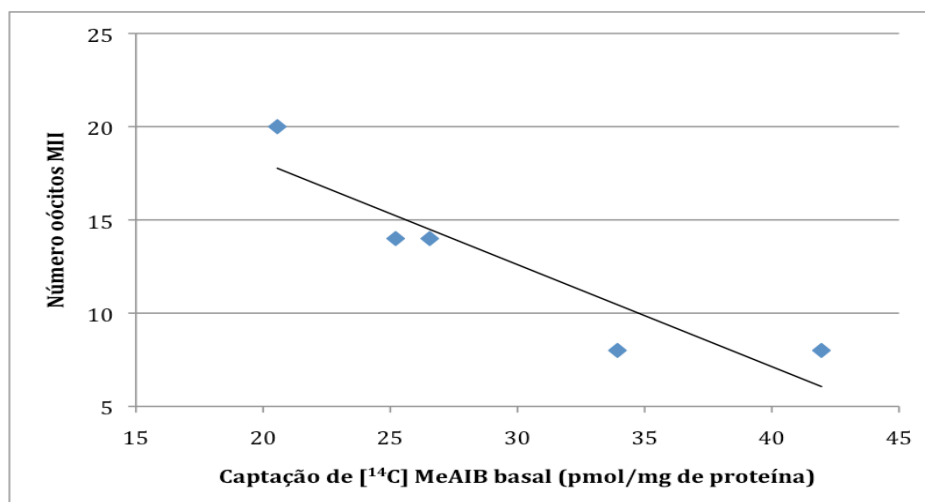
**Tabela 6.1.2:** Dados das pacientes do experimento de mensuração de  $17\beta$ -estradiol

<b>paciente</b>	<b>Idade (anos)</b>	<b>fator de infertilidade</b>	<b>Num. oóc. MII</b>	<b>taxa fertilização % (n)</b>	<b>taxa de blastocisto % (n)</b>	<b><math>\beta</math>-hCG</b>
1	30	tubário	18	88,8 (8/9)	0 (0/8)	negativo
2	36	tubário	17	88,2 (15/17)	40 (6/15)	positivo
3	33	tubário	13	92,3 (12/13)	66,6 (8/12)	s/TE
4	39	masculino	10	70 (7/10)	28,5 (2/7)	positivo
5	35	outras	10	100 (10/10)	20 (2/10)	s/ TE
6	34	tubário	8	100 (8/8)	0 (0/8)	negativo
7	33	tubário	13	92,3 (12/13)	50 (6/12)	negativo
<b>Media</b>	<b>34</b>					



## 6.2 Correlação entre número de oócitos MII e o transporte basal de [<sup>14</sup>C]MeAIB

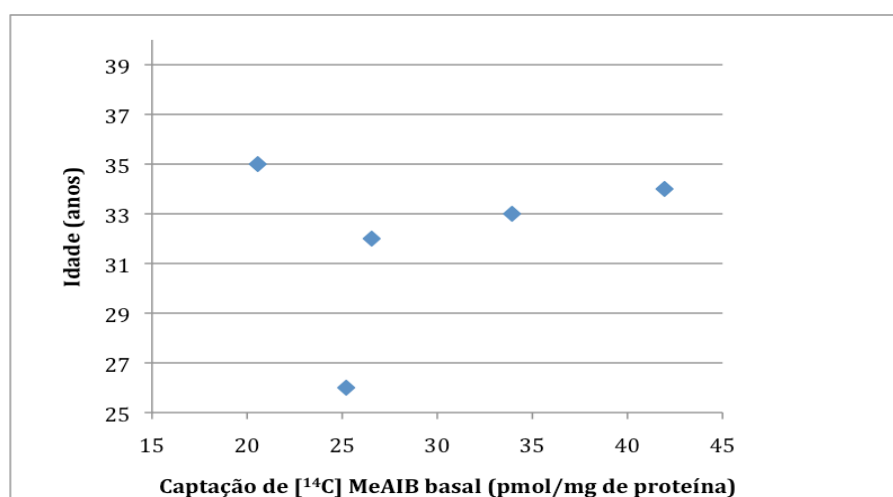
Foi encontrado uma forte correlação negativa entre o número de oócitos MII e a captação de [<sup>14</sup>C]MeAIB (n=5; P=0,03).



**Fig. 6.2.1** Correlação entre a captação basal de [<sup>14</sup>C]MeAIB e o número de oócitos MII coletados (Pearson's  $r = -0.915$ ;  $P = 0.03$ ).

## 6.3 Correlação entre a idade das pacientes e o transporte basal de [<sup>14</sup>C]MeAIB

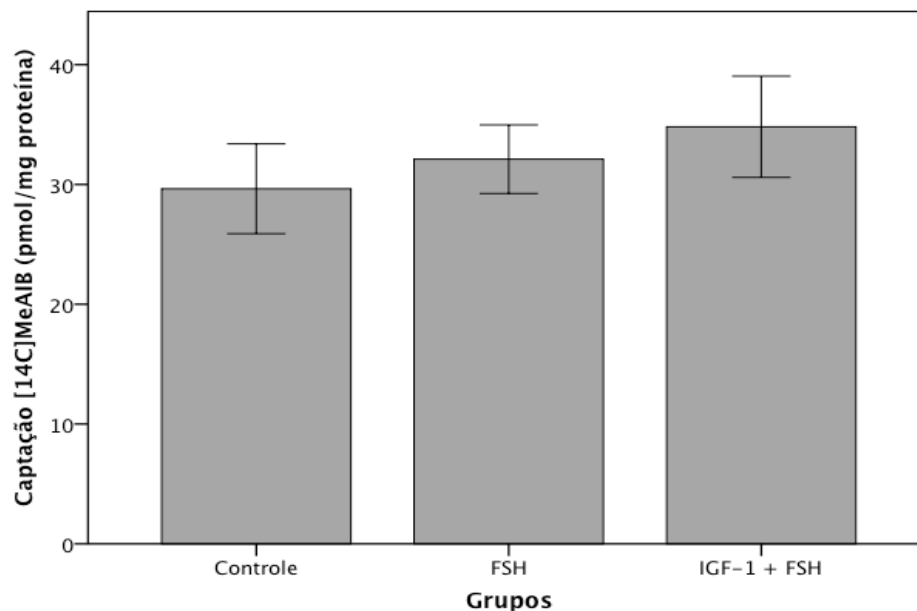
Não foi encontrado correlação entre a captação de [<sup>14</sup>C]MeAIB com a idade das pacientes, sendo o valor de  $P > 0,05$ .



**Fig. 6.3.1** Correlação entre a idade das pacientes e a captação basal de [<sup>14</sup>C]MeAIB

#### 6.4 Efeito da adição do IGF-1 por 24h ao meio de cultivo das células do *cumulus* humanas no transporte de [<sup>14</sup>C]MeAIB estimulado pelo FSH

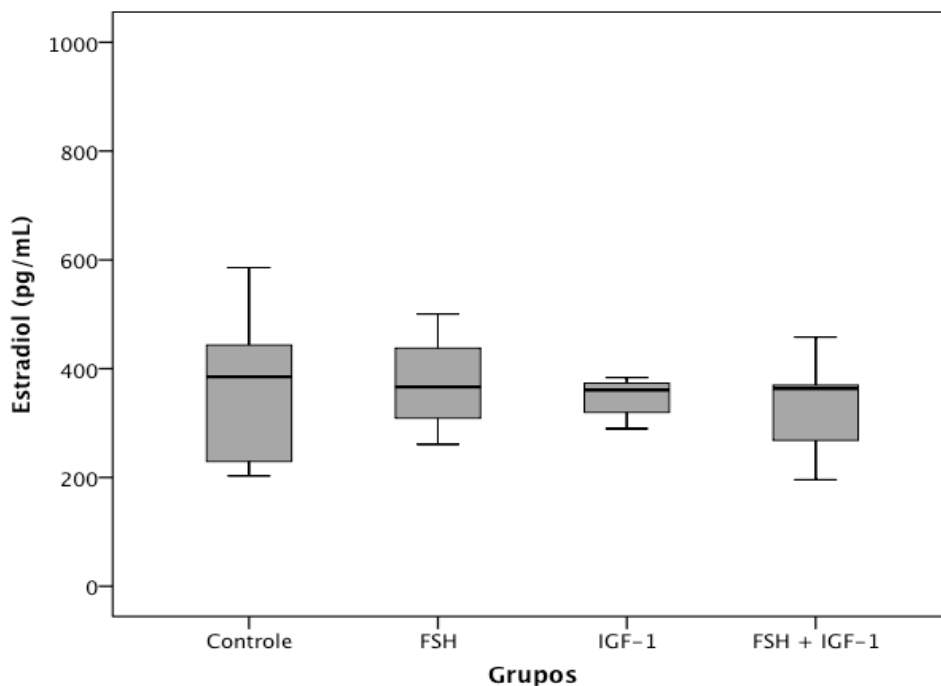
Apesar de se notar um aumento na captação de [<sup>14</sup>C]MeAIB quando incubado com FSH (0,075 mUI/mL) durante 45 minutos estes aumentos não foram significativos em relação ao controle nas células do *cumulus* humanas. Da mesma forma, não se observou nenhum efeito aditivo sobre este parâmetro quando as células foram previamente cultivadas com IGF-1 (25ng/mL) durante 24h e posteriormente estimuladas por 45min com FSH (n=5; P=0,620).



**Fig. 6.4.1** Ação da adição do IGF-1 (24h, 25ng/mL) no meio de cultivo de células do *cumulus* humanas na captação de [<sup>14</sup>C]MeAIB estimulado pelo FSH (0,075UI/mL).

### 6.5 Efeito da adição do IGF-1 e do FSH no meio de cultura das células do *cumulus* humanas sobre a concentração de 17 $\beta$ -estradiol

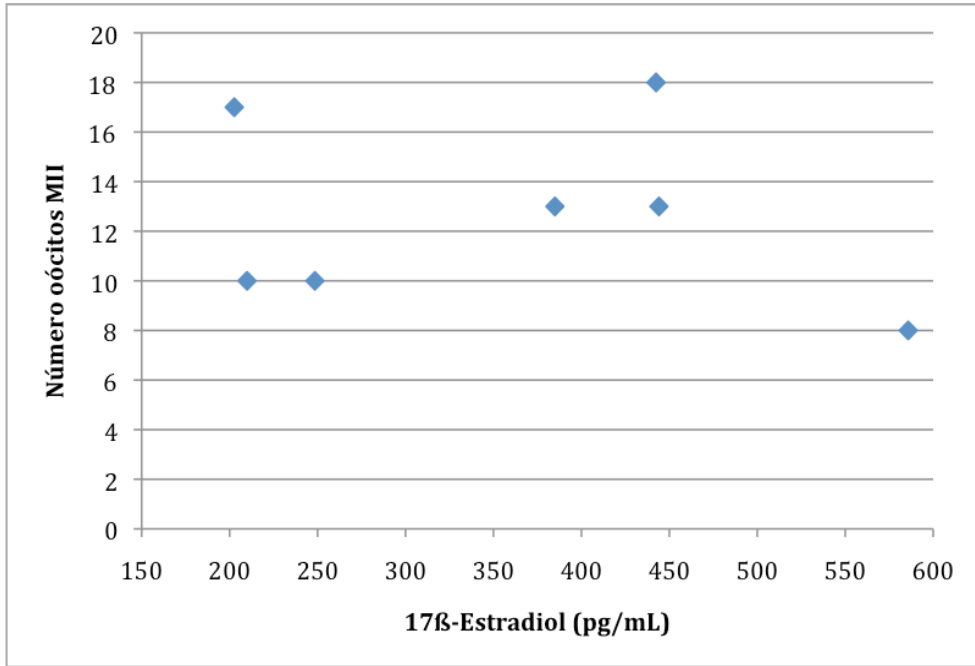
O cultivo com FSH (0,075mUI/mL) por 24h não aumentou a secreção de 17 $\beta$ -estradiol (pg/mL) no meio de cultura das células comparado ao grupo controle. Da mesma forma o cultivo com IGF-1 sozinho ou associado ao FSH não foi suficiente para estimular a produção de 17 $\beta$ -estradiol (n= 7;  $P = 0,855$ ).



