

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA PROF. TUISKON DICK  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA

**IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES NAS CÉLULAS DO *CUMULUS*  
*OOPHORUS* HUMANO E SUA RELAÇÃO COM QUALIDADE OOCITÁRIA E  
PERFIL CLÍNICO DAS PACIENTES**

LUCIA VON MENGDEN MEIRELLES

PORTO ALEGRE, FEVEREIRO DE 2017.

CIP - Catalogação na Publicação

Meirelles, Lucia  
IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES NAS CÉLULAS DO  
CUMULUS OOPHORUS HUMANO E SUA RELAÇÃO COM QUALIDADE  
OOCITÁRIA E PERFIL CLÍNICO DAS PACIENTES / Lucia  
Meirelles. -- 2017.  
85 f.

Orientador: Fábio Klamt.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Cumulus oophorus. 2. fertilização in vitro. 3.  
biomarcador. 4. bioinformática. 5. qualidade  
oocitária. I. Klamt, Fábio, orient. II. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA PROF. TUISKON DICK  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA

**IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES NAS CÉLULAS DO *CUMULUS*  
*OOPHORUS* HUMANO E SUA RELAÇÃO COM QUALIDADE OOCITÁRIA E  
PERFIL CLÍNICO DAS PACIENTES**

ALUNA: LUCIA VON MENGDEN MEIRELLES

ORIENTADOR: PROF. DR. FÁBIO KLAMT

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:  
Bioquímica, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências  
Biológicas: Bioquímica.

PORTO ALEGRE, FEVEREIRO DE 2017.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Celular (laboratório 24), do Departamento de Bioquímica Prof. Tuiscon Dick, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Pró-Reitoria de Pesquisa desta Universidade (PROPESQ/UFRGS).

## **AGRADECIMENTOS**

À equipe da Clínica ProSer, que nos abriu as portas e acreditou em nosso trabalho desde o início;

Às gurias do lab 24, obrigada por cada ajuda, desabafo, risadas e comemorações;

Ao Marco Antônio, meu sócio, sem ti esse trabalho certamente não existiria;

Ao prof. Fábio, que me viu como cientista antes que eu mesma visse. Obrigada por todo o apoio, confiança e ensinamentos;

Aos meus pais, que sempre me encorajam e apoiam em todas as decisões, sejam elas quais forem;

Ao Gabriel, a quem eu nunca preciso explicar nada. Obrigada por me entender e apoiar incondicionalmente.

## Sumário

|   |    |
|---|----|
| PARTE I.....  | 8  |
| 1. RESUMO.....  | 9  |
| 2. ABSTRACT.....                                      | 10 |
| 3. LISTA DE ABREVIATURAS.....                         | 11 |
| 4. INTRODUÇÃO.....                                    | 12 |
| 4.1 Seleção de Oócitos.....                           | 12 |
| 4.2 Análise de biomarcadores no fluido folicular..... | 14 |
| 4.3 O Cumulus oophorus.....                           | 15 |
| 4.4 Análise da expressão gênica das CCs.....          | 18 |
| 4.5 A importância das características clínicas.....   | 19 |
| 5. OBJETIVOS.....                                     | 21 |
| 5.1 Objetivos Gerais.....                             | 21 |
| 5.2 Objetivos Específicos.....                        | 21 |
| PARTE II.....   | 22 |
| 6. RESULTADOS.....                                    | 23 |
| Introduction.....                                     | 26 |
| Material and Methods.....                             | 28 |
| Results.....  | 37 |
| Discussion.....                                       | 40 |

|                                  |    |
|----------------------------------|----|
| Conclusion .....                 | 46 |
| REFERENCES .....                 | 47 |
| PARTE III.....                   | 71 |
| 7. DISCUSSÃO.....                | 72 |
| 8. CONCLUSÃO .....               | 79 |
| 9. PERSPECTIVAS.....             | 80 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... | 81 |

## PARTE I



## 1. RESUMO

Uma das maiores dificuldades das terapias de reprodução assistida é a seleção de células germinativas de boa qualidade para posterior fertilização e implantação. Atualmente, a seleção de oócitos se dá basicamente por avaliação morfológica, que não reflete satisfatoriamente a competência oocitária. Assim, a busca por bioindicadores da qualidade oocitária é necessária. O *cumulus oophorus* forma um conjunto de células somáticas que circundam o oócito no folículo antral, mantendo uma relação íntima com a célula germinativa, com comunicação direta via junções tipo *GAP*. As células do *cumulus oophorus* são descartadas após técnicas de fertilização *in vitro*, o que as torna um material de fácil acesso, livre de conflitos éticos. Uma série de metodologias de análise das células do *cumulus* foram propostas para identificação de anormalidades no oócito. Porém, nenhuma delas é rotineiramente utilizada na clínica. Os processos celulares das células do *cumulus* refletem as condições do microambiente folicular, e podem, assim, trazer evidências das condições oocitárias. Nosso grupo analisou as células do *cumulus* primeiramente por meio de abordagens de bioinformática, que revelaram processos celulares relacionados ao desenvolvimento de embriões até o estágio de blastocisto. Com base nestes resultados, análises de parâmetros bioquímicos e expressão gênica das células do *cumulus* foram realizadas e permitiram a identificação de possíveis biomarcadores da qualidade do oócito que levam em consideração as características clínicas das pacientes. Estas análises indicaram que expressão do gene *PTGS2* e a atividade da enzima Glutathione-S-Transferase como indicadores da formação de blastocistos em pacientes com diferentes variáveis clínicas (*backgrounds*) analisados. Se confirmados, estes parâmetros poderão ser utilizados como biomarcadores no ambiente clínico, elevando as taxas de sucesso em técnicas de reprodução assistida.

Palavras-chave: *cumulus oophorus*, biomarcador, oócito, qualidade oocitária, blastocisto

## 2. ABSTRACT

One of the great challenges in assisted reproduction techniques is the selection of appropriate germ cells for fertilization and implantation. Nowadays, oocyte selection occurs basically through morphological evaluation, which does not reflect satisfactorily the oocyte's competence. Therefore, the search for bioindicators of oocyte quality is necessary. The *cumulus oophorus* forms a set of somatic cells that surround the oocyte in the antral follicle, participating in the processes of oocyte maturation and folliculogenesis. These cells maintain an intimate relationship with the germ cell, with direct communication via GAP junctions. *Cumulus oophorus* cells are discarded in in vitro fertilization techniques, which makes them an easy-access material that can be collected in a free-of-ethical-issues way. A series of *cumulus* cell analysis methodologies were proposed to identify abnormalities in the oocyte. However, none of them is routinely used in clinical environment. The cellular processes of *cumulus* cells reflect the conditions of the follicular microenvironment, and may thus bring evidences of oocyte conditions. Our group analyzed *cumulus* cells in search of predictors of oocyte quality primarily through bioinformatics approaches, which revealed cellular processes related to the development of embryos up to the blastocyst stage. Based on these results, analyzes of biochemical parameters and gene expression of cumulus cells were performed and allowed the identification of possible biomarkers of oocyte quality that takes into consideration patients clinical variables. These analysis indicated *PTGS2* expression and Glutathione-S-Transferase activity as indicators of blastocyst formation in all patient profiles (backgrounds) analyzed. If confirmed, these parameters may be used as biomarkers in clinical environment, improving assisted reproduction success rates.

