

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

JÚLIA SCHNEIDER

**Avaliação dos genes normalizadores para cultivo primário de células  
murais da granulosa e do *cumulus oophorus* luteinizadas**

Porto Alegre  
JUNHO DE 2014

JÚLIA SCHNEIDER

**Avaliação dos genes normalizadores para cultivo primário de células murais da granulosa e do *cumulus oophorus* luteinizadas**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ilma Simoni Brum  
Co-orientador: MsC. Diego Duarte Alcoba

Porto Alegre  
JUNHO DE 2014

*"When it is dark enough, you can see the stars."*

**Ralph Waldo Emerson**

Àqueles que, de alguma forma, estão próximos de mim, me incentivando e apoiando e permitindo, assim, que eu alcance meus objetivos.

## **Agradecimentos**

Agradeço à minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ilma Simoni Brum, pela oportunidade me fornecida de fazer parte como aluna de iniciação científica do grupo de pesquisas do Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral (LaBiMET). Obrigada por todo o suporte e apoio intelectual durante este tempo e durante a realização deste trabalho.

Ao meu querido co-orientador Diego Duarte Alcoba que, mesmo longe, fez o possível e o impossível para me auxiliar e orientar. Por todo conhecimento comigo compartilhado, pelo voto de confiança em mim depositado e pela amizade desenvolvida durante este tempo de convivência.

Um agradecimento especial à Amanda de Barros Machado, que, mais do que colega, foi para mim um grande exemplo durante a realização deste trabalho. Por todo o tempo compartilhado comigo e pelos ensinamentos e descobertas feitas. Em fim, por contribuir (e muito) para a conclusão deste trabalho.

À Ana Caroline Hillebrand, à Patrícia Borba Martiny, à Lolita Schneider Pizzolato e à Maria Eduarda Amaral, pelo coleguismo, pela colaboração, pela amizade e pelo estímulo que me forneceram.

À mais que colega, amiga, Caetana Ledur, pela agradável convivência diária e por compartilhar comigo os momentos de frustração e tristeza. Por dividir experiências e aprendizados e me incentivar quando nos momentos mais difíceis.

Às grandes amigas Helena Biasibetti e Vitória Lawall, por participarem comigo de momentos importantes tanto na vida pessoal quanto acadêmica.

À todos os meus familiares e amigos que, de uma forma ou outra, estiveram presente nesta minha jornada de luta e busca pelo conhecimento.

Aos que me ensinam desde o princípio e que sempre serão meus grandes exemplos: meus pais. Obrigada por todo o apoio, principalmente emocional, e pelo incentivo, por sempre acreditarem em mim e me fazerem acreditar que sou capaz. Ao meu grande irmão, a quem admiro e com quem tenho a certeza de que sempre poderei contar. Amo vocês! À minha cunhada Taís, pelos momentos de descontração e apoio pessoal.

Por fim, ao meu namorado e grande amigo Lucas Sulzbach, por me apoiar em todas as decisões que tomei, por aceitar a nossa distância física e por sempre estar ao meu lado. Por todos os finais de semana de trabalho e estudo nos quais me acompanhou e incentivou, fazendo dos meus os seus atos. Obrigada pela paciência, pela força e pelo carinho. A distância e o sofrimento com certeza valeram a pena.

## **Índice geral**

Agradecimentos .....	4
Índice geral .....	6
Resumo .....	7
Introdução .....	9
Artigo científico .....	23
Conclusões e perspectivas .....	50
Bibliografia adicional .....	51
Anexos .....	54

## Resumo

Atualmente, as estratégias de avaliação e de seleção de oócitos destinados à maturação *in vitro* (MIV) dependem principalmente da morfologia do complexo *cumulus*-oócito (CCO). Porém, este método possui precisão menor do que a desejada, visto que oócitos não competentes muitas vezes são selecionados. Portanto, técnicas *in vitro* não invasivas de avaliação da qualidade do oócito para maturação e posterior fertilização *in vitro* (FIV) estão em desenvolvimento. Dentre estas, destaca-se a seleção de oócitos através da utilização do corante de vitalidade Azul Cresil Brilhante (BCB). Em várias espécies animais a utilização do BCB já está consolidada; no entanto, os efeitos causados por este corante em embriões humanos provenientes de oócitos submetidos a esta técnica ainda não foram elucidados. Visto que a utilização de oócitos humanos para pesquisa é bastante restrita e que as células murais da granulosa (GC) e do *cumulus oophorus* (CC) apresentam íntima relação com o oócito na formação do folículo ovariano, a utilização do BCB nestas células permite elucidar de forma indireta, o possível efeito do BCB sobre oócitos humanos. A análise da expressão gênica de genes alvo que possam ter sido alterados após utilização do BCB é uma importante metodologia para identificar presença ou ausência de efeitos causados por este corante nos oócitos. Para que os resultados do perfil de expressão gênica sejam confiáveis é necessária a utilização de uma estratégia de normalização. O uso de genes normalizadores é tido como padrão-áureo para a normalização de resultados de RT-qPCR até o momento; porém, uma vez que não há um gene de referência universal, este deve ser determinado conforme o tipo de amostra utilizado. Desta forma, este estudo buscou avaliar e validar, dentre cinco candidatos, os genes normalizadores mais adequados para estudos de expressão gênica com cultura primária de GC e CC. Utilizando *software* específico para a determinação de genes normalizadores, este trabalho apresenta ACTB e HPRT-1 como sendo os mais adequados genes normalizadores dentre os analisados, para estudos de

expressão gênica em cultura primária de células murais da granulosa e do *cumulus oophorus*, respectivamente.



## Introdução geral

A infertilidade, definida como o insucesso de conceber após doze meses de relações sexuais regulares e desprotegidas, é uma alteração reprodutiva complexa com significativas implicações médicas e econômicas (Benyamini, Gozlan et al. 2005). Ela acomete cada vez mais indivíduos de todo o mundo, mesmo com os esforços internacionais para a sua prevenção e para o seu tratamento apropriado (Dzik, Donadio et al. 2012). Em adição, a decisão de postergar a maternidade nas sociedades desenvolvidas está se tornando cada vez mais frequente, fato que resulta em envelhecimento ovariano, associado à infertilidade. Desta forma, a incidência de casais inférteis está aumentando, resultando em aumento progressivo da necessidade do uso das tecnologias de reprodução assistida (TRA) (Dzik, Donadio et al. 2012).

As TRA incluem todos os procedimentos que envolvam manipulação de gametas, de zigotos ou de embriões a fim de alcançar a gravidez (Bromer and Seli 2008). Dentre as modalidades de tratamento disponíveis para casais inférteis, a fertilização *in vitro* (FIV) oferece as maiores taxas de sucesso de gravidez e de nascidos vivos (Uyar, Torrealday et al. 2013), sendo que este procedimento envolve a recuperação de oócitos da gônada feminina, a sua fertilização *in vitro* (em laboratório) e, posteriormente, a transferência do embrião resultante para o útero da paciente (Bromer and Seli 2008). Portanto, a FIV e a transferência de embriões (TE) são uma realidade na terapêutica dos casais em questão (Dzik, Pereira et al. 2010). Porém, as TRA normalmente associam-se com dois problemas que, pelo menos em parte, derivam de nossa

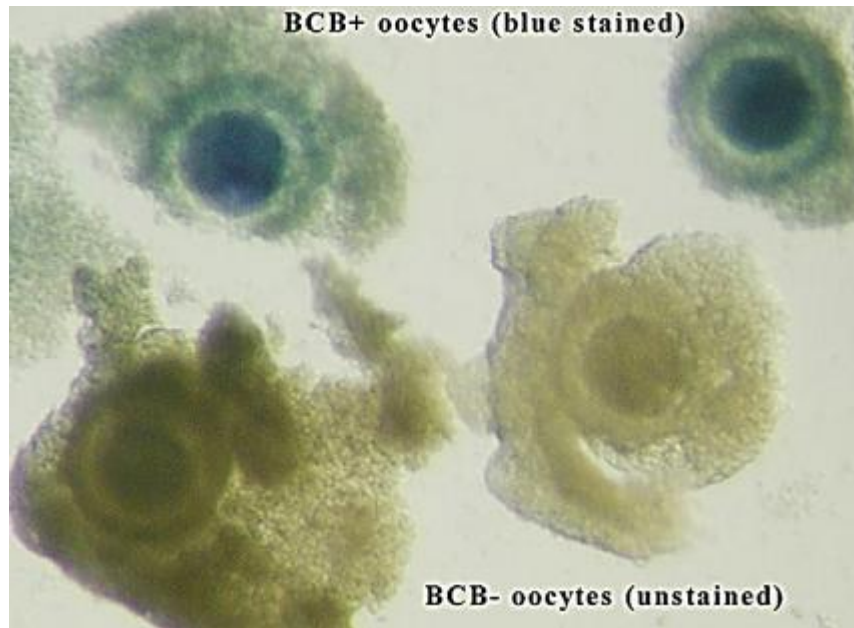
inabilidade em avaliar adequadamente o potencial reprodutivo dos embriões: baixas taxas de implantação e altas taxas de gravidez múltipla (Bromer and Seli 2008). Assim, um passo crítico no procedimento de FIV é a avaliação da competência oocitária e embrionária a fim de determinar quais são os oócitos mais adequados para serem fertilizados e, posteriormente, determinar quais são os embriões mais viáveis a serem transferidos (Uyar, Torrealday et al. 2013), visto que, provavelmente, são essas avaliações que estão diretamente relacionadas com o sucesso nas taxas de gestação (Bromer and Seli 2008). Portanto, justamente por ser conhecido o fato de que a qualidade do oócito é o principal determinante para o sucesso das TRA, ou seja, para o estabelecimento de gestação (Jiang, Xiong et al. 2010), faz-se necessário o aprimoramento da avaliação em questão.