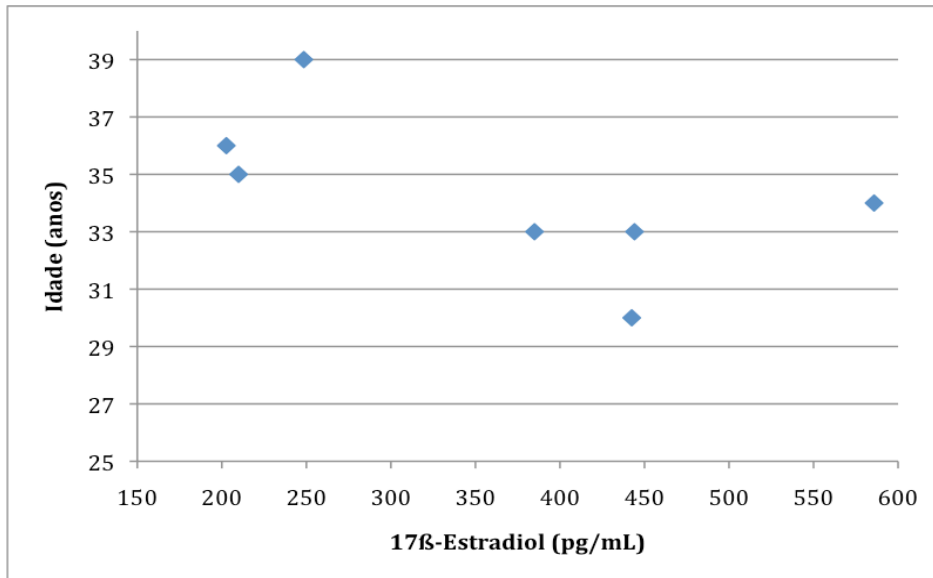
**Fig. 6.5.1** Ação do FSH e do IGF-1 na produção de 17 $\beta$ -estradiol em células do *cumulus* humanas

### 6.6 Correlação entre o número de oócitos MII e a idade com a concentração de 17 $\beta$ -estradiol no meio de cultura

Não foi encontrada nenhuma correlação entre a concentração basal de 17 $\beta$ -estradiol no meio de cultivo (por 24h) das células do *cumulus* (n=7) e a idade das pacientes, também não foi encontrada correlação entre a concentração basal de 17 $\beta$ -estradiol e o número de oócitos MII ( $P > 0,05$ ).



**Fig. 6.6.1** Correlação entre o número de oócitos MII e a dosagem de 17β-estradiol em células do *cumulus* humanas não tratadas



**Fig. 6.6.2** Correlação entre idade das pacientes e a dosagem de 17β-estradiol no meio de cultivo das células do *cumulus*

## 7 DISCUSSÃO

Primeiramente este trabalho mostrou que as células do *cumulus* humanas são capazes de transportar o [<sup>14</sup>C]MeAIB. Esta molécula é um análogo não metabolizável da alanina e vem sendo extensivamente utilizada como marcador para estudar o transporte de membrana em vários tecidos (DA CRUZ CURTE; WASSERMANN, 1985; HILLENSSJO *et al.*, 1992).

Este mecanismo de transporte é mediado via o sistema A, o qual é responsável pelo transporte de aminoácidos neutros de cadeia lateral pequena (como a alanina, serina e glutamina) através do simporte com sódio, sendo dependente de gradiente de concentração e de energia (CHRISTENSEN *et al.*, 1965). Nossos resultados estão de acordo com Pelland *et al.* (2009) que eluciaram a existência do sistema A em células do *cumulus* humanas, cujo transporte de alanina via este transportador, encontra-se aumentado nos oócitos envoltos pelas células do *cumulus*. Segundo Eppig *et al.* (2005), as células do *cumulus* são fundamentais para a transferência de alguns aminoácidos, tais como L-alanina, ao oócito. A alanina requer a absorção primeiramente pelas células do *cumulus* e, em seguida, é transferida para o oócito através de junções do tipo *gap*, sendo, portanto, dependente da comunicação entre as células do *cumulus* e o oócito. Quando oócitos são cultivados com L-alanina radioativamente marcada, pode-se observar que há uma maior captação deste aminoácido por oócitos envoltos nas células do *cumulus* do que aqueles desnudos (COLONNA; MANGIA, 1983), sendo que o bloqueio das junções *gap* nos complexos *cumulus*-oócitos impede este efeito (HAGHIGHAT; WINKLE, 1990). Da mesma forma, Ahre'n *et al.* (1972) também mostraram que tanto o sistema A quando o L (responsável pelo transporte da leucina) estão ativos no ovário de ratas pré-pubescentes.

Corroborando com estes achados, foi observado neste trabalho que a taxa de transporte basal de [<sup>14</sup>C]MeAIB nas células do *cumulus* humanas é inversamente correlacionada com o número de oócitos maduros colhidos no mesmo procedimento, ou seja, quanto maior o número de oócitos coletados, menor a taxa de transporte basal. Esse achado pode ser explicado pelo fato de que, durante o crescimento folicular, o volume do oócito aumenta de 100 a 300 vezes (GRIFFIN *et al.*, 2006) até alcançar o seu tamanho máximo, fase que compreende uma das etapas da maturação oocitária. Este crescimento ocorre graças à proliferação das células do *cumulus* que o rodeiam (GRIFFIN *et al.* 2006), uma vez que são elas que asseguram o fornecimento de

metabólitos ao oócito (BINELLI e MURPHY, 2010; SUTTON-MCDOWALL *et al.*, 2010). Os oócitos em crescimento são caracterizados por uma alta atividade de síntese de proteínas e RNA (PINCTON *et al.*, 1998), sendo que durante os estágios de maturação oocitária a síntese protéica está particularmente alta (TOMEK *et al.*, 2002). Os aminoácidos precisam ser transportados em altas quantidades ao oócito, pois servem como substrato para a síntese de proteínas, nucleotídeos (glutamina, aspartato e glicina), glutatona (glutamato, cisteína e glicina), glicoproteínas, ácido hialurônico e moléculas que servem de mensageiros (como o óxido nítrico, proveniente da arginina) (revisado por COLLADO-FERNANDEZ *et al.*, 2012).

Como o oócito é incapaz de metabolizar diretamente a glicose, a alanina pode também ser convertida em piruvato pelas células da granulosa, que via junções *gap* é fornecida ao oócito. Oócitos murinos em crescimento apresentam um aumento no consumo de piruvato e oxigênio, demonstrando que este substrato energético é essencial para a oogênese (HARRIS *et al.*, 2009). Além disso, as células do *cumulus* possuem uma maior atividade das enzimas envolvidas no metabolismo dos aminoácidos, como a alanina aminotransferase, do que os oócitos (CETICA *et al.*, 2003). As reações mediadas por estas enzimas produzem substratos para o metabolismo oxidativo, como o piruvato.

Conforme descrito anteriormente, a maturação citoplasmática que ocorre na fase de crescimento oocitário compreende a síntese e a estocagem de uma vasta gama de moléculas para tornar o oócito apto a retomar a meiose, e, portanto, ocorre antes da chamada maturação nuclear avaliada na rotina clínica. Os oócitos que completaram a meiose I e encontram-se na meiose II, são considerados maduros e aptos à serem fertilizados. O oócito é o responsável por coordenar o transporte de aminoácidos através de sinais parácrinos, de acordo com o seu estágio de desenvolvimento. Assim, foi demonstrado que quanto mais próximas as células do *cumulus* se encontram do oócito, maior será a expressão do gene SLC8A3, responsável pela transcrição do transportador de aminoácidos neutros dependente de sódio (EPPIG *et al.*, 2005). Portanto, a correlação negativa do transporte de [<sup>14</sup>C]MeAIB pode ser devido à uma regulação negativa maior dos oócitos maduros, sinalizando que não seria mais necessário transportar uma grande quantidade de aminoácidos, uma vez que a maturação já foi completada.

Um dado importante é o de que não foi encontrada uma correlação entre o transporte basal de [<sup>14</sup>C]MeAIB e a idade das pacientes, porém esse achado pode ser

devido ao fato de que todas as pacientes tinham 35 anos ou menos. Os efeitos da idade na fertilidade são observados após aproximadamente 30 anos, porém após 35 anos estes efeitos se mostram mais evidentes (AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE, 2012). O impacto negativo da idade materna sobre a taxa de sucesso da FIV/ICSI é principalmente devido à quantidade e qualidade diminuída (maturação e competência) dos oócitos coletados, independentemente do protocolo de estimulação (TONER, 2003). Portanto, como foram utilizadas somente as células de pacientes com no mínimo 8 oócitos coletados, provavelmente o fator idade não estava afetando a função ovariana e, conseqüentemente, a fisiologia das células do *cumulus*.

As pacientes incluídas no estudo apresentavam, em sua maioria, a mesma causa de infertilidade, conhecida como fator tubário. Somente uma apresentava endometriose e, portanto, nenhuma apresentava alguma alteração comprovada da função ovariana, o que poderia afetar de alguma forma o funcionamento da dinâmica folicular. Este fato foi evidenciado pelo número de oócitos maduros coletados em todas as pacientes, sendo todos maior que 8. Portanto, a amostra de células incluídas, pode ser considerada homogênea sob o ponto de vista do fator de infertilidade e, portanto, não foi correlacionado com os parâmetros avaliados, inclusive na paciente com endometriose.

Em células de Sertoli de ratos imaturos, que se encontram na fase proliferativa (de 10 à 20 dias) a incubação com FSH por 45min é capaz de estimular o transporte de aminoácido independente de AMPc pelo sistema A (PÉREZ-SÁNCHEZ e WASSERMANN, 1981). O FSH atua no influxo de [<sup>14</sup>C]MeAIB, aumentando a atividade (V<sub>max</sub>) do sistema A de transporte de aminoácido (DA CRUZ CURTE; WASSERMANN, 1985; SILVA; WASSERMANN, 1999). Desta maneira, o FSH atua aumentando o aporte de nitrogênio necessário para a síntese protéica e de nucleotídeos, essenciais para o crescimento e o metabolismo celular (MCGIVAN e PASTOR-ANGLADA, 1994; WARD; THOMPSON, 2012)

Neste trabalho, o FSH não foi capaz de estimular o transporte de [<sup>14</sup>C]MeAIB em células do *cumulus* humanas, sendo que o cultivo prévio destas mesmas células com IGF-1 também não foi capaz de causar alguma alteração neste comportamento. Poucos trabalhos existem avaliando o transporte de [<sup>14</sup>C]MeAIB estimulado pelo FSH em ovários ou cultivos de células da granulosa. Segundo Ahrén e Rubistein (1965) o FSH pode estimular um aumento na captação de [<sup>14</sup>C]MeAIB, glicina-<sup>3</sup>H e valina-<sup>14</sup>C em ovários de ratas. Entretanto, este efeito somente foi observado quando o FSH foi

injetado 4 horas antes nas ratas, sendo que da mesma forma que o presente estudo, a adição de FSH diretamente ao meio de incubação também não foi capaz de estimular o transporte de [<sup>14</sup>C]MeAIB (AHRÉN; RUBISTEIN, 1965).

Outra hipótese seria a de que as células estavam em estado luteínico no momento da coleta e possivelmente mantiveram este estado no sistema de cultivo utilizado, e, portanto, não responderam ao FSH no transporte de [<sup>14</sup>C]MeAIB. Conforme será discutido posteriormente em relação à produção de 17β-estradiol, esse é um fator que deve ser considerado, embora o envolvimento do FSH na regulação do crescimento e diferenciação das células da granulosa esteja bem elucidado (NAVALAKHE *et al.*, 2013).

Da mesma forma, o IGF-1 não alterou o comportamento nesta metodologia de cultivo e sistema de transporte testado. Este resultado pode ter ocorrido devido ao fato de que o IGF-1 não foi adicionado no momento do transporte, e sim durante as 24 horas anteriores de cultivo. Nossos resultados contradizem aqueles publicados por Hillensjo *et al.* (1992) os quais demonstraram que a incubação do IGF-1 (a partir de 10ng/mL) em células da granulosa luteinizadas humanas por duas horas estimulou o transporte de [<sup>14</sup>C]MeAIB, além de aumentar a incorporação de timina ao DNA, demonstrando que o IGF-1 está envolvido em efeitos tróficos nestas células, além dos efeitos já descritos na esteroidogênese. Portanto, existe a possibilidade de que o momento de exposição e o período em que as células permanecem na presença dos hormônios sejam cruciais para sua ação ao nível da expressão gênica e produção proteica, o que não foi verificado neste estudo.

Além disso, estima-se que mais de 90% do IGF está ligado às proteínas de ligação de IGF (IGFBP; JONES; CLEMMONS, 1995) e o mesmo ocorre no interior do fluido folicular (MONGET *et al.*, 1993; FUNSTON *et al.*, 1996; WEBB *et al.*, 2004). Apesar de não adicionar qualquer IGFBPs ao meio de cultura, as células da granulosa expressam mRNA para ambos IGFBP2 e IGFBP5 em bovinos (MANI, 2008, observações não publicadas) e células humanas da granulosa luteinizadas expressam o gene da IGFBP-3 (GIUDICE *et al.*, 1991) e IGFBP-1 (MASON *et al.*, 1993). As IGFBP são capazes de inibir a bioatividade do IGF-1 nos folículos (UI *et al.*, 1989; MONGET *et al.*, 1993) assim como aumentá-la, podendo fazer parte de um mecanismo de controle local para o crescimento folicular. Em folículos em atresia, há um aumento na produção de IGFBP no fluido folicular, levando à uma diminuição da bioatividade do IGF-1, e pode ser um fator do início do processo de atresia (UI *et al.*, 1989;



MONGET *et al.*, 1993). Segundo Mason *et al.* (1993) o FSH após 48h mostrou estimular de forma dose dependente a produção de IGFBP-1. Portanto, estas proteínas poderiam estar presentes no meio e ter diminuído a biodisponibilidade do IGF-1, necessitando de uma dose maior da utilizada de 25 ng/mL.