Key words: *cumulus oophorus*, biomarker, oocyte quality, blastocyst

### 3. LISTA DE ABREVIATURAS

CCs: Células do *Cumulus*

CO: *Cumulus Oophorus*

CCO: Complexo *Cumulus*-Oócito

FIV: Fertilização *In Vitro*

ICSI: Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoide (do Inglês: *Intracytoplasmic Sperm Injection*)

RA: Reprodução Assistida

SOP: Síndrome do Ovário Policístico

## 4. INTRODUÇÃO

### 4.1 Seleção de Oócitos

As técnicas de Reprodução Assistida (RA) ainda possuem taxas de sucesso muito baixas. A maioria dos ciclos de Fertilização *In Vitro* (FIV) não resulta em gravidez, e grande parte dos embriões não tem sucesso na implantação (Bromer & Seli, 2008). As chances de gravidez a termo em cada ciclo não chegam a 30% (Centers for Disease Control and Prevention, 2014). A seleção dos gametas a serem fertilizados é de grande importância, pois ajuda a evitar a transferência de múltiplos embriões, abordagem que aumenta os riscos de complicações médicas, perinatais e neonatais (Seoud *et al.*, 1992). Além disso, em alguns países, é proibida a fertilização de mais de dois oócitos em um ciclo de RA em função da legislação vigente. Assim, se fazem necessários critérios sólidos e confiáveis para uma boa seleção dos gametas/embriões a serem fertilizados/transferidos.

Atualmente, as estratégias de seleção de células germinativas e embriões para transferência baseiam-se principalmente em características morfológicas, como o aspecto do Complexo-*Cumulus*-Oócito (CCO) como um todo, o número de camada de células do *cumulus* (CCs) e o estado morfológico destas células, bem como a morfologia do oócito (forma, tamanho, aspecto do citoplasma, granulação e homogeneidade) e da zona pelúcida (Van Blerkom *et al.*, 1990). Além disso, a presença ou ausência do 1º corpúsculo polar é averiguada para identificar o nível de maturação nuclear do oócito (Ebner *et al.*, 2000). Porém, a análise morfológica do complexo *cumulus*-oócito não reflete as taxas de fertilização e clivagem do

embrião. As anormalidades citoplásmicas severas permitem apenas descartar oócitos com defeitos grosseiros, não garantindo que CCOs morfológicamente normais darão origem a embriões saudáveis (Balaban & Urman, 2006). Além disso, algumas características morfológicas do oócito podem apenas representar variações fenotípicas, e não necessariamente significam má qualidade oocitária (Rienzi *et al.*, 2012).

A fim de selecionar os embriões de melhor qualidade, técnicas de rastreamento genético pré-implantacional (do inglês *Preimplantation Genetic Screening*) (PGS) foram desenvolvidas, onde se realiza a biópsia de blastômeros ou de células do trofoectoderma do blastocisto 3 a 5 dias após a fertilização, respectivamente (De Vos & Van Steirteghem, 2001). Apesar de nestes estágios do desenvolvimento todas as células serem totipotentes (no embrião até o estágio de mórula) ou pluripotentes (no trofoectoderma), e serem capazes de compensar a célula biopsiada, esta abordagem é invasiva e pode prejudicar o embrião (De Vos *et al.*, 2009), além de envolver questões éticas. Outro aspecto negativo das técnicas de PGS ocorre pela possibilidade de as células analisadas representarem um mosaico no embrião e não necessariamente refletirem sua real qualidade. Estas análises podem necessitar de muito tempo para serem realizadas, e portanto não oferecer um diagnóstico rápido. Se realizada no embrião de 5 dias, há necessidade de criopreservação (Seli *et al.*, 2010). Além disso, estudos indicam que estas técnicas não trouxeram melhoras nos resultados das técnicas de RA (Checa *et al.*, 2009).

A necessidade de aprimoramento da seleção de células germinativas de melhor qualidade é um grande desafio da reprodução assistida. Marcadores biológicos (biomarcadores) são moléculas ou eventos celulares que podem ser medidos ou detectados para análise do estado biológico das células/tecidos/organismo em questão. Os biomarcadores fornecem medidas objetivas de um estado biológico, e indicam processos biológicos normais, processos patogênicos ou resposta a tratamentos. Um biomarcador ideal da qualidade oocitária deve ser não-invasivo, de maneira a não prejudicar o oócito; objetivo, a fim de ser facilmente reproduzido pela equipe nas clínicas de fertilização; fisiologicamente relevante, e não somente descritivo; produzir resultados rapidamente e apresentar uma boa relação custo-benefício.

#### **4.2 Análise de biomarcadores no fluido folicular**

O fluido folicular (FF) é formado por plasma sanguíneo e secreções das células da granulosa e teca (revisado em Fortune, *et al.*, 1994). Ele participa ativamente do microambiente ovariano, preenchendo a cavidade antral (Figura 1). Diversos autores sugeriram a utilização do fluido folicular (FF) como ferramenta para a identificação de biomarcadores da qualidade oocitária (Das *et al.*, 2006; Oyawoye *et al.*, 2003; Pasqualotto *et al.*, 2009; revisado em Revelli *et al.*, 2009). Porém, durante a coleta, o fluido folicular pode ser facilmente contaminado pelo fluido de outros folículos ou por sangue quando uma mesma agulha é utilizada para a punção de mais de um folículo, como de praxe. Para diminuir as chances de contaminação, seria necessária a troca de agulha a cada folículo puncionado, o que representaria procedimentos mais invasivos, aumentando o desconforto das

pacientes e interferindo nos protocolos de coleta de oócitos na rotina clínica (Revelli *et al.*, 2009). Assim, o estabelecimento de análise de biomarcadores no FF não pode ser facilmente aplicado no ambiente clínico.