Objetivando otimizar a fertilização *in vitro*, a quantidade de oócitos maduros recuperados dos ovários das pacientes pode ser aumentada induzindo-se a ovulação com gonadotrofinas e indutores de maturação oocitária (Le Du, Kadoch et al. 2005). Entretanto, mesmo havendo estimulação hormonal, em muitas situações, gametas imaturos são recuperados (Edirisinghe, Junk et al. 1997; Jaroudi, Hollanders et al. 1997; Liu, Katz et al. 1997), havendo a necessidade de realização da maturação *in vitro* (MIV) dos oócitos, a qual estimula a maturação tanto do núcleo quanto do citoplasma destas células (Yang, Zhang et al. 2009). Este procedimento pode reduzir a necessidade de tratamento com gonadotrofinas exógenas e oferecer uma alternativa para a hiperestimulação de ovulação durante a FIV (Yang, Zhang et al. 2009). Para tanto, faz-se necessário técnicas *in vitro* não invasivas de

avaliação da qualidade do oócito (Goovaerts, Leroy et al. 2010). Atualmente, as estratégias de avaliação dependem principalmente da morfologia do complexo *cumulus*-oócito (CCO) e do embrião e da taxa de clivagem, embora ambas possuam precisão menor do que a desejada (Uyar, Torrealday et al. 2013). Assim, o desenvolvimento de um teste objetivo e acurado para avaliar a viabilidade oocitária e embrionária é um dos objetivos contemporâneos mais significativo da medicina reprodutiva (Uyar, Torrealday et al. 2013).

É sabido que durante o crescimento/capacitação do oócito (período no qual o gameta torna-se competente para sofrer os processos de maturação e, posteriormente, de fertilização e que ocorre anteriormente ao processo de maturação), ocorrem modificações metabólicas celulares (Hyttel, Fair et al. 1997), como a síntese e o acúmulo de RNA e de proteínas (Mota, Batista et al. 2010). Um oócito competente (que já sofreu o processo de capacitação) é capaz de sofrer não apenas os processos de maturação e de fertilização, mas também tem capacidade de controlar corretamente as primeiras divisões mitóticas do embrião (até a ativação do genoma embrionário). A manutenção do desenvolvimento embrionário inicial depende, justamente, dos transcritos e proteínas provindos deste RNA armazenado, o qual é acumulado pelo oócito durante os períodos de capacitação e de maturação, anteriores à ovulação (Fragouli, Lalioti et al. 2014). É também nesta fase de crescimento oocitário que ocorrem alterações da atividade de algumas enzimas essenciais no metabolismo do oócito, destacando-se, dentre estas, a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) (Tsumi, Satoh et al. 1992). A alteração conhecida que ocorre com esta enzima é a diminuição de sua atividade específica quando

do término do crescimento oocitário (Mota, Batista et al. 2010). Em 1986 sugeriu-se que a atividade específica da G6PDH poderia ser estimada pela utilização de um corante de vitalidade denominado Azul Cresil Brilhante (BCB) (Williams 1986). Hoje, o BCB auxilia no processo de seleção de oócitos de espécies animais (Pujol, Lopez-Bejar et al. 2004), pois, após exposição destas células ao BCB, o qual é reduzido a um composto incolor pela G6PDH, pode-se distinguir oócitos com diferentes níveis de atividade específica da enzima G6PDH. Esta técnica, portanto, pode ser um método para efetivar a seleção dos oócitos mais competentes dentre os imaturos (Mota, Batista et al. 2010). Foi proposto, então, que, como gametas que completaram seu crescimento apresentam menor atividade específica da G6PDH, quando expostos ao BCB, conseqüentemente, apresentam coloração azulada (sendo classificados como BCB positivos), visto que o corante não é reduzido pela enzima. Ao contrário, gametas que ainda estão em fase de crescimento, por apresentarem maior atividade específica da G6PDH, quando expostos ao BCB permanecem incolores (sendo classificados como BCB negativos) (Ericsson, Boice et al. 1993). A Figura 1, abaixo, ilustra oócitos bovinos classificados como BCB positivos ou BCB negativos após exposição a este corante.



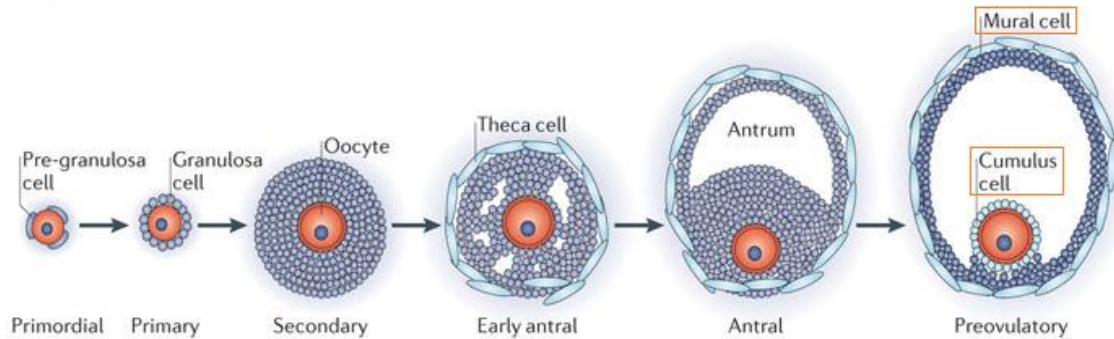
**Figura 1.** Imagem de diferentes colorações de COCs bovinos após exposição ao corante Azul Cresil Brillhante. Oócitos BCB positivos (citoplasma azul) e BCB negativos (citoplasma incolor). Retirado de Bhojwani, 2007. (Bhojwani, Alm et al. 2007).

Desde então, inúmeros trabalhos foram realizados na tentativa de utilizar o BCB como método de seleção de oócitos competentes. Até o momento, porém, o uso do BCB na espécie humana foi referido somente em um trabalho, o qual foi realizado pelo nosso grupo de pesquisa (dados ainda não publicados). Este trabalho evidenciou que ao expor oócitos humanos ao BCB é possível indicar dois grupos de gametas que possuam características diferentes; entretanto, nele avaliou-se apenas a taxa de MIV, sendo que informações referentes a possíveis danos causados nos oócitos pela exposição ao BCB não foram avaliados. Portanto, o quesito segurança referente à aplicação de BCB na espécie humana ainda permanece questionado. É também de grande importância o fato que, apesar de amplamente utilizado nas

espécies animais, nestas igualmente não há extensa avaliação deste quesito. Deste modo, torna-se necessário realizar uma avaliação subcelular dos possíveis efeitos causados aos oócitos pela exposição ao BCB, a fim de verificar se este método de seleção de gametas pode ser utilizado na espécie humana sem acarretar riscos. No entanto, a utilização de oócitos humanos para pesquisa é bastante restrita, devido, especialmente, à grande dificuldade de obtenção destas células para estudos experimentais. Conseqüentemente, faz-se necessária a utilização de modelo experimental que possa refletir, indiretamente, a qualidade da estrutura folicular.

Sabe-se que os folículos nos quais os oócitos crescem e maturam consistem de múltiplas camadas de células somáticas, as quais têm como funções principais proteger e nutrir o oócito e, através de influência hormonal, guiá-lo pela série de eventos necessários para alcançar a competência citoplasmática e nuclear (Fragouli, Lalioti et al. 2014). Os folículos primordiais são formados no período perinatal, assim que os oócitos parados em prófase da primeira divisão meiótica se tornam envelopados por uma única camada achatada de células da granulosa circundadas por uma membrana basal (Uyar, Torrealday et al. 2013). No folículo pré-ovulatório (formado após várias etapas de desenvolvimento folicular), o oócito é circundado pelas células do *cumulus oophorus* (CCs), um tipo especializado de célula da granulosa e que é similar, porém apresenta algumas peculiaridades, às células murais da granulosa (GCs) que revestem o *antrum* (Uyar, Torrealday et al. 2013). Portanto, as células foliculares mais intimamente associadas com o oócito são as células murais da granulosa (que revestem a parede do folículo) e as células do *cumulus*

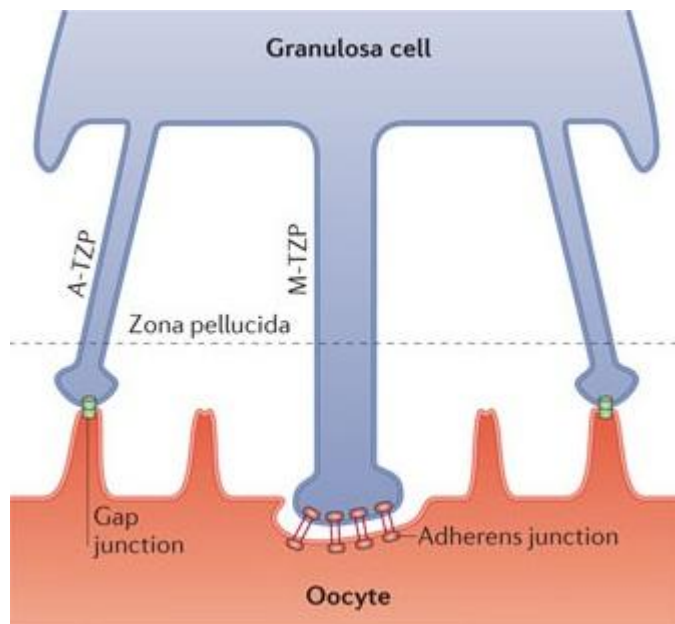
*oophorus*, as quais estão em contato direto com o oócito e formam o complexo *cumulus*-oócito (Fragouli, Lalioti et al. 2014). A Figura 2, abaixo, representa a foliculogênese e mostra a localização das células murais da granulosa bem como das células do *cumulus oophorus*.



**Figura 2.** Representação esquemática da foliculogênese. Adaptado de Li, 2013. (Li and Albertini 2013).

As células do *cumulus oophorus* se comunicam umas com as outras e com o oócito através de junções *gap*, as quais permitem a troca de metabólitos e o transporte de moléculas de sinalização (Uyar, Torrealdy et al. 2013), havendo assim uma comunicação bidirecional entre estes dois tipos celulares (Fragouli, Lalioti et al. 2014). É sabido, também, que o oócito em crescimento obtém a maior parte dos substratos para o seu metabolismo energético e para sua biossíntese destas células somáticas que o circundam, demonstrando a importância da intercomunicação entre elas (oócito, GCs e CCs) (Uyar, Torrealdy et al. 2013). A Figura 3, abaixo, ilustra algumas das comunicações intercelulares entre um oócito e uma célula do cumulus. Estudos sugerem que o oócito também desempenha um papel crítico no crescimento e desenvolvimento do folículo circundante, bem como o fato de que fatores expressos exclusiva ou

predominantemente por oócitos são requeridos para a progressão do folículo a diferentes estágios do desenvolvimento (Uyar, Torrealday et al. 2013). Portanto, visto que estas células foliculares se desenvolvem no mesmo microambiente que o oócito ao qual estão associadas, elas refletem informações importantes sobre a qualidade do gameta feminino.