Neste trabalho mensuramos a produção de 17 $\beta$ -estradiol secretado pelas células do *cumulus* após o cultivo de dois dias para avaliar se a adição de FSH, IGF-1 ou ambos afetariam sua produção. Conforme os resultados descritos, nem o FSH (na dose de 75mUI/mL) nem o IGF-1 (25ng/mL) foram capazes de alterar a concentração de 17 $\beta$ -estradiol no meio de cultura. Da mesma forma, quando ambos os hormônios foram adicionados concomitantemente, nenhum efeito foi observado. Este resultado é conflitante com o trabalho de Baumgarten *et al.* (2014) onde o tratamento com FSH por 48h aumentou significativamente a expressão dos genes das enzimas envolvidos na esteroidogênese CYP19A1, CYP11A, bem como das respectivas proteínas codificadas por estes genes, da proteína Star, além de aumentar os níveis de FSHR e de 17 $\beta$ -estradiol. Este trabalho é um dos poucos que utilizou células do *cumulus* humanas, mostrando que estas células respondem diferentemente das murais, que não foram capazes de estimular a expressão destes mesmos genes. Apesar da diminuição da expressão dos receptores de LH em células murais durante a luteinização (MENON *et al.*, 2013), as células do *cumulus* expressam níveis significativamente menores de LHR que as células murais. Da mesma forma, a expressão da enzima CYP19A1 e dos receptores de FSH (FSHR) continua alta nas células do *cumulus*, enquanto que o mesmo não ocorre em células murais. A enzima CYP11A1 e a proteína Star, necessárias para a produção de progesterona, são mais expressas nas células murais que nas células do *cumulus*. Portanto, estes achados sugerem que as células do *cumulus* originárias de folículos pré-ovulatórios não luteinizam após a exposição ao hCG exógeno *in vivo*, e que, mesmo separadas do oócito, estas células respondem *in vitro* ao FSH com um aumento na expressão dos marcadores da diferenciação e na produção de 17 $\beta$ -estradiol. Da mesma forma, Gilchrist *et al.* (2008) sugerem que o oócito secreta fatores que impedem a luteinização das células do *cumulus*, como o BMP-15 e o GDF-9. Tem sido relatado que o BMP-15 inibe a produção de progesterona estimulada pelo FSH em células da granulosa de ratas (OTSUKA *et al.*, 2000), além de que pode haver uma diminuição da expressão do FSHR induzida pelo BMP15 (OTSUKA *et al.*, 2001). Da mesma maneira, o GDF-9 inibe a esteroidogênese induzida por FSH e a expressão

do receptor de LH (LHR) em células da granulosa de ratas (VITT *et al.*, 2000), elucidando a importância do oócito em modular a ação do FSH.

Apesar de descrito que as células do *cumulus* não sofrem a luteinização mesmo após o uso do hCG, mais estudos são necessários para que esta observação seja confirmada. Conforme sugerido anteriormente, uma sugestão para os nossos resultados seria que as células utilizadas neste estudo, possivelmente apresentavam uma pequena expressão de FSHR e, conseqüentemente, não responderam à estimulação hormonal durante os primeiros dias em cultura, conforme descrito em células da granulosa luteínicas (BRECKWOLDT *et al.*, 1996; SASSON *et al.*, 2004; LINDEBERG *et al.*, 2007). Segundo Ophir *et al.* (2014) após 4 dias de cultivo em meio sem soro e renovado diariamente, as células luteinizadas retomaram as características observadas em células *in vivo* durante a fase antral inicial, inclusive em relação aos receptores de FSH, que aumentaram a sua expressão. Esse tempo inicial de cultivo foi essencial para a retomada da capacidade de resposta ao FSH e conseqüente reversão da luteinização, uma vez que as células luteínicas estimuladas no dia da coleta não foram capazes de responder ao FSH por 48h, enquanto que as cultivadas estimularam a expressão dos genes das enzimas CYP11A1, CYP19A1 e do LHR. Além disso, estas células que reverteram o estado luteínico *in vitro*, após a estimulação com hCG aumentaram a expressão de AREG e EREG com queda concomitante dos níveis de LHR, mimetizando o efeito do LH/hCG em células pré-ovulatórias não-luteinizadas (OPHIR *et al.*, 2014). Esta recuperação à resposta ao FSH e LH pode ser devido à reciclagem dos receptores internalizados à superfície celular, que sofrem esta “down-regulation” provavelmente por ter sido induzidos *in vivo* à uma superestimulação com gonadotrofinas. Alternativamente, a recuperação da resposta pode também ser devido à nova síntese de receptores (BRECKWOLDT *et al.*, 1996).

De maneira semelhante, estudos *in vivo* demonstraram que os níveis de mRNA da aromatase em tecidos da parede folicular e a concentração de 17 $\beta$ -estradiol no fluido folicular diminuí após o pico de LH em bovinos (VOSS; FORTUNE, 1993; KOMAR *et al.*, 2001). Assim é possível que o LH possa causar diretamente uma redução na produção de 17 $\beta$ -estradiol em cultivo de células da granulosa (SPICER *et al.*, 2002).

Diferentemente das células do *cumulus*, existem vários trabalhos descrevendo as células da granulosa murais humanas quanto às suas características de diferenciação. Durante a fase folicular antral inicial, o perfil de expressão gênica apresenta baixos

níveis do receptor de FSH (FSHR) (ABDENNEBI *et al.*, 1999; CAMP *et al.*, 1991; O'SHAUGHNESSY *et al.*, 1996; WEIL *et al.*, 1999), do receptor de LH (LHR) (ABDENNEBI *et al.*, 1999; CAMP *et al.*, 1991), da enzima CYP11A1 (OONK *et al.*, 1990), CYP19A1, amfiregulina (AREG) e epirregulina (EREG), (ASHKENAZI *et al.*, 2005; ZAMAH *et al.*, 2010). Durante a progressão do folículo para o estágio pré-ovulatório, devido ao aumento da secreção de FSH, há um aumento dos níveis de FSHR e LHR (ASHKENAZI *et al.*, 2005; ZAMAH *et al.*, 2010) com um aumento da expressão de CYP11A1 (OONK *et al.*, 1990) e CYP19A1 (CLEMENT e MONNIAUX, 2012; FITZPATRICK *et al.*, 1997; KAWAI *et al.*, 2012; NAGASHIMA *et al.*, 2011) para o pico de LH (CAMP *et al.*, 1991; HILLIER, 2001; HSUEH *et al.*, 2000). Durante a luteinização, o perfil genético é alterado para a ativação de genes promotores da síntese e secreção de progesterona, como o AREG e EREG, resultando na ovulação (ZAMAH *et al.*, 2010; CLEMENT e MONNIAUX, 2012; CONTI *et al.*, 2006; SU *et al.*, 2010). Embora as células de folículos pré-ovulatórios não-luteinizadas (que não foram submetidas ao hCG) expressam FSHR em níveis mais elevados comparado às células de folículos antrais iniciais e luteínicos, as células da granulosa murais humanas coletadas durante a fase antral inicial apresentam mais receptores para FSH que as células coletadas após o hCG exógeno (luteínicas). Entretanto, por sua vez, as células de folículos antrais iniciais apresentam baixa expressão de LHR, CYP11A1 e CYP19A1 que aumentam na fase pré-ovulatória e diminuem novamente após a luteinização (OPHIR *et al.*, 2014). Portanto, as células da granulosa murais luteínicas (coletadas 36h após o hCG) apresentam baixos níveis de LHR, FSHR e CYP19A1, níveis moderados de CYP11A1 e altos níveis de AREG e EREG.

Baseado no trabalho de Baumgarten *et al.* (2014), deixamos as células em cultivo por 24 horas e posteriormente adicionamos os hormônios que permaneceram em contato com as células nas 24 horas subsequentes. Entretanto, no trabalho citado anteriormente, as células permaneceram por 48 horas em contato com o FSH. Da mesma forma, tem sido demonstrado que preparados de células da granulosa murais recém coletados em programas de FIV não respondem ao hCG/LH, e não é observada uma resposta ao FSH em culturas destas células por períodos curtos, menores de 48h (DENNEFORS *et al.*, 1983; de los SANTOS *et al.*, 1993; ANDREANI *et al.*, 1994). Ainda em células do *cumulus* foi demonstrado que há um aumento na expressão de FSHR após 48h de cultivo mesmo sem a presença de FSH (BAUMGARTEN *et al.*,

2014). Portanto, provavelmente nosso tempo de cultura com FSH pode não ter sido suficiente para que houvesse a expressão máxima do seu receptor. Além disso, Ophir *et al.* (2014) mostraram que o pico máximo de estimulação do FSH foi observado em 48h após o início do tratamento em células da granulosa murais, coincidindo com o período máximo de estimulação da aromatase pelo FSH (FITZPATRICK; RICHARDS, 1991; STOCCO *et al.*, 2008).

A maioria dos trabalhos utiliza este período de estimulação hormonal de 48h para a posterior mensuração dos níveis de produção de esteroides, bem como os que avaliaram a expressão de receptores e/ou enzimas envolvidas na esteroidogênese. Portanto, este menor tempo de exposição ao FSH associado à um período anterior à expressão máxima do receptor pode ter impedido a resposta efetiva do FSH. Este fato pode ser fundamental também para o IGF-1, conforme as observações de que a ação do IGF-1 em estimular a produção de 17 $\beta$ -estradiol só é efetiva depois de 2 dias de tratamento em células bovinas (SPICER e CHAMBERLAIN, 1998; SPICER *et al.*, 1993), sendo que no primeiro dia de tratamento o IGF-1 causa uma inibição na produção de 17 $\beta$ -estradiol.

Apesar do IGF-1 não ter estimulado a produção de 17 $\beta$ -estradiol nas células do *cumulus* em nosso estudo, o efeito do IGF-1 em estimular a produção de 17 $\beta$ -estradiol e atuar potencializando os efeitos do FSH para manter os níveis máximos deste esteróide (ERICKSON *et al.*, 1989) vem sendo elucidado, com algumas particularidades para cada espécie.

Em células da granulosa de ratas sabe-se que diferenciação induzida pelo FSH depende do IGF-1, conforme foi demonstrado que o FSH não foi capaz de estimular a expressão das enzimas CYP19A1 e CYP11A1 e a produção de 17 $\beta$ -estradiol quando o IGF-1R foi inibido (ZHOU *et al.*, 2013). Por outro lado, o IGF-1 sozinho não é capaz de estimular a esteroidogênese, necessitando da presença de FSH em roedores. Segundo Zhou *et al.* (2013), em células murais humanas o IGF-1 é capaz de estimular a expressão da CYP19A1 sem a presença de FSH, diferentemente de roedores. Entretanto a concentração de 17 $\beta$ -estradiol não foi avaliada por Zhou *et al.* (2013), e talvez esse efeito não seja verificado em alterações deste hormônio. Em humanos foi demonstrado que a ação do FSH para a diferenciação das células da granulosa necessita da ativação do IGF-1R, fato demonstrado que na presença do inibidor AEW da atividade do IGF-1R, o FSH não foi capaz de estimular a expressão dos genes envolvidos na esteroidogênese e na produção de 17 $\beta$ -estradiol, além da expressão de

LHR (BAUMGARTEN *et al.*, 2014). Segundo os autores, este seria um possível mecanismo para explicar o efeito inibitório das proteínas de ligação do IGF ou dos anticorpos anti-IGF-1R na indução da esteroidogênese em humanos (WILLIS *et al.*, 1998; YUAN e GIUDICE, 1999).

Em células da granulosa murais bovinas, coletadas de folículos pré-ovulatórios, foi demonstrado que o IGF-1 controla a expressão dos genes CYP11A1, HSD3B1 e CYP19A1, bem como um posterior aumento na produção de 17 $\beta$ -estradiol. Tanto em bovinos (SPICER *et al.*, 2002, RYAN *et al.*, 2008) quanto em células de ratas (ADASHI *et al.*, 1985) quando o FSH foi adicionado ao meio juntamente com o IGF-1 houve um efeito sinérgico, aumentando a expressão da CYP19A1, porém esse efeito não foi observado na produção de 17 $\beta$ -estradiol (MANI *et al.*, 2010). Da mesma forma, somente o FSH não foi capaz de estimular a produção de 17 $\beta$ -estradiol em células da granulosa bovinas. Assim como em células suínas, o tratamento com IGF-1 (50 e 100 ng/ml) aumentou a expressão de CYP11A1 (MANI *et al.*, 2010). O FSH adicionado ao meio não causou nenhum efeito na expressão do gene CYP11A1 em células bovinas, tanto sozinho quanto associado ao IGF-1 (MANI *et al.*, 2010), entretanto o mesmo não foi observado em células da granulosa suínas, onde tanto o FSH sozinho quanto com o IGF-1 houve um aumento na expressão deste gene (URBAN *et al.*, 1994).

O IGF-1 estimulou a expressão da enzima HSD3B1 em células da granulosa bovinas e de ratas (de MOURA *et al.* 1997; EIMERL & ORLY 2002; MANI *et al.*, 2010). O FSH sozinho não foi capaz de induzir este efeito em células bovinas (ZHENG *et al.*, 2008; MANI *et al.*, 2010), entretanto em células de ratas o FSH foi capaz de aumentar a expressão deste gene (de MOURA *et al.*, 1997). Como a enzima CYP11A1 é responsável pela transformação do colesterol em pregnenolona que posteriormente é convertida pela HSD3B em progesterona, o aumento da transcrição destas enzimas estimulado pelo IGF-1 pode aumentar a produção de progesterona, além de gerar precursores para a produção de 17 $\beta$ -estradiol.