### **4.3 O *Cumulus oophorus***

As células do *cumulus oophorus* são um subgrupo especializado das células da granulosa que cercam o oócito no folículo antral (Figura 1), participando diretamente dos processos de maturação oocitária (Dekel & Beers, 1980). As células do *cumulus* (CCs) e o oócito estão interligados por junções comunicantes (do inglês *GAP junctions*), localizadas nas projeções transzonais, que são processos citoplásmicos que se estendem das células da *corona radiata*, a camada mais interna do *cumulus*, atravessam a zona pelúcida e invadem a membrana plasmática do oócito (revisado em Tanghe *et al.*, 2002). É por meio destas junções que o oócito participa ativamente da regulação do metabolismo das CCs e vice-versa, via alças de retroalimentação estabelecidas entre os dois tipos celulares (revisado em Buccione *et al.*, 1990; Albertini *et al.*, 2001). As junções comunicantes permitem a passagem de moléculas de baixo peso molecular entre as células germinativas e somáticas, e também entre as células somáticas do folículo (Moo *et al.*, 1980). As CCs mantêm o bloqueio da meiose do oócito na prófase I de modo parácrino (Pincus & Enzmann, 1935). O sinal para que o oócito retome a maturação também se dá por meio das células somáticas do folículo, que possuem grandes quantidades de receptores para o hormônio luteinizante (Hillier, 1994).

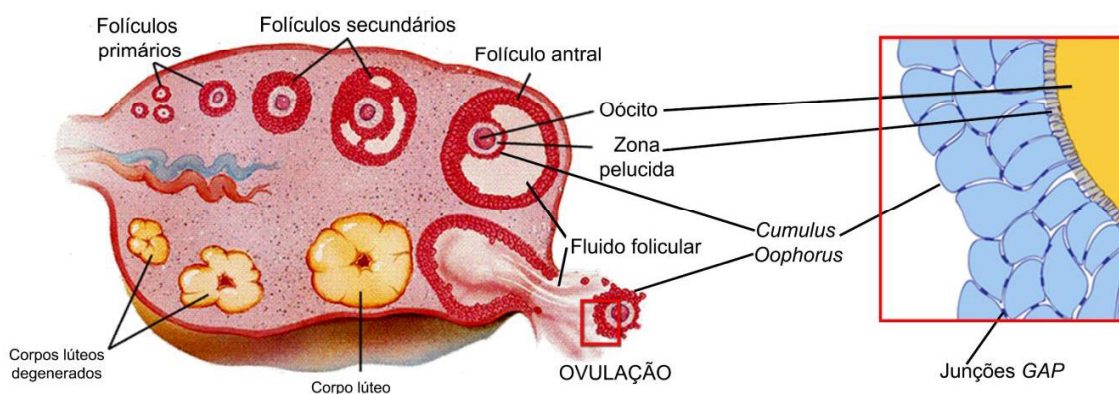
As CCs possuem um importante papel na manutenção do oócito, protegendo-o, por exemplo, contra danos causados pelo estresse oxidativo (Tatemoto *et al.*, 2000). Estas células produzem o tripeptídeo glutationa (GSH) (De Matos *et al.*, 1997), que possui um importante papel na proteção contra dano oxidativo (Meister, 1983). Quando expostos ao peróxido de hidrogênio, como no estudo de Fatehi e colaboradores (2005), oócitos bovinos no complexo CCO foram protegidos contra o estresse oxidativo, enquanto que oócitos desnudos sofreram uma drástica redução na viabilidade (Fatehi *et al.*, 2005). As CCs metabolizam substratos, como a glicose, que não são eficientemente utilizados pelo oócito. A glicose é transformada em piruvato ou outros intermediários do ciclo do ácido cítrico, que são repassados ao oócito (Biggers *et al.*, 1967).

Durante e logo após a ovulação, as CCs facilitam a captura do complexo *cumulus*-oócito (CCO) pelas células epiteliais ciliadas do infundíbulo e o transporte até o sítio de fertilização (Mahi-Brown & Yanagimachi, 1983). Em humanos, nesta etapa, o CCO é composto de aproximadamente 16.000 CCs que envolvem um oócito maduro (Ortiz *et al.*, 1982); (Feuerstein *et al.*, 2007). Além disso, as CCs possuem importantes funções na fertilização, como facilitar o acesso do espermatozoide ao oócito (revisado em Tanghe *et al.*, 2002). A comunicação *cumulus*-oócito obedece dois gradientes: os sinais de gonadotrofinas, que saem do *cumulus* em direção ao oócito, e os fatores derivados do oócito em direção às CCs. Deste modo, as camadas mais internas do *cumulus oophorus* refletem de maneira mais íntima a situação do oócito (revisado em Assidi & Sirard, 2013).



Os importantes papéis desempenhados pelas CCs na maturação, transporte e fertilização do oócito sugerem que mudanças no seu arranjo estrutural ou fisiológico podem estar relacionadas à infertilidade. A expressão gênica e atividade bioquímica das CCs provavelmente são muito influenciadas pelas condições do oócito, do ambiente folicular e por interações com o ambiente ovariano. Desta maneira, a análise das CCs deve refletir processos biológicos que ocorrem no oócito (Patrizio *et al.*, 2007).

As CCs são tipicamente descartadas em técnicas de RA, após serem retiradas para Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide (do inglês= *Intracitoplasmic Sperm Injection*, ICSI). Por sua forte associação e interdependência com o oócito nos processos de maturação oocitária, as CCs vêm sendo utilizadas em estudos que visam encontrar um biomarcador não invasivo e eficiente da qualidade oocitária. Porém, ainda não há um consenso quanto aos marcadores sugeridos para análise nas CCs e não há aplicação destes resultados no ambiente clínico.



**Figura 1. As células do *cumulus oophorus* cercam o oócito no folículo antral. As células do *cumulus* (CCs) e o oócito estão interligadas por junções do tipo GAP. Adaptado de: Mader (2000); Shuhaibar *et al.* (2015)**

#### 4.4 Análise da expressão gênica das CCs

Uma série de estudos sugere a expressão de certos genes nas CCs como biomarcadores (McKenzie *et al.*, 2004; van Montfoort *et al.*, 2008; Assou *et al.*, 2008; Hamel *et al.*, 2008; Hamel *et al.*, 2010a; Hamel *et al.*, 2010b; Assidi *et al.*, 2011; Feuerstein *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2005; Anderson *et al.*, 2009; Cillo *et al.*, 2007; Revisado em Fragouli *et al.*, 2014). Dentre estes resultados, há pouca concordância sobre quais genes são possíveis marcadores da qualidade oocitária. Esta divergência nos resultados observados pode advir dos diferentes métodos de análise utilizados, do número de amostras, dos tratamentos das pacientes, dos critérios utilizados como indicador da qualidade (ócitos capazes de sofrer fertilização, embriões de 3 dias, taxas de clivagem, taxas de implantação ou taxas de gravidez), dos perfis clínico das pacientes ou até mesmo de contaminações da amostra de CCs com outros tipos celulares (Quinn *et al.*, 2006). De qualquer forma, ainda não há consenso sobre quais genes representariam bons biomarcadores da qualidade oocitária.