**Figura 3.** Representação esquemática das comunicações intercelulares entre um oócito e uma célula do cumulus circundante. Adaptado de Li, 2013. (Li and Albertini 2013).

Adicionalmente, o fato de que GCs e CCs são facilmente acessadas durante os tratamentos de reprodução assistida e podem ser amostradas sem o comprometimento do oócito, tem feito destas células alvos atrativos para o desenvolvimento de uma avaliação não invasiva da competência oocitária (Fragouli, Lalioti et al. 2014). Alterações na expressão gênica oocitária têm implicações na proliferação, na diferenciação e no funcionamento das células



murais da granulosa e das células do *cumulus oophorus*, sendo aceitável avaliar as GCs e as CCs a fim de identificar marcadores de viabilidade oocitária e embrionária (Uyar, Torrealday et al. 2013). Tem sido sugerida, desta forma, a análise da expressão gênica, especialmente de células do *cumulus oophorus*, como um método não invasivo para prever aneuploidia e competência oocitárias, bem como êxito na gravidez durante os procedimentos de reprodução assistida (Assou, Haouzi et al. 2013). A grande relação e intercomunicação entre estas células, portanto, faz com que a avaliação das células murais da granulosa e das células do *cumulus oophorus* represente, indiretamente, a qualidade oocitária.

Assim, autores têm proposto relacionar a expressão gênica das células murais da granulosa e das células do *cumulus oophorus* com a qualidade oocitária e, como é sabido, a Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real a partir de Transcrição Reversa (RT-qPCR) é uma técnica amplamente utilizada em estudos de expressão gênica, estando bem estabelecida para a quantificação de RNA mensageiro (mRNA) em amostras biológicas. Os seus benefícios, quando comparada a métodos convencionais de mensuração de RNA, incluem a sua sensibilidade e a possibilidade de rápida e acurada avaliação dos níveis de mRNA da amostra (Huggett, Dheda et al. 2005). Portanto, a metodologia de RT-qPCR é a mais comumente utilizada para caracterizar ou confirmar a expressão gênica de padrões e comparar níveis de mRNA em diferentes amostras populacionais (Bustin 2002). Além disso, a análise dos perfis de expressão gênica de células fornece um indício da responsividade destas a uma determinada condição, fisiológica ou patológica

(Bustin, Benes et al. 2005). Logo, a análise da expressão gênica de células expostas e não expostas ao BCB representa uma maneira indireta de avaliação das possíveis alterações subcelulares ocasionadas por este corante nos oócitos em questão.

Análises de expressão gênica, idealmente, são acompanhadas da quantificação por RT-qPCR de genes normalizadores, ou seja, genes que tendem a apresentar expressão constante em todos os tecidos e estágios de desenvolvimento e que também não são afetados por condições experimentais (Bhatia, Taylor et al. 1994). Isto ocorre devido ao fato de que a variabilidade nos protocolos usados para a aquisição das amostras e para a extração do RNA pode introduzir erros no processo de análise amostral (Tricarico, Pinzani et al. 2002). A quantidade de RNA também pode variar devido a diferenças na massa tecidual da amostra, no número de células, no tratamento experimental ou na eficiência da extração do RNA (Schmittgen and Zakrajsek 2000). Assim, é essencial a utilização de uma estratégia de normalização para que seja possível controlar a quantidade inicial de material das amostras, a variação de eficiência das amplificações e as diferenças entre as amostras (principalmente quando provindas de indivíduos diferentes) (Bustin, Benes et al. 2005). Entretanto, a identificação de uma referência válida para a normalização dos dados, a fim de se alcançar uma quantificação de mRNA precisa, reprodutível e relevante biologicamente, permanece um problema (Tricarico, Pinzani et al. 2002). Várias estratégias, então, têm sido propostas para que se atinja este objetivo, as quais variam desde a utilização de quantidades amostrais semelhantes até o uso dos já referidos genes normalizadores (Huggett, Dheda et al. 2005). Teoricamente,

portanto, o uso de genes de referência é a mais apropriada solução para o problema de normalização (Bustin, Benes et al. 2005) e, até o momento é o padrão-áureo para normalizar a fração de mRNA (de Jonge, Fehrmann et al. 2007).

A estratégia de normalização com um gene de referência tem como alvo RNAs codificados por genes que são coletivamente chamados genes de referência e é um método simples e popular para o controle interno dos erros gerados durante a reação de RT-qPCR (Huggett, Dheda et al. 2005). A quantificação do mRNA dos genes alvo e de referência, na amostra, garante que as mudanças nos níveis de transcrito influenciem ambos os genes igualmente. Para ser considerado como normalizador, um gene deve mostrar expressão não regulada e estável no tipo de amostra analisada, sendo que os genes normalizadores preenchem estes critérios (Romanowski, Markiewicz et al. 2007). Assim, os genes de referência, também chamados de constitutivos, por definição mantêm as funções metabólicas básicas da célula e proveem suporte durante o ciclo celular e, por isso, espera-se permanecerem com níveis estáveis de expressão em vários tipos teciduais ou celulares (Khimani, Mhashilkar et al. 2005).

Frequentemente, os genes que codificam a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (Assou, Haouzi et al. 2013), a  $\beta$ -actina (ACTB) (Zhao, Cui et al. 2013), a proteína de ativação tirosina 3-monooxigenase 5-triptofano, polipeptídeo zeta (YWHAZ), a hipoxantina fosforibosil-transferase 1 (HPRT-1) e a  $\beta$  2-microglobulina (B2M) (Machado, A.B. e colaboradores – dados não publicados) são os mais utilizados para este controle interno do

experimento em culturas de células ovarianas e/ou do trato reprodutor feminino. Diversos trabalhos realizados com células do *cumulus oophorus*, tanto humanas quanto animais, podendo-se citar o de Assou et al. (2013) e o de Pereira et al. (2013), utilizaram como genes normalizadores os acima citados. Da mesma forma, pesquisas realizadas com células murais da granulosa, dentre as quais cita-se a de Zhao et al. (2013) e a de Teino et al. (2013), tiveram os resultados de suas análises normalizados com os genes acima relacionados.

O RNA que codifica a enzima GAPDH é ubiquamente expresso, sendo que este gene é frequentemente utilizado como um controle endógeno para reações de RT-qPCR. Em alguns sistemas, sua expressão é constante em diferentes estágios do desenvolvimento e após manipulação experimental (Bustin 2000). O mRNA codificador da  $\beta$ -actina, por sua vez, é expresso em níveis moderadamente abundantes na maioria dos tipos celulares e codifica uma proteína do citoesqueleto celular (Bustin 2000). Com relação ao YWHAZ, sabe-se que este gene codifica uma proteína pertencente à família 14-3-3 de proteínas, a qual é uma família de proteínas ácidas altamente conservada evolutivamente e expressa em todos os organismos eucarióticos. As proteínas 14-3-3 interagem com proteínas alvo envolvidas na regulação de múltiplos processos celulares, como o controle do ciclo celular, o tráfico de proteínas, os processos anti apoptóticos, o metabolismo, a transdução de sinal, dentre outros (Nishimura, Komatsu et al. 2013). Já o transcrito do gene HPRT-1 é uma enzima de fosforribosilação atuante na via de recuperação de purinas, a qual também fosforribosila análogos citotóxicos de purinas. Por conseguinte, esta

enzima desempenha um papel fundamental para as células, estando suas mutações relacionadas com várias doenças (Finette, Kendall et al. 2002). Por fim, a  $\beta$  2-microglobulina humana é a proteína constituinte da cadeia leve da molécula de classe I do complexo principal de histocompatibilidade (MHC classe I), estando presente em todas as células nucleadas do organismo (He, Xu et al. 2004). A Tabela 1, abaixo, apresenta algumas informações a cerca de cada um destes genes normalizadores utilizados para avaliação de tecidos ginecológicos.

**Tabela 1.** Informações referentes aos genes (e suas respectivas proteínas) utilizados como candidatos a normalizadores.

	<b>Nome do gene</b>	<b>Código no GenBank (Gene ID)</b>	<b>Função celular</b>
<b>GAPDH</b>	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	2597	Catalisa a oxidação de gliceraldeído-3-fosfato a 1,3-bifosfoglicerato. <sup>1</sup>
<b>ACTB</b>	Beta-actina	60	Isoforma de actina encontrada no citoesqueleto celular (presente em <i>stress fibers</i> ). <sup>2,3</sup>
<b>YWHAZ</b>	Proteína de ativação tirosina 3-monooxigenase	7534	Proteína pertencente à família 14-3-3 de proteínas; interação com proteínas alvo envolvidas na regulação de múltiplos processos

	5-triptofano, polipeptídeo zeta		celulares. <sup>4</sup>
<b>HPRT1</b>	Hipoxantina fosforibosil- transferase 1	3251	Enzima de fosforribosilação atuante na via de recuperação de purinas. <sup>5</sup>
<b>B2M</b>	$\beta$ 2- microglobulina	567	Proteína constituinte da cadeia leve da molécula de classe I do MHC. <sup>6</sup>

<sup>1</sup> Zinsser, Hoey et al. 2014; <sup>2</sup> Bustin 2000; <sup>3</sup> Hoock, Newcomb et al. 1991;  
<sup>4</sup> Nishimura, Komatsu et al. 2013; <sup>5</sup> Finette, Kendall et al. 2002; <sup>6</sup> He, Xu et al.  
2004.

Desta forma, torna-se essencial a realização da avaliação da expressão gênica destes normalizadores, a fim de que o experimento com o corante BCB, e subsequente análise subcelular das células murais da granulosa e do *cumulus oophorus*, possua um controle interno que permita a padronização dos resultados.

**TRABALHO EXPERIMENTAL NA FORMA  
DE ARTIGO CIENTÍFICO**

Com intenção de publicação na revista *Journal of Assisted Reproduction  
and Genetics*, este artigo está formatado nos moldes exigidos pela  
revista.