Estas diferenças nos resultados são difíceis de ser explicadas por uma simples diferença entre espécies, uma vez que tanto o estágio folicular preciso no momento da coleta das células, bem como os protocolos de cultivo utilizados, pode influenciar a expressão de determinados genes específicos dos quais os mecanismos ainda não são conhecidos. Além disso, conforme discutido anteriormente, a adição de FSH ao meio juntamente com o IGF-1, pode ter estimulado a síntese de IGFBP-1, impedindo a ação

sinérgica do IGF-1 na esteroidogênese.

Outro ponto importante, é que existem indícios que mostram que as culturas de células da granulosa que utilizam meios sem soro podem levar à uma regressão da luteinização destas células. Porém, neste trabalho utilizamos o sistema de cultivo com soro, buscando utilizar o mais próximo do sistema de maturação oocitário utilizado. Além disso, sabe-se que a deprivação de soro pode levar à apoptose celular (TILLY *et al.*, 1991; AHARONI *et al.*, 1995) além do soro ser importante para a adesão das células (LANGHOUT *et al.*, 1991).

Não foi encontrado correlação entre a produção de 17 $\beta$ -estradiol basal e idade das pacientes, assim como com o número de oócitos MII coletados. Da mesma forma que no transporte de [<sup>14</sup>C]MeAIB, nenhum fator de infertilidade que pudesse interferir na função ovariana foi incluído no grupo das pacientes, fato que pode ser mostrado pelo número mínimo de 11 oócitos coletados por paciente. Em relação à idade, somente duas pacientes tinha mais de 35 anos, e este fator não foi correlacionado com a quantidade de 17 $\beta$ -estradiol secretada pelas células em estado basal ou em presença de FSH e IGF-1.

A falta de desenvolvimento folicular na ausência tanto do IGF-1 quanto do FSH e os seus efeitos sinérgicos sobre a diferenciação e a esteroidogênese das células da granulosa indicam que estes hormônios interagem para manter a função ovariana. Esta interação tem sido observada também na modulação da expressão de seus receptores, mostrando um importante mecanismo de regulação entre o IGF-1 e o FSH. Em células bovinas, o IGF-1 (50ng/mL) foi capaz de aumentar a expressão tanto do IGF-1R, quanto do FSHR. Embora o FSH não tenha tido efeito na expressão do IGF-1R, quando os dois hormônios foram adicionados juntos, houve um aumento na expressão do IGF-1R em relação ao efeito do IGF-1 sozinho; enquanto que a adição de FSH preveniu completamente o aumento do FSHR estimulado pelo IGF-1 (MANI *et al.*, 2010).

Conforme foi demonstrado anteriormente, as células da granulosa humanas expressam exclusivamente IGF-2 (YUAN e GIUDICE, 1999) e que o FSH estimula a expressão de IGF-2 em folículos antrais iniciais humanos (el-ROEIY *et al.*, 1993), porém não interfere na expressão do IGF-1R em células do *cumulus* humanas. Segundo Baumgarten *et al.* (2014), as células do *cumulus* expressam tanto IGF-2 como IGF-1R, porém não expressam IGF-1. Adicionalmente foi demonstrado que estas células expressam níveis mais altos de IGF-1R que IGF-2R. Neste trabalho anterior, não foi

observado se o IGF-1 têm algum efeito na expressão dos receptores de FSH em células humanas. Baseado em nossos resultados, possivelmente o IGF-1 não aumenta a expressão de FSHR, porém mais estudos que quantifiquem estes receptores são necessários para se comprovar que não há esta relação direta entre estes hormônios em células do *cumulus* humanas.

Semelhantemente, em roedores, o IGF-1 não é capaz de aumentar a expressão do FSHR em células da granulosa desta espécie, embora camundongos *knockout* para o IGF-1 apresentam uma baixa expressão de receptores de FSH, o que foi correlacionado com uma redução do crescimento folicular em roedores (ZHOU *et al.*, 1997). Da mesma forma, o FSH não induz nenhum efeito na expressão de IGF-1R ou nos níveis de IGF-1 (ZHOU *et al.*, 2013). Portanto, fica evidente de que há tanto um envolvimento dos respectivos receptores do IGF-1 e FSH modulando de forma cruzada as suas expressões quanto uma interação entre eles através de outras vias de sinalização intracelular para estimular a esteroidogênese em células da granulosa nas diferentes espécies.

Em células da granulosa e de Sertoli, a interação FSH-FSHR ativa diferentes vias de sinalização incluindo a ERK1/2, cAMP/proteína quinase A/CREB, e a via da PI3K/AKT. Particularmente em células da granulosa não-diferenciadas, a ativação da AKT pelo FSH é essencial para a estimulação da inibina B, da CYP19A1, da produção de 17 $\beta$ -estradiol e da expressão do LHR e da 3-hidroxiesteroide desidrogenase (ZELEZNIK *et al.*, 2003; ALAM *et al.*, 2004; SUN *et al.*, 2003). As vias pelas quais o FSHR ativo fosforila a AKT não estão completamente elucidadas. Existem indícios de que possa ser via ativação da cascata Rap/Raf ou da via da PI3K pela ativação das subunidades  $\beta\gamma$  da proteína G (ZELEZNIK *et al.*, 2003).

O IGF-1R é um membro da família dos receptores tirosina quinase que uma vez ativado, estimula tanto a MAPK quanto a ERK1/2 além da via da PI3K/AKT (BAUMGARTEN *et al.*, 2014). Alguns autores sugerem que a atividade da AKT é necessária para a indução pelo FSH da expressão da CYP19A1 em humanos, considerando-se que a AKT é o ponto chave da cooperação entre o FSH e o sistema IGF para a diferenciação de células da granulosa humanas. Interessantemente, o FSH não foi capaz de estimular a AKT na presença de um inibidor do receptor do IGF-1, sugerindo que o FSH não fosforila a AKT diretamente e sim que o IGF-1R media a ativação da AKT (BAUMGARTEN *et al.*, 2014). Em contrapartida, o bloqueio do IGF-1R não teve efeito na fosforilação da ERK1/2 estimulada pelo FSH. Segundo

Baumgarten *et al.* (2014) há uma pequena taxa de fosforilação da AKT em células do *cumulus* em cultivo, e esta fosforilação aumenta significativamente após o tratamento com FSH por uma hora. Mais estudos são necessários para determinar a comunicação molecular entre o FSH e o IGF-1R que leva à fosforilação da AKT em humanos e roedores.

Sabe-se que o IGF-1 estimula a via da PI3K/AKT em células da granulosa bovinas (HU *et al.* 2004; MANI *et al.*, 2010) e que possivelmente esta ativação se dá via PI3K, uma vez que a adição de um bloqueador desta proteína reduz a expressão dos genes envolvidos na esteroidogênese, reduzindo a produção de 17β-estradiol (MANI *et al.*, 2010). Entretanto, em bovinos, o FSH aumentou a expressão de IGF-1R e CYP19A1, porém não foi capaz de aumentar estatisticamente o estímulo da AKT comparado ao efeito do IGF-1 sozinho em células da granulosa (MANI *et al.*, 2010). Da mesma forma, em células de Sertoli, o efeito estimulador do FSH na expressão da CYP19 foi inibido com o bloqueio do IGF-1R (ZHOU *et al.*, 2013). Embora o IGF-1 estimule a AKT, a ativação desta enzima não é suficiente para estimular a expressão da CYP19A1 (ZELEZNIK *et al.*, 2003), levando a acreditar que é necessário que ambas as vias de sinalização estejam ativas simultaneamente.

Assim como na esteroidogênese, as ações do FSH sobre o transporte de [<sup>14</sup>C]MeAIB são bloqueados por verapamil, toxina pertússica (PTX) e wortmanin (um bloqueador de PI3K) (JACOBUS *et al.*, 2010). Desta forma, possivelmente a interação entre o FSH e o IGF-1 nesta via seria observada de maneira sinérgica, pois conforme descritas acima, ambas as vias de sinalização convergem para esta proteína. Entretanto, é preciso mensurar a expressão dos receptores do FSH e IGF-1, uma vez que não há descrições na literatura sobre o efeito do cultivo prévio com o IGF-1 na expressão dos receptores de FSH. Mais estudos são necessários para explicar como ocorre a ação destes hormônios em células do *cumulus* humanas.

Desta forma podemos concluir que o sistema A de transporte de aminoácidos está presente em células do *cumulus* humanas, sendo que a taxa basal é inversamente proporcional ao número de oócitos MII coletados. Este achado sugere que há um controle exercido pelo oócito maturo neste sistema, diminuindo o transporte de substratos necessários para a síntese protéica. Os resultados nos sugerem que as células do *cumulus* estavam luteinizadas no momento da estimulação pelo FSH em ambos experimentos, e provavelmente apresentavam uma expressão reduzida de FSHR sendo este o motivo de não ser observado um estímulo no transporte de aminoácido nem a



produção de 17 $\beta$ -estradiol pelo FSH. Porém para esta conclusão, são necessários experimentos que quantifiquem este receptor, assegurando que o estímulo tenha sido realizado no momento ideal da expressão deste receptor. A mensuração da progesterona também seria importante, para melhor caracterizar o estado de diferenciação destas células. Provavelmente, o IGF-1 não ocasiona um aumento direto na expressão do FSHR, uma vez que quando adicionado ao meio de cultivo não alterou os parâmetros analisados comparados aos grupos que continham somente FSH. Além disso, quando adicionado IGF-1 sozinho ao meio de cultura das células do *cumulus*, nenhuma alteração na produção de 17 $\beta$ -estradiol foi observada, sugerindo que o IGF-1 não exerce um efeito direto na esteroidogênese destas células. Portanto, embora existam diversos trabalhos que tem auxiliado na compreensão da interação entre o IGF-1 e o FSH na diferenciação celular durante a foliculogênese, ainda faltam pontos cruciais a serem esclarecidos neste processo em células humanas. Da mesma forma, são necessários mais estudos que caracterizem as células do *cumulus*, bem como a sua interação com o oócito, para que possamos aplicar estes conhecimentos com a finalidade de melhorar as taxas de MIV oocitária.

Para melhor esclarecer os resultados deste trabalho, pretendemos avaliar a expressão dos receptores de FSH, a fim de observar se o IGF-1 atuaria modulando esta expressão. Além disso, a avaliação da expressão da fosforilação de proteínas envolvidas nas principais vias metabólicas que estes hormônios interagem, seria de extrema importância.

ABDENNEBI, L.; MONGET, P.; PISSELET, C.; REMY, J.J.; SALESSE, R.; MONNIAUX, D. Comparative expression of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptors in ovarian follicles from high and low prolific sheep breeds. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 845–854, 1999.

ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A. Bovine model for study of ovarian follicular dynamics in humans. **Theriogenology**, v. 43, n. 1, p. 113-120, 1995.

ADASHI, E. Y.; RESNICK, C. E.; BRODIE, A. M.; SVOBODA, M. E.; VAN WYK, J. J. Somatomedin-C-mediated potentiation of follicle-stimulating hormone-induced aromatase activity of cultured rat granulosa cells. **Endocrinology**, v. 117, p. 2313–2320, 1985.

ADASHI, E. Y. The IGF family and folliculogenesis. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 39, n. 1-2, p. 13-9, 1998.

AHARONI, D.; DANTES, A.; OREN, M.; AMSTERDAM, A. c-AMP mediated signals as determinants for apoptosis in primary granulosa cells. **Experimental Cell Research**, v. 218, p. 271-282, 1995.

AHRÉN, K.; RUBINSTEIN, L. Effects of Follicle Stimulating Hormone on Amino Acid Transport and Protein Biosynthesis in the Isolated Rat Ovary. **Scandinavian Physiological Society**, 2008.

ALAM, H.; MAIZELS, E. T.; PARK, Y. Follicle-stimulating hormone activation of hypoxia-inducible factor-1 by the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/Ras homolog enriched in brain (Rheb)/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway is necessary for induction of select protein markers of follicular differentiation. **Journal of Biology Chemistry**, v. 279, p. 19431–19440, 2004.

ALBERTINI, D.; COMBELLES, C. M. H.; BENECCHI, E.; CARABATSOS, M. J. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Reproduction**, v. 121, n. 5, p. 647-653, 2001.

AMATO, G.; IZZO, A.; TUCKER, A.; BELLASTELLA, A. Insulin-like growth factor binding protein-3 reduction in follicular fluid in spontaneous and stimulated cycles. **Fertility and Sterility**, v. 70, n. 1, p. 141-144, 1998.

AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE, Age and Fertility A Guide for Patients, 2012.

AMSTERDAM, A.; ROTMENSCH, S.; BEN-ZEEV, A. Coordinated regulation of morphological and biochemical differentiation in a steroidogenic cell: the granulosa cell model. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 14, p. 377–82, 1989.

ARMSTRONG, D. G.; ARMSTRONG, D. G.; HOGG, C. O.; WOAD K. J. Insulin-like growth factor (IGF) system in the oocyte and somatic cells of bovine preantral follicles. **Reproduction**, v. 123, n. 6, p. 789 - 97, 2002.

ANDREANI, C. L.; PIERRO, E.; LANZONE, A. Effect of gonadotropins, insulin and IGF I on granulosa luteal cells from polycystic ovaries. **Molecular Cellular Endocrinology**, v.106, p. 91-97, 1994.

ARRAZTOA, J. A.; MONGET, P.; BONDY, B.; ZHOU, J. Expression patterns of insulin-like growth factor-binding proteins 1, 2, 3, 5, and 6 in the mid-cycle monkey ovary. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 87, n. 11, p. 5220-8, 2002.