Ademais, ao investigar marcadores de processos biológicos, é importante considerar que a expressão gênica não necessariamente indica níveis proteicos ou de atividade enzimática. Diversos processos reguladores ocorrem após a expressão de RNA mensageiro (RNAm), e portanto estas abordagens podem não refletir concentração e/ou atividade enzimática (Gygi *et al.*, 1999). Este fato pode significar a perda das características que fazem a molécula um marcador biológico. Em outras palavras, a expressão gênica como marcador não necessariamente indicará que seu transcrito, ou a atividade deste, será também

um biomarcador daquele evento. De fato, o estudo de McReynolds e colaboradores apontou diferenças entre níveis de RNAm e de proteínas envolvidas em processos como fosforilação oxidativa, função mitocondrial e *splicing* pós-transcricional em CCs de pacientes em idade materna avançada (McReynolds *et al.*, 2012). Alguns RNAm apresentaram diferenças significativas nos níveis de expressão, resultado que não se confirmou ao analisar os níveis das proteínas correspondentes. Resultados de expressão gênica devem sempre ser analisados cuidadosamente. As interpretações devem considerar apenas os níveis de RNAm, e não devem extrapolar as diferenças encontradas para níveis proteicos e de atividade enzimática, já que existem diversos mecanismos, como degradação de RNAm e de proteínas, que permitem à célula responder a estímulos externos.

#### **4.5 A importância das características clínicas**

Sabe-se que as características clínicas das pacientes como idade (McReynolds *et al.*, 2012; Matos *et al.*, 2009), índice de massa corporal (Carbone, 2003); (Robker *et al.*, 2009) e diagnósticos (Barnhart *et al.*, 2002; Seleem *et al.*, 2014) influenciam diretamente nos resultados das técnicas de reprodução assistida e nas características do ambiente folicular. Além disso, há evidências de que o protocolo de estimulação ovariana, aplicado em técnicas de reprodução assistida, interfere nas condições foliculares e qualidade oocitária (Wathlet *et al.* 2011). O trabalho de Hamamah (2006), por exemplo, aponta que o padrão de expressão de proteínas em CCs muda radicalmente conforme o protocolo de estimulação ovariana, mesmo quando os resultados do tratamento de fertilização

são iguais (Hamamah *et al.*, 2006). Porém, estudos que sugerem biomarcadores da qualidade oocitária raramente consideram estas variáveis ao avaliar a aplicabilidade e confiabilidade destes parâmetros. É preciso considerar que as variáveis clínicas podem apontar diferenças que não necessariamente refletem a qualidade oocitária, mas sim as características das pacientes.

O objetivo final da seleção oocitária é identificar os oócitos com maiores chances de gerar uma gravidez a termo. Porém, o estabelecimento e desenvolvimento de uma gravidez depende de diversos outros fatores além das células germinativas, como por exemplo a receptividade do endométrio (Check *et al.*, 1991). O desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (5 a 6 dias após a fertilização) pode ser acompanhado no ambiente clínico e permite a identificação do potencial de desenvolvimento do oócito. O gameta feminino possui a maior contribuição no desenvolvimento embrionário (Sirard *et al.*, 2006) e, portanto, a utilização da formação de blastocisto como parâmetro de análise da qualidade oocitária permite que CCs sejam utilizadas como ferramenta para melhorar as taxas de sucesso em tecnologias de reprodução assistida.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivos Gerais**

Este trabalho tem como objetivo a avaliação das células do *cumulus oophorus* com o intuito de identificar possíveis biomarcadores da qualidade oocitária que sejam preditivos do desenvolvimento de blastocistos, levando em consideração o perfil clínico das pacientes.

### **5.2 Objetivos Específicos**

- 5.2.1 Avaliar, por meio de ferramentas de bioinformática, os processos biológicos diferencialmente enriquecidos entre CCs relacionadas a oócitos de boa e má qualidade, identificando os processos e moléculas em destaque em cada grupo;
- 5.2.2 Avaliar, por meio de ensaios bioquímicos, componentes da maquinaria celular com potencial de tornarem-se indicadores do desenvolvimento de blastocistos;
- 5.2.3 Identificar, por meio de técnicas de PCR quantitativo, genes diferencialmente expressos em CCs relacionadas a oócitos de boa e má qualidade.

## PARTE II

## **6. RESULTADOS**

Os resultados dessa dissertação estão apresentados na forma de artigo científico que será submetido para publicação ao periódico *Human Reproduction*.

**Title: Glutathione-s-transferase activity and *PTGS2* expression in *cumulus* cells are potential oocyte quality biomarkers regardless of patients age, body mass index, diagnosis and stimulation protocol**

**Authors:** Lúcia von Mengden<sup>1</sup> †, Marco Antônio De Bastiani<sup>1,2</sup>†, Lucas Grun<sup>3</sup>, Leticia Schmidt Arruda<sup>4</sup>, Carlos Alberto Link<sup>4</sup>, Milvo Pozzer<sup>4</sup>, Florência Barbé-Tuana<sup>3</sup>, Fábio Klamt<sup>1,2</sup>

**Filiation:** <sup>1</sup>Laboratory of Cellular Biochemistry, Department of Biochemistry, ICBS/UFRGS, 90035-003 Porto Alegre (RS), Brazil;<sup>2</sup>National Institutes of Science & Technology – Translational Medicine (INCT- TM), 90035-903 Porto Alegre (RS), Brazil; <sup>3</sup>Laboratory of molecular biology and bioinformatics, Department of Biochemistry, ICBS/UFRGS, 90035-003 Porto Alegre (RS), Brazil; <sup>4</sup>Clínica ProSer, CEP, Porto Alegre (RS), Brazil.

**\*Corresponding author:** Lucia von Mengden, Departamento de Bioquímica, ICBS/ Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Ramiro Barcelos 2600, Porto Alegre/RS, 90035-003, Brasil. Phone: +55 51 3308-5556; Fax: +55 51 3308-5535; e-mail: [luciavonmengden@ufrgs.br](mailto:luciavonmengden@ufrgs.br)



### **PARTE III**

## 7. DISCUSSÃO

Diversos trabalhos analisaram as CCs em busca por biomarcadores da qualidade oocitária (revisado em Uyar *et al.*, 2013; Assou *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2010). Muitos destes estudos identificaram uma grande resposta dos compostos em relação ao perfil das pacientes e suas variáveis clínicas (Matos *et al.*, 2009; Carbone, 2003; Adriaenssens *et al.*, 2010). Porém, estes dados raramente são considerados na identificação de biomarcadores da qualidade oocitária. Além disso, parâmetros variados são utilizados para apontar células de boa e má qualidade. Esta discrepância entre os grupos analisados e os resultados obtidos dificulta a identificação de biomarcadores confiáveis (Huang *et al.*, 2010).

A Tabela 1 mostra os diferentes estudos sugerindo genes como biomarcadores, indicando os desfechos, amostras e perfis de pacientes considerados. Ela ilustra como os resultados variam de acordo com as características e os desfechos analisados, reforçando a importância destas considerações no estabelecimento de biomarcadores da qualidade oocitária.