# **Avaliação dos genes normalizadores para cultivo primário de células foliculares luteinizadas**

Júlia Schneider<sup>1,2§</sup>, Amanda de Barros Machado<sup>1,2</sup>, Helena von Eye Corleta<sup>2,3</sup>, Diego Duarte Alcoba<sup>1,2</sup>, Ilma Simoni Brum<sup>1,2</sup>

*1- Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral, Departamento de Fisiologia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS - BR;*

*2- Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular, Centro de Pesquisa Experimental – Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS - BR;*

*3 – Serviço de Ginecologia e Obstetrícia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS – BR*

§Autor correspondente. Telefone: 9104-7825

Endereço de e-mail: juliaschneider12@hotmail.com



## Abstract

*Purpose* The present study was undertaken in order to assess the most appropriate reference gene for gene expression studies with luteinized mural granulosa and *cumulus oophorus* cells from primary culture.

*Methods* RNA from mural granulosa and *cumulus oophorus* cells (treated or not with Brilliant Cresyl Blue) was extracted and then cDNA was synthesized. Real Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) was performed using primers for five candidate genes (GAPDH, ACTB, YWHAZ, HPRT1 and B2M). The candidate reference gene stability was evaluated with *NormFinder* software.

*Results* Our results indicated ACTB gene as the most stable for mural granulosa cells (although the combination of ACTB and HPRT1 was shown as more suitable). On the other hand, HPRT1 gene was indicated as the most stable for *cumulus oophorus* cells.

*Conclusions* ACTB and HPRT1 genes are recommended as the most suitable reference genes for mural granulosa and *cumulus oophorus* cells from primary culture.

Keywords: reference genes – gene expression – real-time PCR – granulosa cells – *cumulus oophorus* cells

## Introdução

A infertilidade é uma alteração complexa, com significativas implicações médicas e econômicas [1], que acomete cada vez mais indivíduos, resultando em aumento progressivo do aprimoramento das tecnologias de reprodução assistida (TRA) [2]. Um passo crítico para o sucesso das TRA é a avaliação da competência oocitária [3], visto que essa avaliação está diretamente relacionada com o sucesso nas taxas de gestação [4]. Portanto, faz-se necessário técnicas *in vitro* não invasivas de avaliação da qualidade do oócito [5], uma vez que as estratégias atuais de avaliação baseiam-se principalmente na morfologia do complexo *cumulus*-oócito (CCO) e esta é uma aferição bastante subjetiva [3].

É sabido que durante o crescimento/capacitação do oócito (período no qual o gameta torna-se competente para sofrer o processo de maturação), ocorrem modificações metabólicas celulares [6]. Dentre essas modificações destaca-se a diminuição da atividade específica da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) [7]. Em 1986 sugeriu-se que a atividade específica da G6PDH poderia ser estimada indiretamente pela utilização de um corante de vitalidade denominado Azul Cresil Brilhante (BCB) [8]. Isto se deve ao fato de que após exposição dos gametas ao BCB, o qual é reduzido a um composto incolor pela G6PDH, pode-se distinguir oócitos com diferentes níveis de atividade específica da enzima G6PDH de acordo com a coloração do citoplasma do gameta. Foi demonstrado que gametas que completaram seu crescimento, por apresentarem menor atividade específica da G6PDH, quando expostos ao BCB, apresentam coloração azulada (sendo classificados como BCB positivos), visto que o corante não é reduzido pela enzima. Ao contrário, gametas que ainda estão em fase de crescimento, por apresentarem maior atividade específica da G6PDH, quando expostos ao BCB permanecem incolores (sendo classificados como BCB negativos) [9]. Esta técnica, portanto, pode ser um método para efetivar a seleção dos oócitos mais competentes dentre os imaturos [10]. Desde então, inúmeros trabalhos foram realizados na tentativa de utilizar o BCB como método de seleção de oócitos competentes. Até o momento, porém, não há relatos sobre o uso do BCB na espécie humana; portanto, o quesito segurança referente à aplicação de BCB em nossa espécie ainda permanece questionado. Deste modo, torna-se necessário realizar uma avaliação subcelular dos possíveis efeitos causados aos oócitos pela exposição ao BCB, a fim de verificar se este método de seleção de gametas pode ser utilizado na espécie humana sem acarretar riscos. No entanto, a utilização de oócitos humanos é bastante restrita, devido, especialmente, à grande dificuldade de obtenção destas células para estudos experimentais. Consequentemente, faz-se necessária a utilização de modelo experimental que possa refletir, indiretamente, a qualidade do oócito e da estrutura folicular.

Sabe-se que, no folículo pré-ovulatório, as células foliculares mais intimamente associadas com o oócito são as células murais da granulosa (GCs), que revestem a parede do folículo, e as células do *cumulus oophorus* (CCs), as quais estão em contato direto com o oócito e formam o complexo *cumulus*-oócito (CCO) [11]. Deste modo, visto que estas células foliculares se

desenvolvem no mesmo microambiente que o oócito ao qual estão associadas, elas refletem informações importantes sobre a qualidade do gameta feminino [11]. Alterações na expressão gênica oocitária têm implicações na proliferação, na diferenciação e no funcionamento de ambos estes tipos celulares, sendo aceitável avaliar as GCs e as CCs a fim de identificar marcadores de viabilidade oocitária [3].

Análises de expressão gênica, idealmente, são acompanhadas da quantificação por RT-qPCR de genes normalizadores, ou seja, genes que tendem a apresentar expressão constante em todos os tecidos e estágios de desenvolvimento e que também não são afetados por condições experimentais [12]. Então, a quantificação do mRNA dos genes alvo e de referência, na amostra, garante que as mudanças nos níveis de transcrito influenciem ambos os genes igualmente [13].

Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar controles endógenos apropriados para a normalização em estudos de expressão gênica por RT-PCR em tempo real em culturas primárias de células murais da granulosa e células do *cumulus oophorus* submetidas ou não ao tratamento experimental de exposição ao corante Azul Cresil Brilhante.

## **Materiais e métodos**

### **Delineamento do estudo**

Trata-se de estudo experimental *in vitro*.

### **Pacientes**

Os complexos *cumuli*-oócito (CCOs) foram provenientes de oito pacientes que realizaram fertilização *in vitro* (FIV) no Núcleo de Reprodução Humana Gerar do Hospital Moinhos de Vento e foram submetidas à estimulação ovariana. Pacientes com Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) ou com indicação para FIV devido a infertilidade por fator ovulatório foram excluídas do estudo. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Número 120367). Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi aplicado a todas as pacientes.

### **Punção ovariana e coleta das células murais da granulosa**

A estimulação hormonal e subsequente aspiração dos gametas e de seu líquido folicular apresentam protocolos independentes deste estudo. O líquido folicular coletado, após seleção dos gametas recuperados, foi utilizado no experimento a fim de recuperar as células murais da granulosa (GCs). Este foi centrifugado por 15 minutos a 1100 g para sedimentação das células foliculares e sanguíneas; o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* formado foi adicionado sobre solução de gradiente de densidade de 50% (*Isolate Concentrate e HTF modificado com Hepes – Irvine Scientific*). A mistura foi centrifugada para separação das células da granulosa por 8 minutos a 1100 g, duas vezes, quando necessário. As células da granulosa foram ressuspensas em meio de cultivo (DMEM suplementado com 10% de soro, 75 U.I. de FSH e de LH, e 1% de antibiótico – kanamicina), contabilizadas (utilizando câmara de Neubauer) e plaqueadas na concentração de  $10^4$  células por poço em placas de 6 poços.

### **Coleta das células do *cumulus oophorus***

Após desnudamento dos gametas de suas células do *cumulus oophorus* (CCs), com protocolo independente deste estudo, o líquido contendo estas células foi ressuspensas em 2 mL de DMEM suplementado com 10% de soro, 75 U.I. de FSH e de LH e 1% de antibiótico (kanamicina). A quantidade de células recuperadas foi contabilizada (utilizando câmara de Neubauer) e, após, as células foram plaqueadas na concentração de  $10^4$  células por poço em placas de 6 poços.

## Cultivo celular e tratamento experimental

As células recuperadas (GCs e CCs) foram incubadas em estufa a 37° C com 5% de CO<sub>2</sub> em ambiente umidificado por um período inicial de 48 horas. O meio utilizado foi DMEM *high* glicose com fenol red suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 75 U.I. de FSH (hormônio folículo estimulante) e LH (hormônio luteinizante) e 1% de antibiótico (kanamicina). Após 48 horas de cultivo (durante as quais houve a troca do meio de cultura quando transcorridas 24 horas) as células do grupo tratado foram expostas ao corante Azul Cresil Brilhante (BCB - 13µM) e as do grupo controle a novo meio de cultura. Após 60 minutos de tratamento, retirou-se a substância testada e o meio de cultura (do grupo controle) e foi acrescentado novo meio de cultura em ambos os grupos. As células foram incubadas novamente por um período de 48 horas (período este determinado a fim de mimetizar a maturação *in vitro*, que apresenta como tempo máximo de realização o período de 48 horas), após o qual realizou-se a extração do RNA total.

## Extração e quantificação do RNA total

As placas de cultura foram colocadas em gelo, o meio de cultura foi desprezado e as células foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS). As células foram lisadas diretamente nas placas com 1 mL/10 cm<sup>2</sup> de solução de fenol e isotiocianato de guanidina (reagente Trizol®, Invitrogen™), seguindo o protocolo do fabricante. Após o término da extração, as amostras foram armazenadas a -80° C. A quantificação da concentração de RNA foi realizada por meio do fluorímetro QuBit™ (Invitrogen®, EUA) segundo o protocolo específico Qubit Quantitation Platform, com reagentes do kit Quant-it™ (Invitrogen®, EUA).

## Síntese de cDNA

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 0,5 µg de RNA total por µL de solução, utilizando-se um oligonucleotídeo (*primer*) complementar à cauda poli-A característica do mRNA (Oligo (DT)<sub>12-18</sub>), produzindo um cDNA mais puro, predominantemente a partir do mRNA. O kit utilizado para a síntese do cDNA foi o SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen™), conforme o protocolo do fabricante. A reação de síntese do cDNA totalizou um volume de 21 µL, o qual foi armazenado a -20° C até a amplificação por PCR em tempo real (qPCR).