ASHKENAZI, H.; CAO, X.; MOTOLA, S.; POPLIKER, M.; CONTI, M.; TSAFRIRI, A. Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response. **Endocrinology**, v. 146, n. 1, p. 77-84, 2005.

BAERWALD, A. R.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A. Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: a review. **Human Reproduction update**, v. 18, n. 1, p. 73-91, 2012.

BAKER, T. G. A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character. Royal Society**, v. 158, p. 417-33, 1963.

BANWELL, K. M.; THOMPSON, J. G. In vitro maturation of Mammalian oocytes: outcomes and consequences. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 26, n. 2, p. 162-74, 2008.

BARKER, G. A.; ELLORY, J. C. The identification of neutral amino acid transport systems. **Experimental Physiology**, v. 75, p. 3-26, 1990.

BAUMGARTEN, S. C.; CONVISSAR, S. M.; FIERRO, M. A.; WINSTON, N. J.; SCOCCIA, B.; STOCCO, C. IGF1R Signaling Is Necessary for FSH-Induced Activation of AKT and Differentiation of Human Cumulus Granulosa Cells. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 99, p. 2995-3004, 2014.

BINELLI, M.; MURPHY, B. D. Coordinated regulation of follicle development by germ and somatic cells. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, p. 1-12, 2010.

BLEIL, J.; WASSARMAN, P. M. Structure and Function of the Zona Pellucida: Identification and Characterization of the Proteins of the Mouse Oocyte's Zona Pellucida. **Biology**, v. 76, p. 185-202, 1980.

BLOCK, E. Quantitative morphological investigations of the follicular system in women: variations in the different phases of the sexual cycle. **Acta Endocrinologica**, v. 8, p. 33-54, 1951.

BOS-MIKICH, A.; FERREIRA, M.; HÖHER, M.; FRANTZ, G.; OLIVEIRA, N.; DUTRA, G.; FRANTZ, N. Fertilization outcome, embryo development and birth after unstimulated IVF. **Journal Assisted Reproduction Genetic**, v. 28, p. 107-110, 2011.

BRECKWOLDT, A.; MSELVARAJ, N.; AHARONI, D.; BARASH, A.; SEGAL, I.;

LNSLER, V.; AMSTERDAM, A. Expression of Ad4-BP/cytochrome P450 side chain cleavage enzyme and induction of cell death in long-term cultures of human granulosa cells, **Molecular Human Reproduction**, v.2 n.6, p. 391-400, 1996.

BYSKOV, A. G; FADDY, J. M.; LEMMEN, J. G.; ANDERSEN, C.Y. Eggs forever? **Differentiation; Research in Biological Diversity**, v. 73, n. 9-10, p. 438-46, 2005.

CAMP, T. A.; RAHAL, J. O.; MAYO, K. E. Cellular localization and hormonal regulation of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger RNAs in the rat ovary. **Molecular Endocrinology**, v. 5, p. 1405–1417, 1991.

CASTAGNA, M.; SHAYAKUL, C.; TROTTI, D.; SACCHI, V. F.; HARVEY, W. R.; HEDIGER, M. A. Molecular characteristics of mammalian and insect amino acid transporters: implications for amino acid homeostasis. **The Journal of Experimental Biology**, v. 200, n. Pt 2, p. 269-86, 1997.

CETICA, P.; PINTOS, L.; DALVIT, G.; BECONI, M. Involvement of enzymes of amino acid metabolism and tricarboxylic acid cycle in bovine oocyte maturation in vitro. **Reproduction**, v. 126, p. 753-763, 2003.

CHA, K. Y.; KOO, J. J.; KO, J. J, CHOI, D. H.; HAN S. Y; YOON, T. K. Pregnancy after In Vitro fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture In Vitro and their transfer in a donor oocyte program. **Fertility and Sterility**, v. 55, p.109-113, 1991.

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.

CHAND, A. L.; LEGGE, M. Amino acid transport system L activity in developing mouse ovarian follicles. **Human Reproduction**, v. 26, n. 11, p. 3102-8, 2011.

CHIAN, R. C. In-vitro maturation of immature oocytes for infertile women with PCOS. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 8, n. 5, p. 547-52, 2004.

CHIAN, R. C.; BUCKETT, W. M.; TULANDI, T.; TAN, S. L. Prospective randomized study of human chorionic gonadotrophin priming before immature oocyte retrieval from unstimulated women with polycystic ovarian syndrome. **Human Reproduction**, v. 15, p. 165–170, 2000.

CHRISTENSEN, H. N.; OXENDER, D. L.; LIANG, M.; VATZ, K. A. The Use of N-Methylation to Direct Route of Mediated Transport of Amino Acids. **Journal Biological Chemistry**, v. 240, p. 3609–3616, 1965.

CLEMENT, F.; MONNIAUX, D. Multiscale modelling of ovarian follicular selection. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 113, n. 3, p. 398-408, 2013.

COLLADO-FERNANDEZ, E.; PICTON, H. M.; DUMOLLARD, R. Metabolism throughout follicle and oocyte development in mammals **International Journal Development Biology**, v. 56, p. 799-808, 2012.

COLONNA, R. CECCONI, S.; BUCCIONE, R.; MANGIA, F. Amino acid transport systems in growing mouse oocytes. **Cell Biology International Reports**, v. 7, n. 12, p. 1007-15, 1983.

COLONNA, R.; MANGIA, F. Mechanisms of Amino Enclosed Oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 803, p. 797-803, 1983.

COLONNA, R.; CECCONI, S.; BUCCIONE, R.; MANGIA, F. Stage-dependent modifications of amino acid uptake by antral and metaphase II mouse oocytes. **Cell Biology International Reports**, v. 8, n. 1, p. 3-10, 1984.

COMBELLES, C. M.; CEKLENIK, N. A.; RACOWSKY, C., ALBERTINI, D. F. Assessment of nuclear and cytoplasmic maturation in in-vitro matured human oocytes. **Human Reproduction**, v. 17, n. 4, p.1006-16, 2002.

CONTI, M.; HSIEH, M.; PARK, J. Y.; SU, Y. Q. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. **Molecular Endocrinology**, v. 20, n. 4, p. 715–723, 2006.

COOB, M. Generation: the Seventeenth Century Scientists who Unraveled the Secrets of Sex, Life and Growth. **New York: Bloomsbury Publishing**, 2006.

CRAIG, J.; ORISAKA, M.; WANG, H.; ORISAKA, S.; THOMPSON, W.; ZHU, C.; KOTSUJI, F.; TSANG, B. K. Gonadotropin and intra-ovarian signals regulating follicle development and atresia: the delicate balance between life and death. **Frontiers in Bioscience**, v. 12, p. 3628–39, 2007.

DA CRUZ C. A.; WASSERMANN, G. F. Identification of Amino Acid Transport Systems Stimulated by FSH in Rat Testes. **Journal Endocrinology**, v. 106, p. 291–294, 1985.

DAL CANTO, M.; BRAMBILLASCA, F.; MIGNINI RENZINI, M.; COTICCHIO, G.; MEROLA, M.; LAIN, M.; DE PONTI, E.; FADINI, R. Cumulus cell-oocyte complexes retrieved from antral follicles in IVM cycles: relationship between COCs morphology, gonadotropin priming and clinical outcome. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 29, p. 513-519, 2012.

DEMIRTAS, E.; ELIZUR, S. E; HOLZER, H.; GIDONI, Y.; SON, W. Y.; CHIAN, R. C.; TAN, S. L. Immature oocyte retrieval in the luteal phase to preserve fertility in cancer patients. **Reproduction Biomedicine Online**, v.17, n. 4, p. 520-3, 2008.

DEMEESTERE, I.; GERVY, C.; CENTNER, J.; DEVREKER, F.; ENGLERT, Y.; DELBAERE, A. Effect of insulin-like growth factor-I during preantral follicular culture on steroidogenesis, in vitro oocyte maturation, and embryo development in mice. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 6, p. 1664-9, 2004.

DE MOURA, M. D.; CHOI, D.; ADASHI, E. Y.; PAYNE, D. W. Insulin-like growth factor-I mediated amplification of follicle-stimulating hormone- supported progesterone accumulation by cultured rat granulosa cells: enhancement of steroidogenic enzyme activity and expression. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 946–953, 1997.

DENNEFORS, B. L.; HAMBERGER, L.; NILSSON, L. Influence of human chorionic gonadotropin *in vivo* on steroid formation and gonadotrophin responsiveness of isolated human preovulatory follicular cells. **Fertility and Sterility**, v. 39, p. 56-61, 1983.

DIAZ, F. J.; WIGGLESWORTH, K.; EPPIG, J. J. Oocytes determine cumulus cell lineage in mouse ovarian follicles. **Journal of Cell Science**, v. 120, p.1330 –1340, 2007.

DIMATTINA, M.; ALBERTSON, B.; SEYLER, D. E.; LORIAUX, D. L.; FALK, R. J. Effect of the antiprogestin RU486 on progesterone production by cultured human granulosa cells: inhibition of the ovarian 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. **Contraception**, v. 34 (2), p. 199–206, 1986.

DONG, J.; ALBERTINI, D. F.; NISHIMORI, K.; KUMAR, T. R.; LU, N.; MATZUK M. M. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. **Nature**, v. 383, n. 6600, p. 531-5, 1996.

DE LOS SANTOS, M. J.; TARIN, J. J.; GOMEZ, B.; Daily measurements and in-vitro effects of human chorionic gonadotrophin in the early luteal phase. **Human Reproduction**, v. 8, p. 2047-2051, 1993.

EDEN, J.A.; JONES, J.; CARTER, G. D.; ALAGHBAND-ZADEH, J. A comparison of follicular fluid levels of insulin-like growth factor-1 in normal dominant and cohort follicles, polycystic and multicystic ovaries. **Clinical Endocrinology**, v.29,p. 327-336, 1988.

EDSON, M. A.; NAGARAJA, A. K.; MATZUK, M. M. The mammalian ovary from genesis to revelation. **Endocrine reviews**, v. 30, n. 6, p. 624-712, 2009.

EDWARDS, R. G. Maturation in vitro of Mouse, Sheep, Cow, Pig, Rhesus Monkey and Human Ovarian Oocytes. **Nature**, v. 208, n. 5008, p. 349-351, 1965.

EIMERL, S.; ORLY, J. Regulation of steroidogenic genes by insulin-like growth factor-I and follicle stimulating hormone: differential responses of cytochrome CYP19, steroidogenic acute regulatory protein and 3 $\beta$ HSD/ isomerase in rat granulosa cells. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 900–910, 2002.

EL-ROEIY, A. Expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II and the IGF-I, IGF-II, and insulin receptor genes and localization of the gene products in the human ovary. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 77, n. 5, p. 1411-1418, 1993.

ELVIN, J. A.; MATZUK, M. M. Mouse models of ovarian failure. **Reviews of Reproduction**, v. 3, n. 3, p. 183-95,1998.

EPPIG, J. J. Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. **BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 13, n. 11, p. 569-74, 1991.

EPPIG, J. J.; SCHROEDER, A. C.; O'BRIEN, M. J. Developmental capacity of mouse oocytes matured in vitro: effects of gonadotrophic stimulation, follicular origin and oocyte size. **Reproduction**, v. 95, n. 1, p. 119-127, 1992.

EPPIG, J. J.; WIGGLESWORTH, K.; PENDOLA, F.; HIRAO, Y. Murine oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 976–984, 1997.

EPPIG, J. J.; PENDOLA, F. L.; WIGGLESWORTH, K.; PENDOLA, J. K. Mouse oocytes regulate metabolic cooperativity between granulosa cells and oocytes: amino acid transport. **Biology of Reproduction**, v. 73, n. 2, p. 351-7, 2005.

ERICKSON, G. F.; GARZO, V. G.; MAGOFFIN, D. A. Insulin-like growth factor-I regulates aromatase activity in human granulosa and granulosa luteal cells. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 69, p. 716–724, 1989.

ERICKSON, G. F.; GARZO, V. G.; MAGOFFIN, D. A. Progesterone production by human granulosa cells cultured in serum free medium: effects of gonadotrophins and insulin-like growth factor I (IGF-I). **Human Reproduction**, v. 6, p. 1074–1081, 1991.

FADINI, R.; DAL CANTO, M. B.; MIGNINI RENZINI, M.; BRAMBILLASCA, F.; COMI, R.; FUMAGALLI, D.; LAIN, M.; MEROLA, M.; MILANI, R.; DE PONTI, E. Effect of different gonadotrophin priming on IVM of oocytes from women with normal ovaries: a prospective randomized study. **Reproductive Biomedicine Online**, v.19, p. 343–351, 2009.

FITZPATRICK, S. L.; RICHARDS, J. S. Regulation of cytochrome P450 aromatase messenger ribonucleic acid and activity by steroids and gonadotropins in rat granulosa cells. **Endocrinology**, v. 129, p., 1452–1462, 1991.

FITZPATRICK, S. L.; CARLONE, D. L.; ROBKER, R. L.; RICHARDS, J. S. Expression of aromatase in the ovary: down-regulation of mRNA by the ovulatory luteinizing hormone surge. **Steroids**, v. 62, n. 1, p. 197–206, 1997.

FRANTZ, N.; BOS-MIKICH, A.; FRANTZ, G.; HÖHER, M.; FERREIRA, M. Gravidez após a maturação in vitro de oócitos obtidos sem estimulação hormonal em paciente com ovários policísticos. **Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida**, v.7, p. 12:45, 2008.