Adriaenssens e colaboradores analisaram os padrões de expressão gênica das CCs incluindo as variáveis clínicas das pacientes em modelos de regressão, e observaram que, de fato, os resultados apontados por testes estatísticos simples podem ser influenciados pelos dados clínicos das pacientes e não necessariamente estar relacionados com qualidade oocitária. Os autores identificaram diferentes biomarcadores de acordo com o protocolo de estimulação e variáveis clínicas (Adriaenssens *et al.*, 2010). Esta abordagem também foi utilizada por Wathlet e colaboradores (Wathlet *et al.*, 2011), que ao considerar as

variáveis clínicas das pacientes, apontaram a expressão do gene *PTGS2* como biomarcador do desenvolvimento embrionário, resultado que corrobora com os aqui apresentados (Wathlet *et al.*, 2011). Uma série de estudos apresentaram resultados contraditórios quanto à utilização da expressão do gene *PTX3* nas CCs como biomarcador. A análise de Zhang e colaboradores (2005) confirmou a associação do gene *PTX3* com desenvolvimento oocitário (Zhang *et al.*, 2005). Utilizando a mesma técnica de análise, porém, dois grupos de pesquisadores, Anderson e colaboradores (Anderson *et al.*, 2009) e Cillo e colaboradores (Cillo *et al.*, 2007), não encontraram nenhuma associação entre *PTX3* e o desenvolvimento embrionário. Já Feuerstein e colaboradores observaram correlação do gene com taxas de gravidez. Porém, ao considerar as variáveis clínicas, a expressão de *PTX3* se mostrou não representativa desta associação. Estes estudos reforçam a importância da consideração das variáveis clínicas na análise de biomarcadores (Feuerstein *et al.*, 2012). Um biomarcador ideal deverá apresentar consistência, replicabilidade e relevância em todos os tipos de *backgrounds*, como variações genéticas, tratamentos hormonais e condições clínicas das pacientes (Seli *et al.*, 2010).

**Tabela 1: estudos analisando biomarcadores da qualidade oocitária por meio da transcriptômica das células do cumulus.**

| Amostra                    | Perfil das Pacientes   | n  | Técnica                           | Critério   | Resultado   | Referência                         |
|----------------------------|--|--|-----------------------------------|--|---|------------------------------------|
| CCs de oócitos individuais | pacientes jovens (<28 anos) e pacientes em idade materna avançada (>38 anos) | 44 pacientes   | Microarranjo, rtq PCR             | idade materna avançada x idade reprodutiva; embriões de 3º dia   | ↑CKB embriões de boa qualidade; ↑PRDX2 embriões de boa qualidade e em pacientes em idade avançada   | Lee <i>et al.</i> , 2010           |
| CCs em pools de cada grupo |  | 20 pacientes, 123 CCs  | microarranjo, qRT-PCR             | Falha na fertilização x embriões de 3º dia   | ↑PTX3   | Zhang <i>et al.</i> , 2005         |
| CCs de oócitos individuais | Infertilidade por fator masculino  | 74 pacientes, 674 CCs  | qRT-PCR                           | Maturidade oocitária; expansão CCs; fertilização; embrião 2º/3º dia; gravidez                            | ↓BDNF, ↓TNFAIP6, ↓PTX3, ↑PTGS2 c/ expansão CCs; ↑PTGS2 c/ maturação oocitária; ↓BDNF c/ fertilização; ↑GREM1, ↓BDNF c/ Embriões de 3º dia | Anderson <i>et al.</i> , 2009      |
| CCs de oócitos individuais | Amostras pareadas  | 6 pacientes (amostras pareadas), 16 CCs + 24 CCs (validação) | microarranjo, qRT-PCR             | embriões com clivagem inicial (2º dia)   | ↓CCND2, CTNND1, CXCR4, DHCR7, DVL3, GPX3, HSPB1 TRIM28  | van Montfoort <i>et al.</i> , 2008 |
| CCs de oócitos individuais | Pacientes idade 36.5 (±3.2) anos; Fator masculino; Protocolo longo           | 45 pacientes, 90 CCs   | RT-PCR semi-quantitativo          | Embriões de 3º dia de boa qualidade x embriões de 3º dia de má qualidade ou oócitos que não fertilizaram | ↑HAS2, ↑GREM1   | Cillo <i>et al.</i> , 2007         |
| CCs de oócitos individuais | Apenas pacientes diagnóstico fator masculino                                 | 197 CCs de 106 pacientes                                     | microarranjo, metanálise, qRT-PCR | Blastocisto (5º/6º dia); gravidez  | ↑RGS2   | Feuerstein <i>et al.</i> , 2012    |

|                            |   |  |                       |  |  |                               |
|----------------------------|---|--|-----------------------|--|--|-------------------------------|
| CCs de oócitos individuais | Apenas pacientes diagnóstico fator masculino  | 30 pacientes, 50 CCs<br>Idade 30,9 ± 2,5 | microarranjo, qRT-PCR | Embrões de 3° dia; gravidez                                      | ↑ <i>BCL2L11</i> , <i>PCCK1</i> , ↓ <i>NFIB</i> c/ gravidez  | Assou <i>et al.</i> , 2008    |
| CCs de oócitos individuais | Sem pacientes com SOP; apenas protocolo análogo GnRH + rFSH   | 38 pacientes, 38 CCs; amostras pareadas  | qRT-PCR               | Nascidos vivos   | ↑ <i>VCAN</i> , ↑ <i>PTGS2</i>   | Gebhardt <i>et al.</i> , 2011 |
| CCs de oócitos individuais | Apenas BMI < 25kg/m <sup>2</sup> ; Protocolo GnRH agonista +HMG; idade média = 30 anos; sem pacientes SOP | 8 pacientes, 108 CCs                     | qRT-PCR               | Fertilização; Embrões de 3° dia                                  | ↑ <i>PTGS2</i> , <i>GREM1</i> , <i>HAS2</i> c/ embrião de 3° dia   | McKenzie <i>et al.</i> , 2004 |
| CCs oócitos individuais    | Apenas protocolo agonista   | 8 pacientes, 14 CCs                      | microarranjo, qRT-PCR | gravidez   | ↑ <i>DHIST1H4C</i> , <i>NRP1</i>   | Assidi <i>et al.</i> , 2011   |
| CCs de oócitos individuais | Idade média = 32 anos (23-40)   | 47 pacientes, 149 CCs                    | qRT-PCR               | Maturidade oocitária; embrião 2°/3° dia; blastocisto (5°/6° dia) | ↑ <i>STAR</i> , <i>PTGS2</i> , <i>AREG</i> , <i>SCD1</i> , <i>SCD5</i> c/ maturidade oocitária; ↓ <i>STAR</i> , <i>PTGS2</i> , <i>AREG</i> , <i>SCD1</i> , <i>SCD5</i> , <i>Cx43</i> c/ desenvolvimento de blastocisto | Feuerstein <i>et al.</i> 2007 |

**Tabela 1: Biomarcadores sugeridos da qualidade oocitária expressos nas células do Cumulus (CCs).** A divergência nos resultados observados pode se dar pelo método de análise utilizado, pelo número de amostras, pelo tratamento das pacientes, pelo critério utilizado como indicador da qualidade ou pelos tipos celulares utilizados. CCs= Células do cumulus. ICSI= Injeção intracitoplasmática de espermatozoide. IVF= Fertilização in vitro. SOP= síndrome do ovário policístico.