## PCR em Tempo Real

Dentre as variações da técnica de PCR em tempo real existentes, optou-se pela utilização do corante fluorescente SYBR *Green I* (Reagente Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG – Invitrogen™). Este corante liga-se à fita dupla de DNA com um aumento de 800 a 1000 vezes na fluorescência. Como o corante liga-se a qualquer fita dupla de DNA, foram realizadas as

chamadas curvas de desnaturação ou dissociação (*melting-Tm*), ou seja, curvas de fluorescência em função da temperatura. Com isso obteve-se a especificidade do produto amplificado, uma vez que a  $T_m$  é fortemente dependente da composição dos nucleotídeos do produto em questão. Produtos de amplificação que não correspondem ao esperado normalmente apresentam picos de desnaturação em temperaturas inferiores.

A quantificação das amostras amplificadas (em ng) foi realizada baseada na amplificação de uma curva de padronização, realizada para cada gene em estudo. Estas curvas de padronização foram obtidas através de reações de RT-qPCR feitas a partir de diluições seriadas 1:5 de cDNA de células murais da granulosa e de células do *cumulus oophorus*. A amplificação do cDNA foi feita em duplicata, tanto para a curva de padronização quanto para as amostras, em placas de 96 poços.

As condições da reação de PCR para cada gene em estudo foram padronizadas anteriormente ao procedimento de quantificação das amostras. Foram testadas as temperaturas de anelamento dos oligonucleotídeos e de extensão dos ciclos. As amostras de cDNA foram amplificadas pelo aparelho StepOnePlus™ Real Time PCR System (Applied Biosystems) em um volume total de 12,5  $\mu\text{L}$  (6,25  $\mu\text{L}$  de SuperMix, 1  $\mu\text{L}$  do corante ROX 50 $\mu\text{mol/L}$ , 0,2  $\mu\text{L}$  da solução de uso de cada *primer*, 1  $\mu\text{L}$  de amostra - diluída 1:10 - e 3,85  $\mu\text{L}$  de água). A curva de dissociação foi realizada por execução de um gradiente de 60-95° C para confirmar a presença de um único produto durante a reação. A eficiência da amplificação de cada gene foi determinada com base na inclinação (*slope*) da curva padrão. Esta curva foi feita utilizando-se cinco diferentes concentrações (não diluído, 1:5, 1:25, 1:125 e 1:625) de um *pool* de cDNA obtido a partir de 2  $\mu\text{L}$  do cDNA das amostras controle. As leituras de fluorescência emitidas por cada amostra nas reações foram feitas ao final de cada ciclo, sendo que as reações foram realizadas com 40 ciclos, mas a quantificação das amostras foi realizada durante o início do aumento exponencial da fluorescência.

### Curva de padronização e eficiência de amplificação

A curva de padronização para cada reação de RT-qPCR (ou seja, para cada gene em estudo), foi construída a partir de diluições seriadas 1:5 de um pool de cDNA, distinto para células murais da granulosa e para células do *cumulus oophorus*. Cada amostra a ser quantificada foi diluída na proporção de 1:10, a fim de que seu valor de quantificação se encontrasse dentro do intervalo da curva-padrão. A eficiência (E) de cada reação deve estar dentro de um intervalo de 90-110% para que seja considerada aceitável, visto que reações com baixa ou com muito alta eficiência possuem baixa sensibilidade. O valor de Slope é um indicativo da eficiência da reação e deriva da fórmula  $E = 10^{-1/\text{slope}} - 1$ , sendo que ele deve estar entre  $-3.3 \pm 10\%$  (refletindo, assim, uma eficiência de  $100\% \pm 10\%$ ). Outro parâmetro importante indicador da qualidade de uma reação de RT-qPCR é o coeficiente de correlação ( $R^2$ ). Este, quando  $> 0,99$ , indica uma boa correlação entre os pontos da curva de padronização, de modo a formar uma reta.

## Desenho de oligonucleotídeos

Foram utilizados os seguintes *primers* para avaliar a expressão gênica: GAPDH (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), ACTB (Beta-actina), YWHAZ (Proteína de ativação tirosina 3-monooxigenase 5-triptofano, polipeptídeo zeta), HPRT-1 (Hipoxantina fosforibosiltransferase 1) e B2M (Beta-2-microglobulina); tais *primers* foram desenhados utilizando-se a ferramenta PrimeTime qPCR Assay Entry (IDT, Integrated DNA Technologies) e sintetizados pela IDT [14]. Todos estes apresentam função celular já estabelecida, variando desde a participação em vias metabólicas (GAPDH e HPRT-1), transdução de sinal (YWHAZ) e composição do citoesqueleto (ACTB) até a participação no Sistema Imunitário (B2M). A Tabela 1 apresenta informações adicionais sobre cada gene candidato a normalizador.

## Análise estatística

A análise dos dados de amplificação das amostras foi realizada com auxílio do software GenEx (MultiD Analysis), o qual contém o algoritmo *NormFinder*. Este software, disponível online e com acesso livre, calcula o valor de estabilidade para todos os candidatos a genes normalizadores testados em um conjunto de amostras contendo qualquer número de amostras organizadas em um determinado número de grupos. Portanto, a estabilidade dos genes é mostrada como valor de estabilidade e os genes com menor valor de estabilidade são os que possuem maior estabilidade de expressão. Esta ferramenta fornece, além dos valores de estabilidade de expressão de cada gene independentemente dos demais analisados, os valores de estabilidade considerando análises intra e intergrupo e a melhor combinação de dois genes. Desta forma, este algoritmo estima a variação total da expressão gênica, considerando uma possível variação ao longo de subgrupos amostrais [15].

## Resultados

Objetivando-se identificar o melhor gene normalizador para estudos de expressão gênica em cultura primária de células murais da granulosa e de células do *cumulus oophorus*, avaliou-se a expressão gênica de cinco genes já descritos na literatura como sendo genes constitutivos (GAPDH, ACTB, YWHAZ, HPRT-1 e B2M).

### Curva de padronização e eficiência de amplificação

A Tabela 2 fornece informações sobre eficiência, Slope e coeficiente de correlação referentes às reações de RT-qPCR para cada par de *primers* utilizado, além da sequência destes e do tamanho do fragmento. Os três fatores relacionados com a qualidade da reação encontram-se dentro dos intervalos de variação aceitáveis nas cinco reações, o que demonstra reações com acurada e confiável quantificação das amostras.

### Nível de expressão dos genes candidatos a normalizadores

O ciclo de quantificação ( $C_Q$ ) médio de cada gene em estudo demonstrou que estes apresentaram diferentes níveis de expressão, sendo que, no grupo celular GC, GAPDH apresentou os maiores níveis de expressão (correspondentes a valores menores de  $C_Q$ ) e HPRT-1, os menores (correspondentes a valores maiores de  $C_Q$  e ciclos de quantificação ditos tardios). No grupo celular CC, GAPDH apresentou os maiores níveis de expressão, enquanto que B2M, os menores. A Tabela 4 mostra uma análise inicial da dispersão das amostras considerando os valores de ciclo limiar, listados em ordem crescente de coeficiente de variação, isto é, os localizados na parte superior, teoricamente, teriam menor variabilidade devido à menor dispersão dos dados. O valor da razão entre os valores mínimo e máximo dos  $C_Q$ s (*MFC*, *maximum fold change*) foi inferior a 2 nos cinco genes, o que também é um indicador de estabilidade de expressão (Tabela 4). Porém, os genes analisados, ainda assim, não apresentaram uma expressão constante, o que pode ser visualizado na Figura 1, a qual apresenta a dispersão dos valores de  $C_Q$  obtidos para as amostras analisadas. Desta forma, estes dados não fornecem informações suficientes a cerca da estabilidade de expressão dos genes estudados para assegurar a escolha de um bom gene de referência. Assim, fez-se a análise da estabilidade destes genes utilizando-se um software que se baseia em algoritmo específico para esta finalidade.

### Estabilidade de expressão dos genes candidatos a normalizadores



Os dados obtidos para cada gene testado nas amostras analisadas foram avaliados utilizando-se o software *NormFinder*, o qual é específico para a determinação de genes normalizadores e considera o fator intervenção (grupo) na sua análise [15].

As amostras, separadas em células murais da granulosa e células do *cumulus oophorus*, foram divididas em dois grupos, sendo eles: Grupo 1 – grupo controle, composto por células que não receberam nenhum tipo de tratamento experimental (N=5 para GC e N=6 para CC) e Grupo 2 – grupo tratado, composto por células que foram expostas ao corante Azul Cresil brilhante (N=6 para GC e para CC). A variação dos valores de estabilidade para cada um dos cinco genes analisados estatisticamente neste trabalho, tanto para GC quanto para CC, está representada nas Figuras 2 e 3. *NormFinder* indicou, para o tipo celular GC, o gene ACTB como sendo o que apresentou a menor variação de expressão, quando analisados os grupos 1 e 2 juntamente, visto que este mostrou o menor valor de estabilidade (valor de estabilidade = 0,192). A melhor combinação de dois genes para o tipo celular em questão foi ACTB e HPRT-1 (valor de estabilidade = 0,146). Já para o tipo celular CC, o *software* indicou o gene HPRT-1 como sendo o mais estável (valor de estabilidade = 0,140) e a combinação de genes ACTB e HPRT-1 (valor de estabilidade = 0,111). Em ambos os tipos celulares, B2M mostrou ser o gene mais variável. Os dados estão na Tabela 3. O *software* também forneceu os valores de estabilidade considerando análises intragrupo e intergrupo (Figuras 4 e 5). No caso das células murais da granulosa, apenas a análise intragrupo confirma a menor variabilidade do gene ACTB, enquanto que nas células do *cumulus oophorus*, tanto a análise intragrupo quanto a intergrupo confirmam a maior estabilidade do gene HPRT-1.