FUNSTON, R. N., SEIDEL, G. E., KLINDT, J.; ROBERTS, A. J. Insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor-binding proteins in bovine serum and follicular fluid before and after the preovulatory surge of luteinizing hormone. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 1390–1396, 1996.

GALLOWAY, S. M.; MCNATTY, K. P.; CAMBRIDGE, L.M.; LAITINEN, M.P.; JUENGEL, J. L.; JOKIRANTA, T. S.; MCLAREN, R. J.; LUIRO, K.; DODDS, K. G.; MONTGOMERY, T. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. **Nature genetics**, v. 25, n. 3, p. 279-83, 2000.



GEISTHOVEL, F.; MORETTI-ROJAS, I.; ASCH, R. H.; ROJAS, F. J. Expression of insulin-like growth factor-II (IGF-II) messenger ribonucleic acid (mRNA), but not IGF-I mRNA, in human preovulatory granulosa cells. **Human Reproduction**, v. 4, n. 8, p. 899-902, 1989.

GENC, G.; YILMAZ, N.; UYGUR, D.; DOGAN, M.; MOLLAMAHMUTOGLU, L. The effect of intrafollicular IGF 1 and IGFBP 3 on IVF outcome in patients using different gonadotropins: a prospective study. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 28, n. 5, p. 405-10, 2011.

GILCHRIST, R. B.; RITTER, L. J.; ARMSTRONG, D. T. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 431-46, 2004.

GILCHRIST, R. B.; LANE, M.; THOMPSON, J. G. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. **Human Reproduction Update**, v. 14, n. 2, p. 159-77, 2008.

GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; BERGFELT, D. R.; DONADEU, F. X.; KOT, K. Follicle selection in monovular species. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 3, p. 638-47, 2001.

GIUDICE, L. C.; MILKI, A. A.; MILKOWSKI, D.A.; EL DANASOURI, I. Human granulosa contain messenger ribonucleic acids encoding insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs) and secrete IGFBPs in culture. **Fertility and Sterility**, v. 56, p. 475-480, 1991.

GOUGEON, A. Qualitative changes in medium and large antral follicles. **Biologie Animale Boquemie Biophysique**, v. 19, n. 5, p. 1461-1468, 1979.

GOUGEON, A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. **Human Reproduction**, v. 1, n. 2, p. 81-87, 1986.

GOUGEON, A. Regulation of Ovarian Follicular Development in Primates: Facts and Hypotheses. **Endocrine Reviews**, v. 17, n. 2, p. 121-155, 1996.

GOUGEON, A. Dynamics of human follicular growth: morphologic, dynamic and functional aspects. **The ovary, second edition**, 2004.

GREMEAU, A. S.; ANDREADIS, N.; FATUM, M.; CRAIG, J.; TURNER, K.; MCVEIGH, E.; CHILD, T. *In vitro* maturation or *in vitro* fertilization for women with polycystic ovaries? A case-control study of 194 treatment cycles. **Fertility and Sterility**, v. 98, p. 355-360, 2012.

GRIFFIN, J.; EMERY, B. R.; HUANG, I.; PETERSON, C. M.; CARRELL, D. T. Comparative analysis of follicle morphology and oocyte diameter in four mammalian species (mouse, hamster, pig, and human). **Journal Experimental of Clinical Assisted Reproduction**, v. 3, p. 2, 2006.

GRØNDAHL, C. Oocyte maturation. **Danish Medical Bulletin**, v. 55, p. 1-16, 2008.

GUTIERREZ, C. G.; CAMPBELL, B. K.; WEBB, R. Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of 17 $\beta$ -estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 608–16, 1997(a).

GUTIERREZ, C. G.; GLAZYRIN, A. L.; ROBERTSON, G. W.; CAMPBELL, B. K.; GONG, J. G.; BRAMLEY, T. A. Ultra-structural characteristics of bovine granulosa cells associated with maintenance of 17 $\beta$ -estradiol production in vitro. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 31, p. 51–8, 1997(b).

HAGHIGHAT, N.; VAN WINKLE, L. J. Developmental change in follicular cell-enhanced amino acid uptake into mouse oocytes that depends on intact gap junctions and transport system Gly. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 253, n. 1, p. 71–82, 1990.

HAMORI, M.; BLUM, W. F.; TOROK, A.; STEHLE, R.; WAIBEL, E.; CLEDON, P.; RANKE, M. B. Insulin-like growth factors and their binding proteins in human follicular fluid. **Human Reproduction**, v. 6, p. 313–318, 1991.

HARRIS, S. E.; LEESE, H. J.; GOSDEN, R. G.; PICTON, H. M. Pyruvate and oxygen consumption throughout the growth and development of murine oocytes. **Molecular Reproduction Device**, v. 76(3); p. 231–8, 2009.

HASTIE, P. M.; HARESIGN, W. Modulating peripheral gonadotrophin levels affects follicular expression of mRNAs encoding insulin-like growth factors and receptors in sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 109, p. 110–123, 2008.

HAVELOCK, J. C.; RAINEY, W. E.; CARR, B. R. Ovarian granulosa cell lines. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 228 (1–2), p. 67–78, 2004.

HERNANDEZ, E. R.; HURWITZ, A.; VERA, A.; PELLICER, A.; ADASHI, E. I.; LEROITH, D.; ROBERTS, C. T. Expression of the genes encoding the insulin-like growth factors and their receptors in the human ovary. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 74, n. 2, p. 419–25, 1992.

HILLENSJÖ, T.; BERGH, C.; SELLESKOG, U. Insulin-like growth factor-I stimulates amino acid accumulation in cultured human granulosa cells. **Human Reproduction**, v. 7, p. 1094–97, 1992.

HILLIER, S. G., Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 179, n. 1–2, p. 39–46, 2001.

HSUEH, A. J.; MCGEE, E. A.; HAYASHI, M.; HSU, S. Y. Hormonal regulation of early follicle development in the rat ovary. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 163 (1–2), p. 95–100, 2000.

HU, C. L.; COWAN, R. G.; HARMAN, R. M.; QUIRK, S. M. Cell cycle progression and activation of Akt kinase are required for insulin-like growth factor I mediated suppression of apoptosis in granulosa cells. **Molecular Endocrinology**, v. 19, p. 326–

338, 2004.

HYDE, R.; PEYROLLIER, K.; HUNDAL, H. S. Insulin Promotes the Cell Surface Recruitment of the SAT2/ATA2 System A Amino Acid Transporter from an Endosomal Compartment in Skeletal Muscle Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 16, n. April 19, p. 13628-13634, 2002.

IZADYAR, F.; ZEINSTRA, E.; BEVERS, M. M. Follicle-stimulating hormone and growth hormone act differently on nuclear maturation while both enhance developmental competence of in vitro matured bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 51, n. 3, p. 339-45, 1998.

JACOBUS, A. P.; LOSS, E. S.; WASSERMANN, G. F. Pertussis toxin nullifies the depolarization of the membrane potential and the stimulation of the rapid phase of  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  entry through L-type calcium channels that are produced by follicle stimulating hormone in 10- to 12-day-old rat Sertoli cells. **Frontiers in Physiology**, v. 1, p. 1-11, 2010.

JONES, J. I.; CLEMMONS, D. R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. **Endocrine Reviews**, v. 16, p. 3–34, 1995.

KEDEM-DICKMAN, A.; MAMAN, E.; YUNG, Y.; YERUSHALMI, G. M.; HEMI, R.; HANOCHI, M.; DOR, J.; HOURVITZ, A. Anti-Müllerian hormone is highly expressed and secreted from cumulus granulosa cells of stimulated preovulatory immature and atretic oocytes. **Reproductive Biomedicine Online**, v.24(5), p. 540-546, 2012.

KAWAI, T.; MIHARA, T.; KAWASHIMA, I.; FUJITA, Y.; IKEDA, C.; NEGISHI, H.; RICHARDS, J. S.; SHIMADA, M. Endogenous acetaldehyde toxicity during antral follicular development in the mouse ovary. **Reproductive Toxicology**, v. 33, n. 3, p. 322–330, 2012.

KLEIN, N. A.; BATTAGLIA, D. E.; MILLER, P. B.; BRANIGAN, E. F.; GIUDICE, L. C.; SOULES, M. R. Ovarian follicular development and the follicular fluid hormones and growth factors in women of advanced reproductive age. **Journal Clinical of Endocrinology and Metabolism**, v. 81, p. 1946-1951, 1996.

KOMAR, C. M.; BERNDTSON, A. K.; EVANS, A. C.; FORTUNE, J. E. Decline in circulating  $17\beta$ -estradiol during the periovulatory period is correlated with decreases in  $17\beta$ -estradiol and androgen, and in messenger RNA for P450 aromatase and P450  $17\beta$ -hydroxylase, in bovine preovulatory follicles. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1797–805, 2001.

LANGHOUT, D. J.; SPICER, L. J.; GEISERT, R. D. Development of a culture system for bovine granulosa cells: effects of growth hormone,  $17\beta$ -estradiol, and gonadotropins on cell proliferation, steroidogenesis, and protein synthesis. **Journal of Animal Science**, v. 69, p. 3321–34, 1991.

LIN, Y. H., HWANG, J. L., HUANG, L. W. Combination of FSH priming and hCG priming for in-vitro maturation of human oocytes. **Human Reproduction**, v. 18, p.

1632-1636, 2003.

LINDEBERG, M.; CARLSTROM, K.; RITVOS, O.; HOVATTA, O. Gonadotrophin stimulation of non-luteinized granulosa cells increases steroid production and the expression of enzymes involved in estrogen and progesterone synthesis. **Human Reproduction**, v. 22 (2), p. 401–406, 2007.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; LEWIS FARR, A.; RANDALL, R. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MAGOFFIN, D. A.; WEITSMAN, S. R. Insulin-like growth factor-I regulation of luteinizing hormone (LH) receptor messenger ribonucleic acid expression and LH-stimulated signal transduction in rat ovarian theca-interstitial cells. **Biology of Reproduction**, v. 51, n. 4, p. 766-75, 1994.

MAKAREVICH, A. V; MARKKULA, M. Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during in vitro maturation and culture. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 2, p. 386-92, 2002.

MANI, A. M.; FENWICK1, M. A.; CHENG, Z.; SHARMA, M. K.; SINGH, D.; WATHES, D. C. IGF1 induces up-regulation of steroidogenic and apoptotic regulatory genes via activation of phosphatidylinositol- dependent kinase/AKT in bovine granulosa cells. **Reproduction**, 139 139–15, 2010.

MARUO, T.; HAYASHI, M.; MATSUO, H.; UEDA, Y.; MORIKAWA, H.; MOCHIZUKI, M. Comparison of the facilitative roles of insulin and insulin-like growth factor I in the functional differentiation of granulosa cells: in vitro studies with the porcine model. **Acta Endocrinology**, v. 117, p. 230 –240, 1988.

MASON, H. D.; MARGARA, R.; WINSTON, R. M.; SEPPALA, M.; KOISTINEN, R.; FRANKS, S. J. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) inhibits production of IGF-binding protein-1 while stimulating 17 $\beta$ -estradiol secretion in granulosa cells from normal and polycystic human ovaries. **Clinic and Endocrinology Metabolism**, v. 76, p. 1275-9, 1993.

MATSUDA, F.; INOUE, N.; MANABE, N.; OHKURA, S. Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. **Journal of Reproduction and Development**, v. 58, p. 44–50, 2012.

MCGIVAN, J. D.; PASTOR-ANGLADA, M. Regulatory and Molecular Aspects of Mammalian Amino Acid Transport. **Biochemistry Journal**, v. 299 (Pt 2), p. 321–334, 1994.

MENON, B.; SINDEN, J.; FRANZO-ROMAIN, M.; BOTTA, R. B.; MENON, K. M. Regulation of LH receptor mRNA binding protein by miR-122 in rat ovaries. **Endocrinology**, v. 154, p. 4826–4834, 2013.

MONGA, R.; SHARMA, I.; DATTA, T. K.; SINGH, D. Characterization of serum-free buffalo granulosa cell culture and analysis of genes involved in terminal

differentiation from FSH- to LH-responsive phenotype. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 41 (4), p. 195–206, 2011.

MONGET, P.; MONNIAUX, D.; PISSELET, C.; DURAND, P. Changes in insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-II and their binding proteins during growth and atresia of ovine ovarian follicles. **Endocrinology**, v. 132; p. 1438–1446, 1993.

MONGET, P.; FABRE, S.; MULSANT, P.; LECERF, F.; ELSEN, J. M.; MAZERBOURG, S.; PISSELET, C.; MONNIAUX, D. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. **Domestic animal endocrinology**, v. 23, n. 1-2, p. 139-54, 2002.

MOTTA, P. M.; MAKABE, S.; NAGURO, T.; CORRER, S. Oocyte follicle cells association during development of human ovarian follicle. A study by high resolution scanning and transmission electron microscopy. **Archives of Histology and Cytology**, v. 57, p. 369–394, 1994.

MUÑOZ-GUTIÉRREZ, M.; FINDLAY, P. A.; ADAM, C. L.; WAX, G.; CAMPBELL, B. K.; KENDALL, N. R.; KHALID, N.; FORSBERG, M.; SCARAMUZZI, R. J. The ovarian expression of mRNAs for aromatase, IGF-I receptor, IGF-binding protein-2, -4 and -5, leptin and leptin receptor in cycling ewes after three days of leptin infusion. **Reproduction**, v. 130, n. 6, p. 869-81, 2005.