Não é claro se um oócito de má qualidade, como por exemplo, portador de aneuploidias, influencia processos celulares (como rotas metabólicas e vias de sinalização) nas CCs de forma negativa; ou se processos celulares em mau funcionamento nas CCs prejudicam o oócito, transmitindo sinais inapropriados à célula germinativa, induzindo erros no processo meiótico como aneuploidias e outros defeitos; ou se um ambiente ovariano/folicular nocivo leva a alterações tanto na biologia celular do oócito quanto das CCs (Fragouli *et al.*, 2012). De qualquer maneira, é provável que as CCs reflitam os processos celulares e condições do oócito, pela ligação direta entre os dois tipos celulares (revisado em (Tanghe *et al.*, 2002).

A análise de processos celulares das CCs pode indicar mais precisamente componentes celulares que reflitam a situação da célula germinativa. A Figura 2 apresenta a rede de interações gênicas, obtida a partir de uma compilação dos genes anteriormente propostos como biomarcadores em CCs nos diversos trabalhos apresentados (Tabela 1) por meio da ferramenta STRING (<http://string-db.org/>). É possível identificar uma série de interações entre os biomarcadores sugeridos, onde os processos de regulação metabólica ficam evidentes, assim como processos de biossíntese, de regulação de organismos multicelulares e diferenciação celular. A rede apresenta um valor P de enriquecimento de interações significativo, o que indica que as proteínas que compõem a rede interagem entre si mais do que se esperaria ao acaso para este mesmo número de elementos, um indicativo de que elas participam de processos celulares em comum. Esta rede evidencia que o estudo de biomarcadores guiado pela análise





**Figura 2. Rede de interação dos genes propostos como biomarcadores da qualidade oocitária.** A rede obtida pela ferramenta STRING evidencia os genes envolvidos em processos celulares, como resposta a estímulos externos (GO:0009605) (destacados em vermelho), regulação positiva de processos metabólicos (GO:0044283), regulação de processos biossintéticos (GO:0009889), resposta à stress (GO:0006950) e resposta à químicos (GO:0042221). Os parâmetros utilizados para obtenção da rede foram proximidade, co-expressão, fusão gênica, co-ocorrência e banco de dados. PPI enrichment p-value: 1.6e-06. *RGS2* = regulator of G-protein signaling 2, 24kDa; *TNFAIP6* = tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6; *HSPB1* = heat shock 27kDa protein 1; *TRIM28* = tripartite motif-containing 28; *FDX1* = ferredoxin 1; *CCND2* = cyclin D2; *AREG* = amphiregulin; *VCAN*= versican; *NRP1*= neuropilin 1; *STAR*= steroidogenic acute regulatory protein; *GJA1* = gap junction protein, alpha 1; *PTX3* = pentraxin-related gene, rapidly induced by IL-1 beta; *CKB* = creatine kinase, brain; *GREM1* = gremlin 1, cysteine knot superfamily, homolog (*Xenopus laevis*); *PRDX2* = peroxiredoxin 2; *HAS2* = hyaluronan synthase 2; *SCD5* = stearyl-CoA desaturase 5; *PCK1* = phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble); *DHCR7* = 7-dehydrocholesterol reductase; *BCL2L11* = BCL2-like 11 (apoptosis facilitator); *PTGS2* = prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase); *SCD* = stearyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase); *NFIB* = nuclear factor I/B; *GPX3* = glutathione peroxidase 3 (plasma); *CTNND1* = catenin (cadherin-associated protein), delta 1; *CXCR4* = chemokine (C-X-C motif) receptor 4; *BDNF* = brain-derived neurotrophic factor.



## 8. CONCLUSÃO

A identificação de biomarcadores da qualidade oocitária é de grande importância para obtenção de melhoras nas taxas de sucesso em técnicas de reprodução assistida. As CCs são diretamente influenciadas pelo ambiente folicular e pelo oócito, e podem ser analisadas de maneira não invasiva.

Por meio da literatura, foi identificado que a análise de processos celulares das CCs relacionados a oócitos de boa e má qualidade poderia guiar a busca por biomarcadores de maneira mais eficiente, uma vez que as CCs reagem aos sinais tanto do oócito quanto do ambiente folicular e ovariano. Este trabalho identificou nas CCs processos celulares relacionados a oócitos de boa e má qualidade. A partir deste resultado, foi possível identificar dois possíveis preditores do desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto nas CCs. Por meio de regressão linear, averiguou-se o potencial destes biomarcadores em diferentes perfis clínicos de pacientes. Este estudo apontou a expressão do gene *PTGS2* e os níveis de atividade da enzima GST nas CCs como potenciais preditores da capacidade de desenvolvimento oocitário.

## **9. PERSPECTIVAS**

Estes resultados precisam ser validados em outras coortes, com a análise das CCs de cada oócito individualmente. Um estudo ideal necessita de um tamanho amostral mais significativo e utilizaria CCs de embriões transferidos por técnicas de transferência única de embriões, correlacionando, em última instância, os possíveis biomarcadores observados com gravidez a termo. Análises pareadas permitiriam uma melhor averiguação da validade dos biomarcadores propostos. Nosso grupo pretende realizar a validação dos biomarcadores propostos, que, se confirmados, poderão auxiliar significativamente no aumento de taxas de sucesso em tecnologias de reprodução assistida.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adriaenssens T, Wathlet S, Segers I, Verheyen G, De Vos A, Van der Elst J, Coucke W, Devroey P, Smits J. Cumulus cell gene expression is associated with oocyte developmental quality and influenced by patient and treatment characteristics *Hum Reprod* 2010;**25**: 1259-1270.

Albertini DF, Combelles CMH, Benecchi E, Carabatsos MJ. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction* 2001;**121**: 647–653.

Anderson RA, Sciorio R, Kinnell H, Bayne RA, Thong KJ, de Sousa PA, et al. Cumulus gene expression as a predictor of human oocyte fertilisation, embryo development and competence to establish a pregnancy. *Reproduction* 2009;**138**: 629–637.