## Discussão

Apesar da grande utilização do corante Azul Cresil Brilhante (BCB) como método de seleção de oócitos em espécies animais, o quesito segurança referente à aplicação de BCB na espécie humana ainda permanece questionado. Desta forma, a análise da expressão gênica de células foliculares expostas e não expostas ao BCB representa uma maneira indireta de avaliação dos efeitos subcelulares ocasionados por este corante em oócitos humanos. Para estudos de expressão gênica, genes de referência são frequentemente utilizados como controles endógenos para a quantificação relativa de genes alvo utilizando-se a reação em cadeia da polimerase a partir de transcrição reversa em tempo real (RT-qPCR) [16]. A quantificação acurada de um bom gene normalizador permite a normalização das diferenças na quantidade de RNA ou de cDNA amplificáveis em amostras individuais [17]. Estes genes, portanto, são, idealmente, expressos constitutivamente entre os diferentes tecidos de um organismo, em todos os estágios do seu desenvolvimento, não sofrendo alterações por tratamentos experimentais [15]. Além disso, devem apresentar estabilidade e expressão não regulada no tipo de amostra analisada [18]. Porém, o consenso atual é de que não há um único gene normalizador universal [15, 19], pois já é sabido que a expressão de genes de referência comumente utilizados pode ser regulada sob condições experimentais específicas [20]. Assim, o gene para controle endógeno do experimento deve ser selecionado para cada condição experimental específica [21], sendo que uma quantificação confiável e acurada da expressão de mRNA requer uma prévia e adequada validação de um gene normalizador apropriado [15, 20, 22]. A escolha errônea de um gene de referência pode levar a resultados irrealistas e consequente comprometimento da interpretação dos achados de expressão gênica [19, 22]. Por conseguinte, os genes normalizadores devem ser escolhidos levando-se em consideração o tipo de tecido a ser analisado e as condições experimentais específicas aplicadas às amostras, visto que ocorrem variações nos níveis transcricionais devido a estes fatores [13].

Frequentemente, os genes que codificam a enzima GAPDH [23], a  $\beta$ -actina [24], a proteína YWHAZ, o HPRT-1 e a B2M (Machado, A.B. e colaboradores – dados não publicados) são os mais utilizados para o controle interno do experimento em culturas de células ovarianas e/ou do trato reprodutor feminino. Porém, ainda não há pesquisas com células da granulosa e do cumulus expostas ao BCB e sabe-se, também, que os trabalhos que avaliam a expressão gênica de oócitos expostos ao BCB utilizam diferentes genes normalizadores, não havendo indicação de qual o melhor controle endógeno para experimentos nos quais estas células são tratadas com o corante.

Os cinco genes candidatos a normalizadores testados apresentam funções celulares conhecidas e participam de vias celulares independentes, não sofrendo co-regulação. Analisando-se os valores de  $C_Q$  médios, pode-se perceber que os genes estudados apresentam diferentes níveis de expressão gênica nas amostras analisadas. Sabendo-se que o  $C_Q$  é inversamente proporcional ao nível de expressão gênica, tem-se que GAPDH apresentou os maiores níveis de expressão (correspondente a valores menores de  $C_Q$ ), tanto em células da granulosa quanto em células do cumulus. Isto pode ser explicado pelo conhecido alto consumo de piruvato pelos oócitos, sendo

este o substrato energético preferido destas células. Visto que a glicose é metabolizada a piruvato (havendo atuação da enzima em questão) nas células foliculares e, então, o piruvato é transferido ao oócito através de *gap junctions* [25], a elevada expressão da GAPDH nestas células é facilmente compreendida. Diferentemente, genes distintos mostraram os menores níveis de expressão nos dois tipos celulares analisados, sendo eles HPRT-1 e B2M nas células da granulosa e do cumulus, respectivamente. Entretanto, nenhum dos cinco genes analisados mostrou expressão constante e, desta forma, estes dados baseados no padrão de expressão dos genes não fornecem informações suficientes para assegurar qual, dentre os genes candidatos, o melhor gene normalizador. Então, fez-se necessária a análise da estabilidade dos genes em estudo por meio de algoritmo específico para busca de genes normalizadores.

Vários programas para identificar a estabilidade de expressão de um gene e indicar qual o gene de referência mais adequado sob diferentes condições experimentais estão disponíveis, sendo que os diferentes algoritmos estatísticos utilizados por estes *softwares* para mensurar a estabilidade de expressão, normalmente, produzem resultados com mínimas diferenças [26]. Porém, estudos recomendam o uso de apenas uma destas ferramentas disponíveis para a busca de genes normalizadores [27] e, assim, optou-se pela utilização do *software NormFinder* [15] para analisar os dados de expressão gênica de células murais da granulosa e de células do *cumulus oophorus*.

O programa indicou, para o tipo celular GC, o gene ACTB como sendo o que apresentou a menor variação de expressão, quando analisados os grupos controle e tratado (BCB) juntamente. Entretanto, para o tipo celular em questão, a combinação de genes ACTB e HPRT-1 apresentou menor valor de estabilidade (ou seja, menor variação) quando comparada ao gene ACTB individualmente. Analisando-se a Figura 4, pode-se perceber que a variação intragrupos do gene ACTB realmente foi a menor dentre os cinco genes analisados, demonstrando que este possa ter sofrido a menor interferência do tratamento experimental aplicado às células. Ao contrário, a variação intergrupos (Figura 4), ou variação biológica (de paciente para paciente) revela a falta de estabilidade do gene em questão. Talvez isto se deva ao fato de que as pacientes das quais as células foram coletadas não foram submetidas exatamente à mesma estimulação ovariana, e, assim, diferentes exposições a diferentes hormônios podem ter alterado de maneira distinta a expressão gênica neste grupo celular nestas pacientes. Além disto, como o valor de estabilidade fornecido pelo *software* para o gene ACTB ficou um pouco acima do normalmente aceitável e a combinação de dois genes demonstrou um resultado aceitável (com valor de estabilidade menor), pode-se considerar a hipótese de que, talvez, nenhum dos cinco genes testados como normalizadores sejam realmente adequados para experimentos com utilização de BCB em células da granulosa. Já para o tipo celular CC, o *software* indicou o gene HPRT-1 como sendo o mais estável dentre os analisados e, neste caso, o gene indicado mostrou mínima alteração na variação intragrupos e pequena na variação intergrupos (Figura 5), revelando ser estável neste tipo celular e com o tratamento experimental utilizado, apesar de, novamente, haver variação biológica. Todas estas variações na expressão gênica, principalmente com relação aos dois grupos analisados (controle e tratado com BCB), no entanto, são esperadas. Vários fatores, desde a obtenção do

tecido de diferentes organismos até as condições de extração de RNA, síntese de cDNA e amplificação interferem para alterações na expressão de genes em cultura primária.

Em estudos anteriores, Zhao e colaboradores [24] utilizaram os genes ACTB e GAPDH como normalizadores para trabalho com células da granulosa, enquanto que Teino e colaboradores [28] utilizaram, para o mesmo tipo celular, os genes GAPDH e TBP. Troppmann e colaboradores [29], por outro lado, normalizaram seus experimentos com células da granulosa através da utilização dos genes GAPDH e CYC1. Com relação às células do *cumulus oophorus*, grande parte dos estudos normalizou seus experimentos utilizando o gene GAPDH, dentre os quais pode-se citar o de Assou e colaboradores [23], o de Pereira e colaboradores [30], o de Assou e colaboradores [31] e o de Ghanem e colaboradores [32]. Como não há, até o momento, trabalhos com células da granulosa ou do cumulus expostas ao BCB, houve a necessidade de avaliar qual o melhor gene normalizador, devido à variedade de genes utilizados para normalizar experimentos com estas células.

Embora seja recomendada a utilização de mais de um gene de referência para a normalização acurada dos experimentos [22, 33], sabe-se que isto, muitas vezes, é impraticável, particularmente quando apenas poucos genes alvo necessitam ser estudados ou quando quantidades limitadas de RNA estão disponíveis [15, 19]. Neste caso, ambos os fatores são válidos para este estudo e, portanto, para cultura primária de células murais da granulosa optou-se, após análise dos resultados, pela utilização do gene ACTB como normalizador, enquanto que para cultura primária de células do *cumulus oophorus* o gene normalizador mais adequado é o HPRT-1.

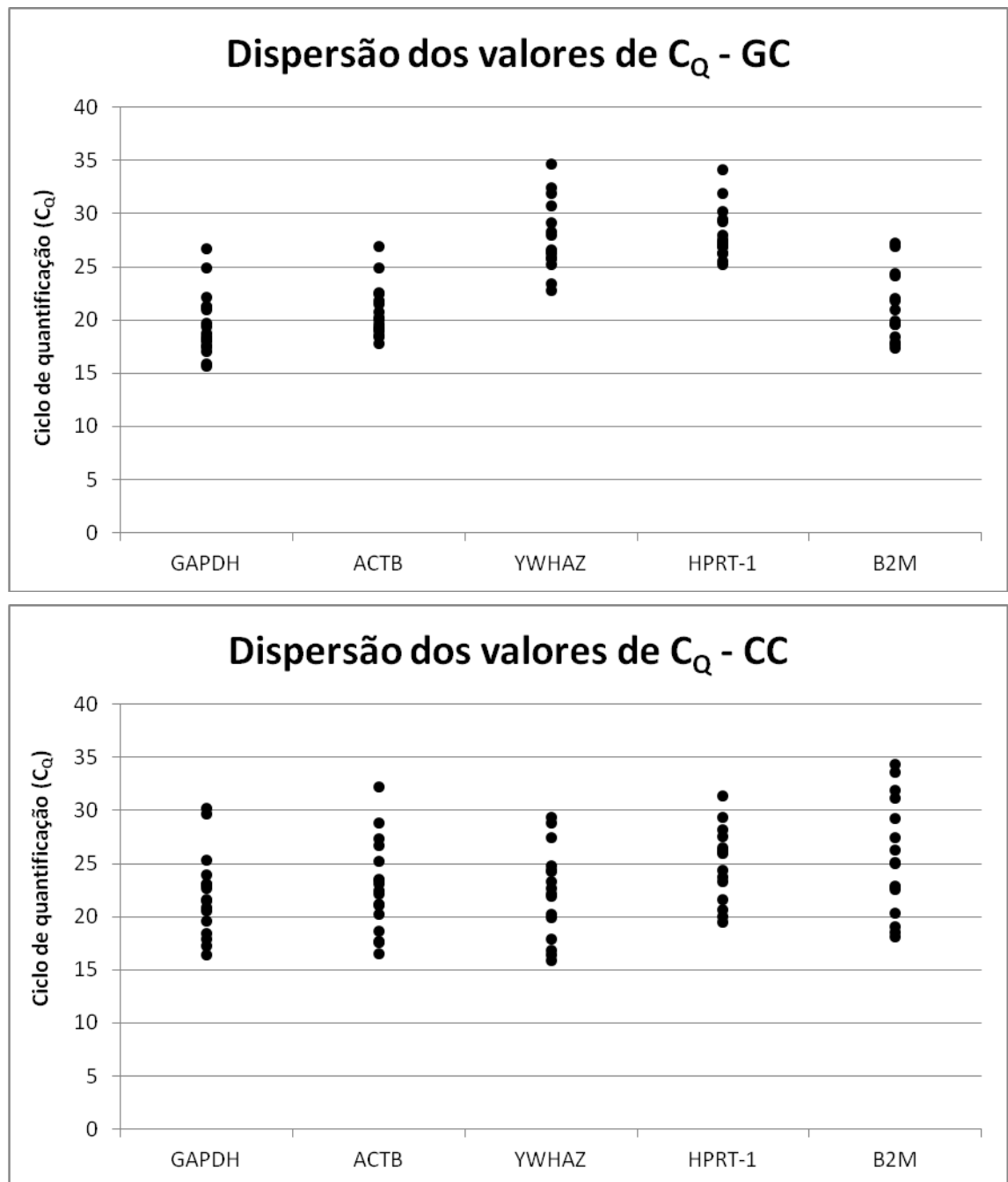
## Conclusão

Os resultados deste trabalho mostram que, dentre os cinco genes analisados, o gene ACTB e o gene HPRT-1 são os mais adequados para o propósito de normalização em estudos de expressão gênica por RT-qPCR com cultura primária de células murais da granulosa e de células do *cumulus oophorus*, respectivamente.