NARDO, L. G.; BELLANCA, S. A.; BURRELLO, N.; LONGO, G.; D'AGATA, R.; NARDO, F.; CALOGERO, A. E. Concentrations of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF binding protein-3 in the follicular fluid of women undergoing ovarian hyperstimulation with different gonadotropin preparations. **Gynecological Endocrinology**, v. 15, n. 6, p. 413-20, 2001.

NAGASHIMA, T.; KIM, J.; LI, Q.; LYDON, J. P.; DEMAYO, F. J.; LYONS, K. M.; MATZUK, M. M. Connective tissue growth factor is required for normal follicle development and ovulation. **Molecular Endocrinology**, v. 25, n. 10, p. 1740–1759, 2011.

NAVALAKHE, R. M.; JAGTAP, D. D.; NAYAK, S. U., NANDEDKAR, T. D.; MAHAL, S. D. Effect of FSH Receptor-Binding Inhibitor-8 on FSH- Mediated Granulosa Cell Signaling and Proliferation. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 82, p. 178–188, 2013.

NOGUEIRA, D.; STAESSEN, C.; VAN DE VELDE, H.; VAN STEIRTEGHEM, A. Nuclear status and cytogenetics of embryos derived from In Vitro matured oocytes. **Fertility and Sterility**, 74:295-8, 2000.

OONK, R. B.; PARKER, K. L.; GIBSON, J. L.; RICHARDS, J. S. Rat cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450 (P-450<sub>scc</sub>) gene. Structure and regulation by cAMP in vitro. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 265, p. 22392–22401, 1990.

OOSTERHUIS, G. J.; VERMES, I.; LAMBALK, C. B.; MICHGELSEN, H. W.; SCHOEMAKER, J. G. J. Insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF binding protein-3 concentrations in fluid from human stimulated follicles. **Human Reproduction**, v. 13,

n. 2, p. 285-9, 1998.

OPHIR, L.; YUNG, Y.; MAMAN, E.; RUBINSTEIN, N.; YERUSHALMI, G. M.; HAAS, J.; BARZILAY, E.; HOURVITZ, A. Establishment and validation of a model for non-luteinized human mural granulosa cell culture. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 384 p. 165–174, 2014.

O'SHAUGHNESSY, P. J.; DUDLEY, K.; RAJAPAKSHA, W. R. Expression of follicle stimulating hormone-receptor mRNA during gonadal development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 125, p. 169–175, 1996.

OTSUKA, F.; YAMAMOTO, S.; ERICKSON, G. F.; SHIMASAKI, S. Bone Morphogenetic Protein-15 Inhibits Follicle-stimulating Hormone (FSH) Action by Suppressing FSH Receptor Expression. **The American Society for Biochemistry and Molecular Biology**, v. 276, n. 14, p. 11387–11392, 2001.

PELLAND, A. M. D.; CORBETT, H. E.; BALTZ, J. M. Amino Acid transport mechanisms in mouse oocytes during growth and meiotic maturation. **Biology of Reproduction**, v. 81, n. 6, p. 1041-54, 2009.

PÉREZ-SÁNCHEZ, V. H.; WASSERMANN, G. F. Amino acid transport in rat Sertoli cell enriched testes: studies on the mechanism of action of follicle stimulating hormone. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.14, p. 11–17, 1981.

PICTON, H.; BRIGGS, D.; GOSDEN, R. The molecular basis of oocyte growth and development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 145, n. 1-2, p. 27-37, 25, 1998.

PORETSKY, L.; CATALDO, N. A.; ROSENWAKS, Z.; GIUDICE, L. C. The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease. **Endocrine Reviews**, v. 20, n. 4, p. 535-82, 1999.

QU, J.; GODIN, P. A.; NISOLLE, M.; DONNEZ, J. Expression of receptors for insulin-like growth factor-I and transforming growth factor-beta in human follicles. **Molecular Human Reproduction**, v. 6, n. 2, p. 137-45, 2000.

RABINOVICI, I.; DANDEKAR, P.; ANGLE, M. J.; ROSENTHAL, S.; MARTIN, M. C. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) levels in follicular fluid from human pre-ovulatory follicles: Correlation with serum IGF- I levels. **Fertility and Sterility**, v. 54, p. 428-433, 1990.

RICE, S.; OJHA, K.; MASON, H. Human ovarian biopsies as a viable source of pre-antral follicles. **Human Reproduction**, v. 23, p. 600–605, 2008.

RICHARDS, J. S. Hormonal Control of Gene Expression in the Ovary. **Endocrine Reviews**, v. 15, n. 6, p. 725-751, 1994.

RIENZI, L.; Balaban, B; Ebner, T.; Mandelbaum, J. The oocyte. **Human Reproduction**, v. 27, p. i2-21, 2012.

RYAN, K. E.; GLISTER, C.; LONERGAN, P.; MARTIN, F.; KNIGHT, P. G.; EVANS, A. C. Functional significance of the signal transduction pathways Akt and Erk in ovarian follicles: in vitro and in vivo studies in cattle and sheep. **Journal of Ovarian Research**, v.1, p. 2-14, 2008.

SALOBIR, B.; PREZELJ, J.;MEDEN-VRTOVEC, H.;KOCIJANCIC, A.; OSREDKAR, J. Insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) serum concentrations and ovarian responsiveness in in-vitro fertilization. **Human Reproduction**, v. 11, n. 10, p. 2208-10, 1996.

SASSON, R.; RIMON, E.; DANTES, A.; COHEN, T.; SHINDER, V.; LANDBRACHA, A.; AMSTERDAM, A. Gonadotrophin-induced gene regulation in human granulosa cells obtained from IVF patients. Modulation of steroidogenic genes, cytoskeletal genes and genes coding for apoptotic signalling and protein kinases. **Molecular Human Reproduction**, v. 10, n. 5, p. 299–311, 2004.

SCHULTZ, R. M.; MONTGOMERY, R. R.; BELANOFF, J. R. Regulation of mouse oocyte meiotic maturation: implication of a decrease in oocyte cAMP and protein dephosphorylation in commitment to resume meiosis. **Developmental Biology**, v. 97, n. 2, p. 264-73, 1983.

SILVA, F. R. M. B.; WASSERMANN, G. F. Kinetics of FSH Stimulation of Methylaminoisobutyric Acid Uptake in Sertoli Cells in Culture from Testes of 15-Day-Old Rats. **Medical Science Research**, v. 27, p. 627– 630, 1999.

SILVA, J. R. V; FIGUEIREDO, J. R.; VAN DEN HURK, R. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. **Theriogenology**, v. 71, n. 8, p. 1193-208, 2009.

SIMON, A. M.; GOODENOUGH, D. A.; LI, E.; PAUL, D. L. Female infertility in mice lacking connexin 37. **Nature**, v.385, p. 525–529,1997.

SIROTKIN, A. V.; SCHAEFFER, H. J.; MLYNCEK, M. Oxytocine affects the release of steroids, insulin-like growth factor-I, prostaglandin F2a and cyclic nucleotides by human granulosa cells *in vitro*. **Human Reproduction**,v. 11, p. 152-155, 1996.

SMITZ, J. E.; THOMPSON, J. G.; GILCHRIST, R. B. The promise of in vitro maturation in assisted reproduction and fertility preservation. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 29, p. 24-37, 2011.

SPICER, L. J.; CONVEY, E. M.; LEUNG, K.; SHORT, R. E.; TUCKER, H. A. Anovulation in postpartum suckled beef cows. II. Associations among binding of 125I-labeled gonadotropins in granulosa and thecal cells, and concentrations of steroids in serum and various sized ovarian follicles. **Journal of Animal Science**, v. 62, p. 742–50, 1986.

SPICER, L. J.; ALPIZAR, E.; ECHTERNKAMP, S. E. Effects of insulin, insulin-like growth factor-I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, 17 $\beta$ -estradiol production, and/or insulin-like growth factor-I production *in vitro*. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 1232–41, 1993.

SPICER, L. J.; ALPIZAR, E.; VERNON, R. K. Insulin-like growth factor-I receptors in ovarian granulosa cells: effect of follicle size and hormones. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 102, p. 69–76, 1994.

SPICER, L. J.; ECHTERNKAMP, S. E. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 12, n. 3, p. 223-45, 1995.

SPICER, L. J.; CHAMBERLAIN, C. S. Influence of cortisol on insulin-like growth factor-I (IGF-I)-induced steroid production and on IGF-I receptors in cultured bovine granulosa cells and thecal cells. **Endocrine**, v. 9, p. 153– 61, 1998.

SPICER, L. J.; ALVAREZ, P.; PRADO, T. M.; MORGAN, G. L.; HAMILTON, T. D. Effects of intraovarian infusion of insulin-like growth factor-I on ovarian follicular function in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 18, n. 2, p. 265-78, 2000.

SPICER, L. J. Receptors for insulin-like growth factor-I and tumor necrosis factor are hormonally regulated in bovine granulosa and thecal cells. **Animal Reproduction Science**, v. 67, p. 45–58, 2001.

SPICER, L. J.; CHAMBERLAIN, C. S.; MACIEL, S. M. Influence of gonadotropins on insulin- and insulin-like growth factor-I (IGF-I)-induced steroid production by bovine granulosa cells. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 22, p. 237–254, 2002.

STOCCO, C. Aromatase expression in the ovary: hormonal and molecular regulation. **Steroids**, 73:473– 487, 2008.

STUBBS, S.; ZACHERY-JENNINGS, C.; MARGARA, R.; TREW, G. W.; FRANKS, S.; HARDY, K. The effect of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on initiation of human follicle growth in vitro. **Endocrine Abstracts**, v. 5, p. 204, 2003.

SU, Y. Q.; SUGIURA, K.; LI, Q.; WIGGLESWORTH, K.; MATZUK, M. M.; EPPIG, J. J. Mouse oocytes enable LH-induced maturation of the cumulus-oocyte complex via promoting EGF receptor-dependent signaling. **Molecular Endocrinology**, v. 24, n. 6, p. 1230– 1239, 2010.

SUN, G. W.; KOBAYASHI, H.; SUZUKI, M.; KANAYAMA, N.; TERAO, T. Follicle- stimulating hormone and insulin-like growth factor I synergistically induce up-regulation of cartilage link protein (Crtl1) via activation of phosphatidylinositol-dependent kinase/Akt in rat granulosa cells. **Endocrinology**, v. 144, p. 793–801, 2003.

SUTTON-MCDOWALL, M. L.; GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. **Reproduction**, v. 139, p. 685-695, 2010.

TAN, S. L.; CHILD, T. J. In-vitro maturation of oocytes from unstimulated polycystic ovaries. **Reproduction Biomedicine Online**, v. 4, p. 18–23, 2002.



THOMAS, F. H.; CAMPBELL, B. K.; ARMSTRONG, D. G.; TELFER, E. E. Effects of IGF-I bioavailability on bovine preantral follicular development in vitro. **Reproduction**, v. 133, n. 6, p. 1121-8, 2007.

TILLY, J. L.; KOWALSKI, K. I.; JOHNSON, A. X.; HSUEH, A. J. W. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. **Endocrinology**, v. 129, p. 2799-2801, 1991.

TOMEK, W.; TORNER, H.; KANITZ, W. Comparative analysis of protein synthesis, transcription and cytoplasmic polyadenylation of mrna during maturation of bovine oocytes in vitro. **Reproduction of Domestic Animal**, v. 37, p. 86-91, 2002.

TONER, J. Age x egg quality, FSH level x egg quantity. **Fertility and Sterility**, v. 79, p. 491, 2003.

TROUNSON, A.; ANDERIESZ, C.; JONES, G. Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. **Reproduction**, v. 121, n. 1, p. 51-75, 2001.

TSUCHIYA, M.; MINEGISHI, T.; KISHI, H.; TANO, M.; KAMEDA, T.; HIRAKAWA, T.; IBUKI, Y.; MIZUTANI, T.; MIYAMOTO, K. Control of the expression of luteinizing hormone receptor by local factors in rat granulosa cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 367, n. 2, p. 185-92, 1999.

UI, M.; SHIMONAKA, M.; SHIMASAKI, S.; LING, N. An insulin-like growth factor-binding protein in ovarian follicular fluid blocks follicle-stimulating hormone-stimulated steroid production by ovarian granulosa cells. **Endocrinology**, v. 125, p. 912-916, 1989.

URBAN, R. J.; SHUPNIK, A. M.; BODENBURG, Y. H. The insulin-like growth factor-I increases expression of porcine P-450 cholesterol side chain cleavage gene through a GC-rich domain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 25761-25769, 1994.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1717-51, 2005.

VENDOLA, K.; ZHOU, J.; WANG, J.; FAMUYIAWA, O. A.; BIEVRE, M.; BONDY, C. A. Androgens promote oocyte insulin-like growth factor I expression and initiation of follicle development in the primate ovary. **Biology of Reproduction**, v. 61, n. 2, p. 353-7, 1999.

VIREQUE, A. A.; CAMPOS, J. R.; CAMPOS, C. O. BERNUCI, M. P.; JAMUR, M. C.; FERRIANI, R. A.; SÁ, M. F. S.; SILVA, A. C. J. S. R; Cultura de células da granulosa humanas com fenótipo de fase folicular: influência do sistema quimicamente definido na morfologia, ultraestrutura, secreção de esteroides e relaxina. **Reprodução e Climatério**, v. 28, p. 92-103, 2013.