Assidi M, Montag M, Van der Ven K, Sirard MA. Biomarkers of human oocyte developmental competence expressed in cumulus cells before ICSI: a preliminary study. *J Assist Reprod Genet* 2011;**28**:173–88

Assidi M, Sirard MA Cumulus Cell Gene Expression as a Marker of Oocyte Quality *Oogenesis* 2012;**17**: 231-252.

Assou S, Haouzi D, De Vos J, Hamamah S. Human cumulus cells as biomarkers for embryo and pregnancy outcomes. *Mol Hum Reprod* 2010;**16**: 531-538.

Assou S, Haouzi D, Mahmoud K, Aouacheria A, Guillemin Y, Pantesco V, Reme T, Dechaud H, De Vos J, Hamamah S. A non-invasive test for assessing embryo potential by gene expression profiles of human cumulus cells: a proof of concept study. *Mol Hum Reprod* 2008;**14**:711–719.

Balaban B, Urman B. Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. *Reproductive BioMedicine Online* 2006;**12**: 608-615.

Barnhart K, Dunsmoor-Su R, Coutifaris C. Effect of endometriosis on *in vitro* fertilization *Fertil Steril* 2002;**77**: 1148–1155.

Biggers JD, Whittingham DG, Donahue RP. The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. *Zoology* 1967;**58**: 560-567

Bromer JG, Seli E. Assessment of embryo viability in assisted reproductive technology: shortcomings of current approaches and the emerging role of metabolomics. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* 2008;**20**: 234–241.

Buccione R, Vanderhyden BC, Caron PJ, Eppig JJ FSH-induced expansion of the mouse cumulus oophorus in vitro is dependent upon a specific factor(s) secreted by the oocyte *Dev Biol* 1990;**138**: 16-25.

Carbone MC. Antioxidant enzymatic defences in human follicular fluid: characterization and age-dependent changes *Mol Hum Reprod* 2003;**9**: 639-643.

Centers for Disease Control and Prevention. National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion. Division of Reproductive Health. Acesso em 1 fevereiro de 2017. Disponível em: <[http://nccd.cdc.gov/drh\\_art](http://nccd.cdc.gov/drh_art)>.

Checa MA, et al. IVF/ICSI with or without preimplantation genetic screening for aneuploidy in couples without genetic disorders: a systematic review and meta-analysis. *J Assist Reprod Genet* 2009;**26**:273–283

Check J, Nowroozi K, Choe J, Dietterich RT. Influence of Endometrial Thickness and Echo Patterns on Pregnancy Rates During In Vitro Fertilization *Fertil Steril* 1991;**56**: 1173-1180.

Cheng EH, Chen SU, Lee TH, Pai YP, Huang LS, Huang CC, Lee MS. Evaluation of telomere length in cumulus cells as a potential biomarker of oocyte and embryo quality. *Hum Rep* 2013;**28**: 929-936.

Cillo F, Brevini TA, Antonini S, Paffoni A, Ragni G, Gandolfi F. Association between human oocyte developmental competence and expression levels of some cumulus genes. *Reproduction* 2007;**134**: 645–50

Das S, Chattopadhyay R, Ghosh S, Ghosh S, Goswami SK, Chakravarty BN, Chaudhury K. Reactive oxygen species level in follicular fluid–embryo quality marker in IVF? *Hum Reprod* 2006;**21**(9): 2403-2407.

De Matos DG, Furnus CC, Moses DF. Glutathione Synthesis during InVitro Maturation of Bovine Oocytes: Role of Cumulus Cells. *Biol Reprod* 1997;**57**: 1420-1425.

De Vos A, Van Steirteghem A. Aspects of biopsy procedures prior to preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn* 2001;**21**: 767-780

Dekel N, Beers WH. Development of the rat oocyte in vitro: inhibition and induction of maturation in the presence or absence of the cumulus oophorus. *Dev Biol* 1980;**75**: 247–254

Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Feichtinger O, Tews G. Prognostic value of first polar body morphology on fertilization rate and embryo quality in intracytoplasmic sperm injection *Hum Reprod* 2000;**15**: 427-430.

Fatehi AN, Roelen BAJ, Colenbrander B, Schoevers EJ, Gadella BM, Bevers MM, van den Hurk R. Presence of cumulus cells during *in vitro* fertilization protects the bovine oocyte against oxidative stress and improves first cleavage but does not

affect further development *Zygote* 2005;**13**: 177-185.

Feuerstein P, Cadoret V, Dalbies-Tran R, Guerif F, Bidault R, Royere D. Gene expression in human cumulus cells: one approach to oocyte competence. *Hum Reprod* 2007;**22**: 3069-3077.

Feuerstein P, Puard V, Chevalier C, Teusan R, Cadoret V, Guerif F, Houlgatte R, Royere D. Genomic assessment of human cumulus cell marker genes as predictors of oocyte developmental competence: impact of various experimental factors. *PLoS One* 2012;**7**: e40449.

Fortune JE. Ovarian Follicular Growth and Development in Mammals *Biol Reprod* 1994;**50**: 225-232.

Fragouli E, Lalioti MD, Wells D. The transcriptome of follicular cells: biological insights and clinical implications for the treatment of infertility. *Hum Reprod Update* 2014;**20**: 1-11.

Fragouli E, Wells D, Iager AE, Kayisli UA, Patrizio P. Alteration of gene expression in human cumulus cells as a potential indicator of oocyte aneuploidy. *Hum Reprod* 2012;**27**: 2559-2568.

Gebhardt KM, Feil DK, Dunning KR, Lane M, Russell DL. Human cumulus cell gene expression as a biomarker of pregnancy outcome after single embryo transfer. *Fertil Steril* 2011;**96**: 47-52 e42.

Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* 1999;**19**: 1720-1730.

**Hamamah S, Matha V, Berthenet C, Anahory T, Loup V, Dechaud H, Hedon B, Fernandez A, Lamb N.** Comparative protein expression profiling in human cumulus cells in relation to oocyte fertilization and ovarian stimulation protocol. *Reprod Biomed Online* 2006;**13**: 807-814.

Hamel M, Dufort I, Robert C, Gravel C, Leveille MC, Leader A, et al. Identification of differentially expressed markers in human follicular cells associated with competent oocytes. *Hum Reprod* 2008;**23**: 1118-27.

Hamel M, Dufort I, Robert C, Leveille MC, Leader A, Sirard MA. Genomic assessment of follicular marker genes as pregnancy predictors for human IVF. *Mol Hum Reprod* 2010;**16**: 87-96.

Hamel M, Dufort I, Robert C, Leveille MC, Leader A, Sirard MA. Identification of follicular marker genes as pregnancy predictors for human IVF: new evidence for the involvement of luteinization process. *Mol Hum Reprod* 2010;**16**: 548-56.

Hillier SG. Current concepts of the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis. *Hum Reprod* 1994;**9**: 188-191.