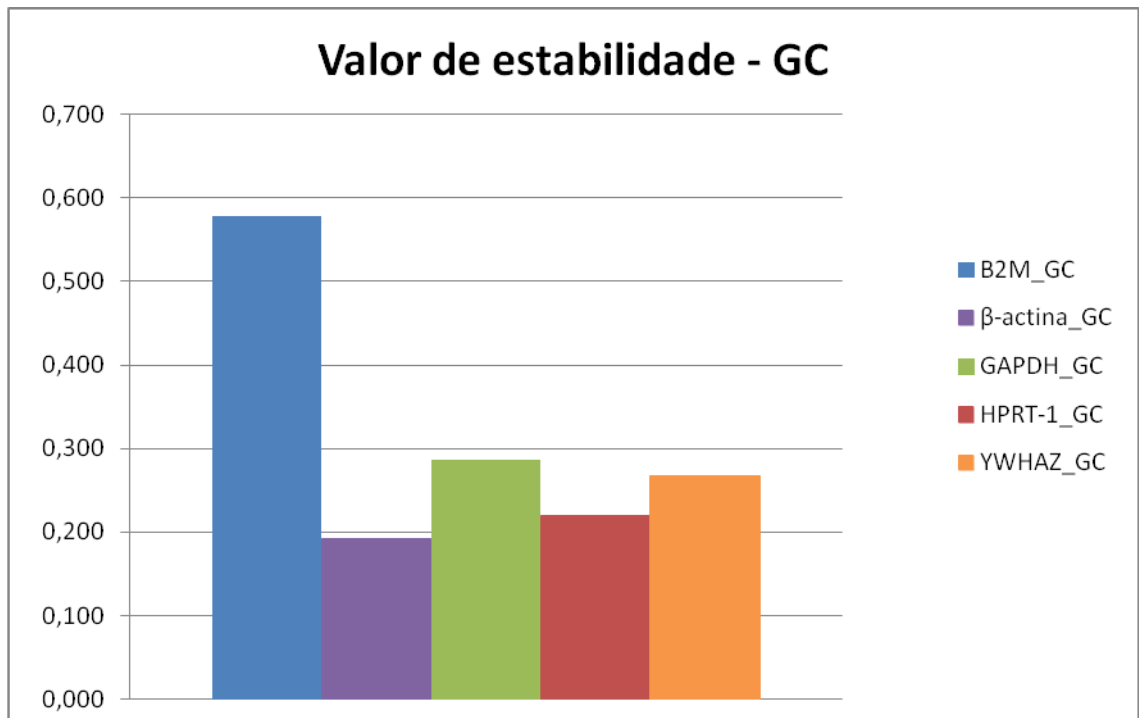
## **Agradecimentos**

Este trabalho foi realizado com auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

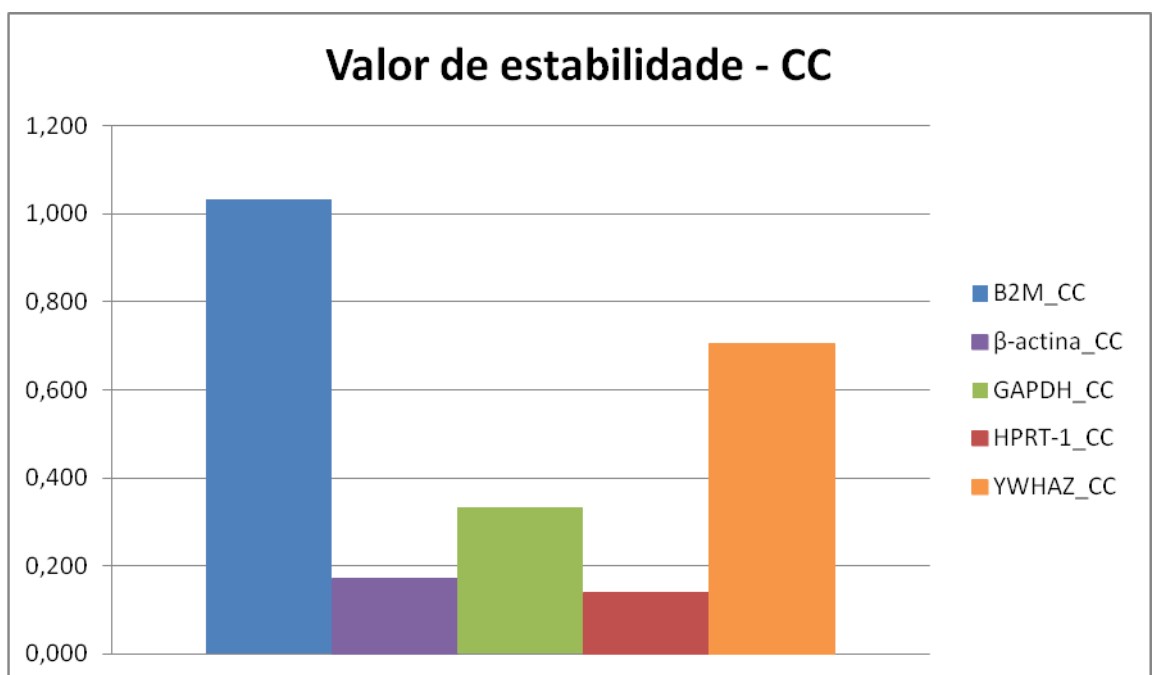
## Figuras



**Figura 1.** Gráficos com a dispersão dos valores de ciclo de quantificação para os genes analisados em células murais da granulosa (GC) e em células do *cumulus oophorus* (CC).

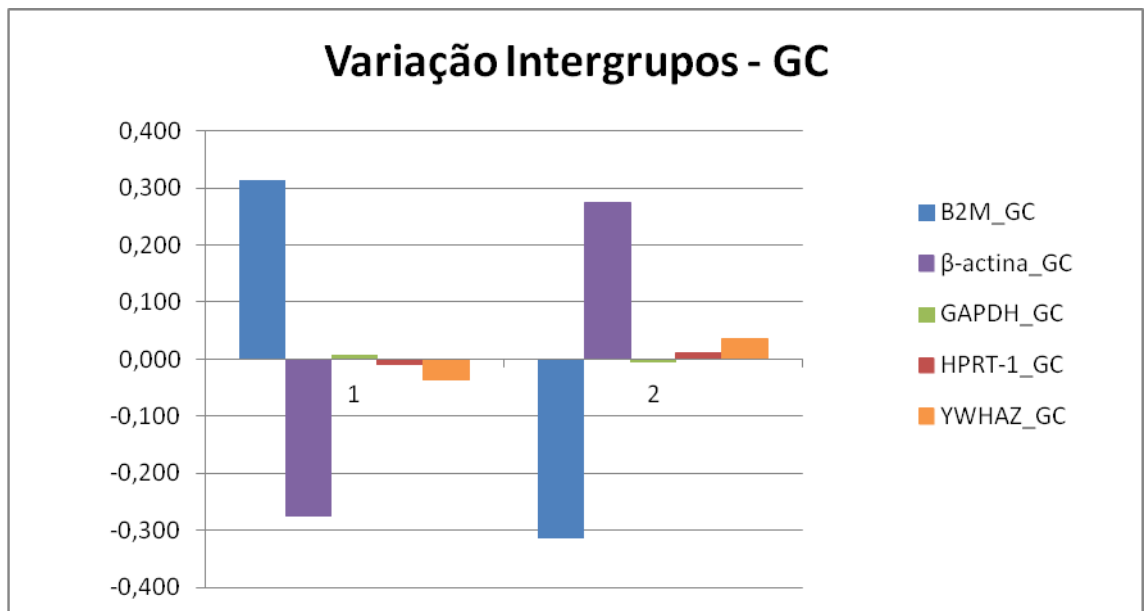
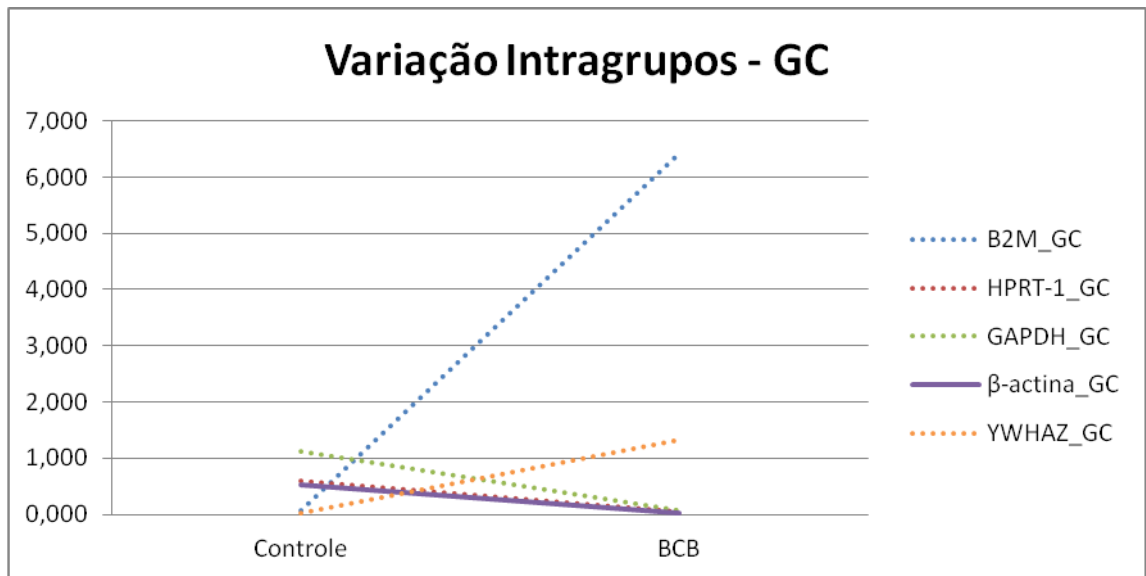


**Figura 2.** Gráfico com a variação dos valores de estabilidade para os genes analisados nas células murais da granulosa pelo *software NormFinder*, mostrando o gene β-actina como sendo o que apresentou menor valor de estabilidade.