VITT, U. A.; HAYASHI, M.; KLEIN, C.; HSUEH, A. J. Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced

differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 370–377, 2000.

VOSS, A. K.; FORTUNE, J. E. Levels of messenger ribonucleic acid for cytochrome P450 17-hydroxylase and P450 aromatase in preovulatory bovine follicles decrease after the luteinizing hormone surge. **Endocrinology**, v. 132, p. 2239–45, 1993.

WARD, P. S.; THOMPSON, C. B. Signaling in Control of Cell Growth and Metabolism. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 2012.

WASSERMANN, G. F.; MONTI BLOCH, L.; GRILLO, M. L.; SILVA, F. R.; LOSS, E. S.; MCCONNELL, L. L. Biochemical factors involved in the FSH action on amino acid transport in immature rat testes. **Hormonal Metabolism Research**, v. 24, p. 276–279, 1992.

WEBB, R.; GARNSWORTHY, P. C.; GONG, J. G.; ARMSTRONG, D. G. Control of follicular growth; local interactions and nutritional influences. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 63–74, 2004.

WEI, Z.; ZHANG, L.; LI, M. Insulin growth factor I in the development of ovarian follicles. **Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi**, v. 32, n. 8, p. 486-8, 1997.

WEIL, S.; VENDOLA, K.; ZHOU, J.; BONDY, C. A. Androgen and follicle-stimulating hormone interactions in primate ovarian follicle development. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 84, p. 2951–2956, 1999.

WELT, C. K.; SCHNEYER, A. L. Differential regulation of inhibin B and inhibin a by follicle-stimulating hormone and local growth factors in human granulosa cells from small antral follicles. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 86, p. 330–336, 2001.

WILLIS, D. S.; MASON, H. D.; WATSON, H.; FRANKS, S. Developmentally regulated responses of human granulosa cells to insulin-like growth factors (IGFs): IGF-I and IGF-II action mediated via the type-I IGF receptor. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 83, p. 1256–1259, 1998.

XIA, P.; TEKPETEY, F. R.; ARMSTRONG, D. T. Effect of IGF-I on pig oocyte maturation, fertilization, and early embryonic development in vitro, and on granulosa and cumulus cell biosynthetic activity. **Molecular Reproduction and Development**, v. 38, n. 4, p. 373-9, ago. 1994.

XU, Z.; GARVERICK, H. A.; SMITH, G. W.; SMITH, M. F.; HAMILTON, S. A.; YOUNGQUIST, R. S. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 951–7, 1995.

YEO, C. X. Importance of Oocyte to Cumulus Cell Bi-directional Signalling on Oocyte and Subsequent Embryo and Foetal Development and Viability, PHD thesis, University of Adelaide, School of Paediatrics and Reproductive Health, 2010.

YOSHIMURA, Y. Insulin-like growth factors and ovarian physiology. **The Journal of Obstetrics and Gynaecology research**, v. 24, n. 5, p. 305-23, out. 1998.

YU, Y.; YAN, J.; LI, M.; YAN, L.; ZHAO, Y.; LIAN, Y.; LI, R.; QIAO, J. Effects of combined epidermal growth factor, brain-derived neurotrophic factor and insulin-like growth factor-1 on human oocyte maturation and early fertilized and cloned embryo development. **Human reproduction**, v. 27, n. 7, p. 2146-59, 2012.

YUAN, W.; GIUDICE, L. C. Insulin-like growth factor-II mediates the steroidogenic and growth promoting actions of follicle stimulating hormone on human ovarian pre-antral follicles cultured in vitro. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 84, p. 1479–1482, 1999.

ZAMAH, A. M.; HSIEH, M.; CHEN, J.; VIGNE, J. L.; ROSEN, M. P.; CEDARS, M.I.; CONTI, M. Human oocyte maturation is dependent on LH-stimulated accumulation of the epidermal growth factor-like growth factor, amphiregulin. **Human Reproduction**, v. 25, n. 10, p. 2569–2578, 2010.

ZELEZNIK, A. J.; SAXENA, D.; LITTLE-IHRIG, L. Protein kinase B is obligatory for follicle-stimulating hormone-induced granulosa cell differentiation. **Endocrinology**, v. 144, p. 3985–3994, 2003.

ZHAO, J.; TAVERNE, M. A.; VAN DER WEIJDEN, G. C.; BEVERS, M. M.; VAN DEN HURK, R. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulates the development of cultured rat pre-antral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v. 58, n. 3, p. 287-96, 2001.

ZHAO, J.; TAVERNE, M.A.; VAN DER WEIJDEN, G. C.; BEVERS, M.M.; VAN DEN HURK, R. Immunohistochemical localisation of growth hormone (GH), GH receptor (GHR), insulin-like growth factor I (IGF-I) and type I IGF-I receptor, and gene expression of GH and GHR in rat pre-antral follicles. **Zygote**, v. 10, n. 1, p. 85-94, 2002.

ZHENG, X.; PRICE, C. A.; TREMBLAY, Y.; LUSSIER, J. G.; CARRIE`RE, P. D. Role of transforming growth factor-b1 in gene expression and activity of 17 $\beta$ -estradiol and progesterone-generating enzymes in FSH-stimulated bovine granulosa cells. **Reproduction**, v. 136, p. 447–457, 2008.

ZHOU, J.; BONDY, C. Anatomy of the human ovarian insulin-like growth factor system. **Biology of reproduction**, v. 48, n. 3, p. 467-82, 1993.

ZHOU, J.; KUMAR, R.; MATZUK, M. M.; BONDY C. Insulin-like growth factor I regulates gonadotropin responsiveness in the murine ovary. **Molecular endocrinology**, v. 11, n. 13, p. 1924-33, 1997.

ZHOU, H.; ZHANG, Y. Effect of growth factors on in vitro development of caprine preantral follicle oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 90, n. 3-4, p. 265-72, 2005.

ZHOU, P.; BAUMGARTEN, S. C.; WU, Y.; BENNETT, J.; WINSTON, N.;

HIRSHFELD-CYTRON, J.; STOCCO, S. IGF-I Signaling Is Essential for FSH Stimulation of AKT and Steroidogenic Genes in Granulosa Cells. **Molecular Endocrinology**, v. 27, p. 511–523, 2013.

## **ANEXO 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)**

**Projeto:** AÇÃO DO IGF-1 NO TRANSPORTE DE AMINOÁCIDO ESTIMULADO PELO FSH E NA MORFOLOGIA DOS PROCESSOS TRANS-ZONAIS NO CULTIVO DE COMPLEXOS CUMULUS-OÓCITOS HUMANOS IMATUROS

**Pesquisador responsável:** Profa. Dra. Eloisa da Silveira Loss, Departamento de Fisiologia, UFRGS.

**Demais pesquisadores:** Adriana Bos-Mikich, Carlos Link, Noeli Sartori, Milvo Pozzer, Laura Ayres, Letícia Schmidt Arruda.

**Telefones para contato com pesquisadores:** (51) 3308.4085- Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; (51) 33083302- Eloisa Loss pelo Laboratório de Endocrinologia experimental e eletrofisiologia; (51) 33337397- Adriana Bos-Mikich; (51) 33984980- Clínica Proser- Fertilidade e Reprodução Assistida.

A fecundação de óvulos no laboratório é um procedimento que diversos casais procuram para ter um filho. Normalmente, os óvulos são coletados já maduros do ovário, uma vez que a técnica de maturação no laboratório (fora dos ovários) ainda não apresenta taxas satisfatórias de sucesso. A introdução da técnica de maturação de óvulos em laboratório (*in vitro*), representa uma importante alternativa para diversos casos, como a preservação da fertilidade de crianças com câncer.

Diversos trabalhos anteriores mostraram que dentre os hormônios envolvidos neste processo de maturação está o IGF-1. Apesar do IGF-1 ter sido reportado como regulador dos estágios iniciais da maturação, não se conhece completamente como este processo ocorre. Em vista disto, este projeto visa ampliar o conhecimento do amadurecimento do óvulo, tentando entender o mecanismo de ação do hormônio IGF-1. Com o advento de novas descobertas, a maturação *in vitro* de óvulos poderá ser aperfeiçoada, e posteriormente aplicada em benefício de diversas pacientes que por algum motivo não teriam sucesso no procedimento convencional.

Prezada paciente, antes de concordar em participar deste estudo de pesquisa é importante que você leia e entenda a explicação que se segue sobre os procedimentos

Rubrica (Paciente / Pesquisador): \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

propostos. Se depois de ler este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido existir alguma coisa que você não compreenda sobre o estudo ou sobre os procedimentos, por favor, pergunte ao responsável que está aplicando este termo.

Você está sendo convidada para participar do estudo que estamos realizando sobre avaliação do efeito de um hormônio (chamado de IGF-1) sobre os óvulos imaturos e as células que estão próximas ao óvulo (chamadas de células do *cumulus oophorus*). O objetivo do nosso estudo é ampliar o conhecimento do amadurecimento do óvulo, tentando entender a importância deste hormônio neste processo e para que posteriormente, podendo ser futuramente utilizado nas técnicas de Reprodução Assistida em benefício de diversas pacientes.

Estamos convidando a senhora para fazer parte deste experimento, pois quando a senhora realizar o seu procedimento de Reprodução Assistida, é possível que sejam coletados óvulos imaturos juntamente com os óvulos viáveis. Caso forem coletados cinco ou mais óvulos maduros aptos para a fecundação, os óvulos imaturos não são utilizados na rotina clínica, pois apresentam uma chance remota de fecundação.

As células que circundam os óvulos também são coletadas, naturalmente. No entanto, essas células não são utilizadas nos procedimentos de laboratório, elas são rotineiramente descartadas, pois não apresentam utilidade para as técnicas de Reprodução Assistida.

Desta forma, estamos solicitando permissão para utilizar **somente os óvulos imaturos** (caso seja recuperado algum no seu ciclo) **e as células que os circundam, que seriam descartados**, em nossa pesquisa. Além disso, caso seja coletado um número inferior a cinco óvulos maduros, os seus óvulos imaturos não serão utilizados para esta pesquisa.

Não há risco adicional aos existentes pela punção folicular para as pacientes incluídas neste estudo, tampouco a participação não implicará em nenhum prejuízo para a paciente. As informações das pacientes serão mantidas em sigilo, conforme consta na legislação vigente (Resolução 466/12). O procedimento ocorrerá normalmente independente da participação no estudo. A sua participação no estudo é isenta de despesas (não trará custos a você) e a senhora não receberá nenhum pagamento (não será remunerada) pela sua participação.

Todas as pacientes, entre 20 à 45 anos, ao iniciarem o procedimento de fertilização na PROSER estão sendo convidadas a participar desta pesquisa, sendo que somente serão incluídas aquelas que, primeiramente, concordem em participar e assinem o presente termo de consentimento. Caso você venha a aceitar, você somente será incluída nesta pesquisa se no seu procedimento:

- 1) For recuperados no mínimo cinco óvulos maduros; e
- 2) For recuperado pelo menos um óvulo imaturo (que seria descartado).

Os resultados deste estudo não trarão benefícios nem prejuízos diretos para a senhora. Se houver algum dano diretamente decorrente de sua participação no estudo, você terá direito à indenização conforme previsto em lei. Você é livre para decidir para participar ou não do estudo, assim como, retirar-se dele em qualquer momento sem prejuízo ou alteração na rotina de seu tratamento ou relacionamento com seu médico.

Todas as informações obtidas estarão à sua disposição se assim desejar. Todos os resultados referentes à pesquisa serão utilizados para fins exclusivos de pesquisa, sendo resguardada sua total confidencialidade. Da mesma forma, a amostra de seu material não será utilizada para nenhuma outra finalidade, após o cultivo dessas células o material será descartado de forma correta.

Caso a Sra. fique com alguma dúvida em relação ao projeto poderá entrar em contato com os pesquisadores, Eloisa Loss e Adriana Bos-Mikich, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, através dos telefones informados no topo da página 1, para esclarecer suas dúvidas.

Eu, \_\_\_\_\_, li e entendi o propósito do estudo, bem como os potenciais benefícios e riscos da participação no estudo e concordo em participar. Afirmando que fui adequadamente informada sobre o protocolo em questão e tive a oportunidade de fazer perguntas e minhas perguntas foram respondidas. Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento e que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar. Dou por meio deste documento meu consentimento informado para ser uma participante desse estudo.

**Paciente:**

Rubrica (Paciente / Pesquisador): \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_





**ANEXO 2: Composição HBSS**

	<b>Concentração das Soluções Estoque (mM)</b>	<b>Concentração Final da Solução Hank's (mM)</b>
<b>NaCl</b> Cloreto de Sódio	145	0,0029
<b>KCl</b> Cloreto de Potássio	34,3	4,6
<b>NaHCO<sub>3</sub></b> Bicarbonato de Sódio	100	5
<b>MgCl<sub>2</sub></b> Cloreto de Magnésio	32	1,6
<b>CaCl<sub>2</sub> . 2H<sub>2</sub>O</b> Cloreto de Cálcio hidratado	32	1,6
<b>C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub></b> Glicose	110	5,5
<b>Hepes</b>	-	10