Huang Z, Wells D. The human oocyte and cumulus cells relationship: new insights from the cumulus cell transcriptome. *Mol Hum Reprod* 2010;**16**(10): 715-725.

Lee KS, Joo BS, Na YJ, Yoon MS, Choi OH, Kim WW. Cumulus cells apoptosis as an indicator to predict the quality of oocytes and the outcome of IVF-ET. *J Assist Reprod Genet.* 2001;**18**: 490-498.

Mader, Sylvia S. Inquiry into life. 9<sup>th</sup> ed. ISBN 0-697-36070-9. 2000

Mahi-Brown CA, Yanagimachi R. Parameters Influencing Ovum Pickup By Oviductal Fimbria in the Golden Hamster *Mol Reprod Develop* 1983;**8**: 1-10.

Matos L, Stevenson D, Gomes F, Silva-Carvalho JL, Almeida H. Superoxide dismutase expression in human cumulus oophorus cells. *Mol Hum Reprod* 2009;**15**: 411-419.

McKenzie LJ, Pangas SA, Carson SA, Kovanci E, Cisneros P, Buster JE, Amato P, Matzuk MM. Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. *Hum Reprod* 2004;**19**: 2869-2874.

McReynolds S, Dzieciatkowska M, McCallie BR, Mitchell SD, Stevens J, Hansen K, Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG. Impact of maternal aging on the molecular signature of human cumulus cells. *Fertil Steril* 2012;**98**: 1574-1580 e1575.

Meister A. Selective Modification of Glutathione Metabolism. *Science* 1983;**220**: 472-477.

Moor RM, Smith MW, Dawson RMC Measurement of Intracellular Coupling Between Oocytes and Cumulus Cells Using Intracellular Markers *Exp Cell Res* 1980;**126**: 15-29.

Nakahara K, Saito H, Saito T, et al. The incidence of apoptotic bodies in membrana granulosa can predict prognosis of ova from patients participation in in-vitro fertilization programs. *Fertil Steril* 1997;**68**:312–317

Ortiz ME, Salvatierra AM, Lopez J, Fernandez E, Croxatto HB. Postovulatory aging of human ova: I. Light microscopic observations *Mol Reprod Develop* 1982;**6**: 11-17.

Oyawoye O, Gadir AA, Constantinovici N, Perrett C, Hardiman P. Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF: relationship to outcome. *Hum Reprod* 2003;**18**: 2270-2274.

Pasqualotto EB, Lara LV, Salvador M, Sobreiro BP, Borges E, Pasqualotto FF. The role of enzymatic antioxidants detected in the follicular fluid and semen of infertile couples undergoing assisted reproduction. *Hum Fertil (Camb)* 2009;**12**(3): 166-171.

Patrizio P, Fragouli E, Bianchi V, Borini A, Wells D. Molecular Methods For Selection of the Ideal Oocyte *Reprod Biomed Online* 2007;**15**: 346-353.

Pincus G, Enzmann EV. The Comparative Behavior of Mammalian Eggs In Vivo and In Vitro: I. The Activation of Ovarian Eggs. *J Exp Med* 1935;**62**: 665-675.

Quinn MCJ, McGregor SB, Stanton JL, Hessian PA, Gillett WR, Green DPL. Purification of Granulosa Cells From Human Ovarian Follicular Fluid Using Granulosa Cell Aggregates. *Reprod Fert Develop* 2006;**18**: 501-508.

Revelli A, Piane LD, Casano S, Molinari E, Massobrio M, Rinaudo P. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reprod Biol Endocrinol* 2009;**7**: 40.

Rienzi L, Balaban B, Ebner T, Mandelbaum J. The oocyte. *Hum Reprod* 2012;**27** **Suppl 1**: i2-21.

Robker RL, Akison LK, Bennett BD, Thrupp PN, Chura LR, Russell DL, Lane M, Norman RJ. Obese women exhibit differences in ovarian metabolites, hormones, and gene expression compared with moderate-weight women. *J Clin Endocrinol Metab* **94**(5): 1533-1540.

Seino T, Saito H, Kaneko T, Takahashi T, Kawachiya S, Kurachi H. Eight-hydroxy-2'-deoxyguanosine in granulosa cells is correlated with the quality of oocytes and embryos in an in vitro fertilization-embryo transfer program. *Fertil Steril* 2002;**77**: 1184-1190.

Seleem AK, El Refaeey AA, Shaalan D, Sherbiny Y, Badawy A. Superoxide dismutase in polycystic ovary syndrome patients undergoing intracytoplasmic sperm injection. *J Assist Reprod Genet* 2014; **31**: 499-504.

Seli E, Robert C, Sirard MA. OMICS in assisted reproduction: possibilities and pitfalls. *Mol Hum Reprod* 2010;**16**: 513-530.

Shuhaibar LC, Egbert JR, Norris RP, Lampe PD, Nikolaev VO, Thunemann M, Wen L, Feil R, Jaffe LA. Intercellular signaling via cyclic GMP diffusion through gap junctions restarts meiosis in mouse ovarian follicles *PNAS* 2015;**112**: 5527-5532.

Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C. Contribution of the Oocyte to Embryo Quality. *Theriogenology* 2006;**65**: 126-136.

Tanghe S, Van Soom A, Nauwynck H, Coryn M, de Kruif A. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol Reprod Dev* 2002;**61**: 414-424.

Tatemoto H, Sakurai N, Muto N. Protection of Porcine Oocytes Against Apoptotic Cell Death Caused by Oxidative Stress During In Vitro Maturation: Role of Cumulus Cells *Biol Reprod* 2000;**63**: 805-810.

Uyar A, Torrealday S, Seli E, Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality *Fertil Steril* 2013;**99**: 10.1016/j.fertnstert.2013.01.129.

Van Blerkom J Occurrence and Developmental Consequences of Aberrant Cellular Organization in Meiotically Mature Human Oocytes After Exogenous Ovarian Hyperstimulation *J Elec Micr Tech* 1990;**16**: 324-346.

van Montfoort AP, Geraedts JP, Dumoulin JC, Stassen AP, Evers JL, Ayoubi TA. Differential gene expression in cumulus cells as a prognostic indicator of embryo viability: a microarray analysis. *Mol Hum Reprod* 2008;**14**: 157–168.

Wathlet S, Adriaenssens T, Segers I, Verheyen G, Van de Velde H, Coucke W, et al. Cumulus cell gene expression predicts better cleavage-stage embryo or blastocyst development and pregnancy for ICSI patients. *Hum Reprod* 2011;**26**: 1035–1051.

Zhang X, Jafari N, Barnes RB, Confino E, Milad M, Kazer RR. Studies of gene expression in human cumulus cells indicate pentraxin 3 as a possible marker for oocyte quality. *Fertil Steril* 2005;**83**: 1169–1179.