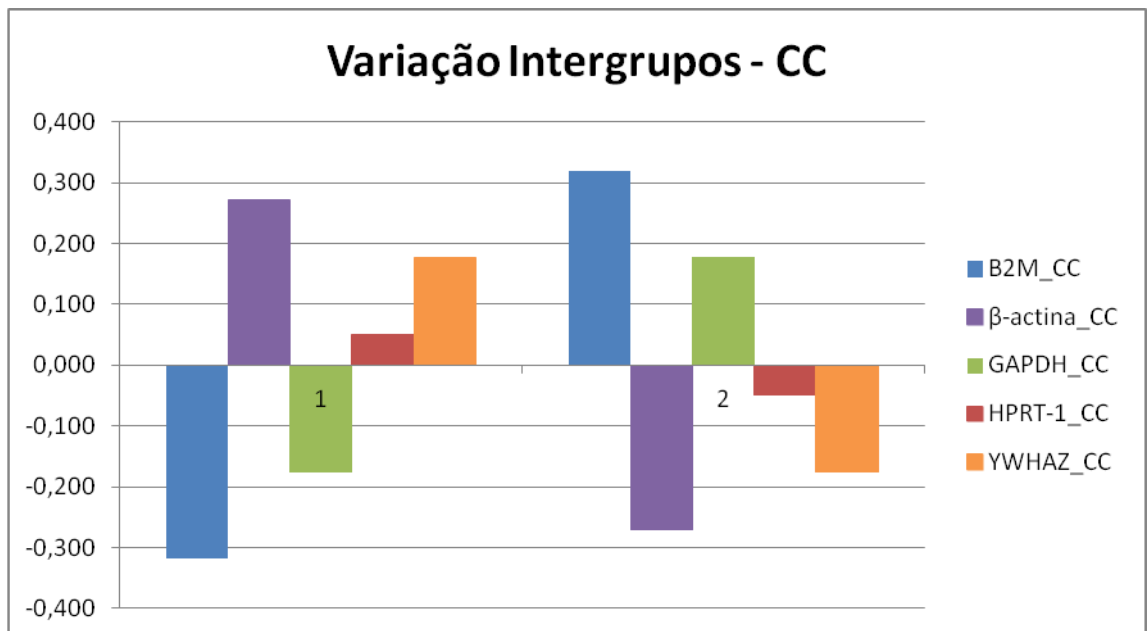
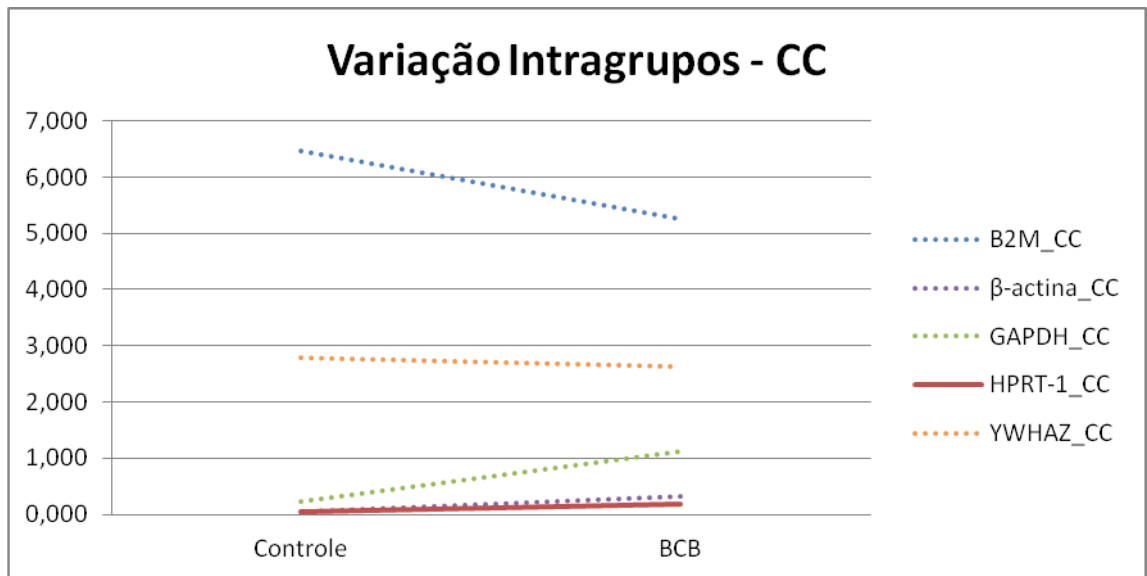


**Figura 3.** Gráfico com a variação dos valores de estabilidade para os genes analisados nas células do *cumulus oophorus* pelo *software NormFinder*, mostrando o gene HPRT-1 como sendo o que apresentou menor valor de estabilidade.





**Figura 4.** Gráficos representando a estabilidade dos genes analisados nas células murais da granulosa quando avaliadas as variações de expressão intragrupo e intergrupo. O gene  $\beta$ -actina mostrou menor variabilidade apenas no caso de análise intragrupo. 1 – Grupo controle; 2 – Grupo tratado (BCB).



**Figura 5.** Gráficos representando a estabilidade dos genes analisados nas células do *cumulus oophorus* quando avaliadas as variações de expressão intragrupo e intergrupo. O gene HPRT-1 mostrou menor variabilidade em ambas as situações. 1 – Grupo controle; 2 – Grupo tratado (BCB).

## Tabelas

**Tabela 1.** Informações sobre os genes candidatos a normalizadores para expressão gênica em cultura primária de células murais da granulosa e de células do *cumulus oophorus*.

Símbolo	Número de acesso*	Nome	Localização genômica	Função celular
<b>GAPDH</b>	NM_002046.4	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase [ <i>Homo sapiens</i> ]	12p13	Metabolismo de carboidratos
<b>ACTB</b>	NM_001101.3	Beta-actina	7p22	Citoesqueleto
<b>YWHAZ</b>	NM_001135699.1	Proteína de ativação tirosina 3-monooxigenase 5-triptofano, polipeptídeo zeta [ <i>Homo sapiens</i> ]	8q23.1	Proteína mediadora de transdução de sinal
<b>HPRT-1</b>	NM_000194.2	Hipoxantina fosforibosiltransferase 1 [ <i>Homo sapiens</i> ]	Xq26.1	Recuperação metabólica de purinas
<b>B2M</b>	NM_004048.2	Beta-2-microglobulina [ <i>Homo sapiens</i> ]	15q21-q22.2	Complexo Principal de Histocompatibilidade

\* Sequência de referência NCBI (Gene Bank). GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; ACTB:  $\beta$ -actina; YWHAZ: Proteína de ativação tirosina 3-monooxigenase 5-triptofano, polipeptídeo zeta; HPRT1: Hipoxantina fosforibosiltransferase 1; B2M: Beta-2-microglobulina.

**Tabela 2.** Sequências do oligonucleotídeos (*primers*) utilizados para amplificação do mRNA dos genes candidatos a normalizadores, tamanho do fragmento amplificado e informações sobre as reações de qPCR.

Gene	Sequência dos <i>Primers</i> (5'→3')	Tamanho do fragmento (pb*)	Coefficiente de correlação (R <sup>2</sup> )	Eficiência da reação de qRT-PCR (%)	Valor de Slope
<b>GAPDH</b>	Sense: CTTTGTCAAGCTCATTCCTGG	133	GC: 0,995	GC: 101,196	GC: -3,294
	Anti-sense: CTCCTCTTGTGCTCTTGC		CC: 0,999	CC: 103,958	CC: -3,231
<b>ACTB</b>	Sense: CTGGAACGGTGAAGGTGACA	140	GC: 0,996	GC: 108,434	GC: -3,135
	Anti-sense: AAGGGACTTCCTGTAACAATGCA		CC: 0,999	CC: 108,635	CC: -3,131
<b>YWHAZ</b>	Sense: CAACACATCCTATCAGACTGGG	133	GC: 0,993	GC: 98,213	GC: -3,366
	Anti-sense: AATGTATCAAGTTCAGCAATGGC		CC: 0,999	CC: 104,861	CC: -3,211
<b>HPRT-1</b>	Sense: AGATGGTCAAGGTCGCAAG	128	GC: 0,999	GC: 104,719	GC: -3,214
	Anti-sense: GTATTCATTATAGTCAAGGGCATATCC		CC: 1	CC: 109,157	CC: -3,12
<b>B2M</b>	Sense: CTATCCAGCGTACTCCAAAG	165	GC: 0,995	GC: 100,838	GC: -3,302
	Anti-sense: ACAAGTCTGAATGCTCCAAT		CC: 0,999	CC: 100,219	CC: -3,317

\* pb: pares de base; GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; ACTB: β-actina; YWHAZ: Proteína de ativação tirosina 3-monooxigenase 5-triptofano, polipeptídeo zeta; HPRT1: Hipoxantina fosforibosiltransferase 1; B2M: Beta-2-microglobulina; GC: Células murais da granulosa; CC: Células do *cumulus oophorus*.

**Tabela 3.** Ordem dos genes candidatos a normalizador de RT-qPCR em cultura primária de células murais da granulosa e de células do *cumulus oophorus* com base nos valores de estabilidade de expressão calculados pela ferramenta *NormFinder*. Os genes estão listados do mais estável para o menos estável.

<b>Ordem</b>	<b>Valor de estabilidade - GC</b>	<b>Valor de estabilidade - CC</b>
1	ACTB – 0,192	HPRT-1 – 0,140
2	HPRT-1 – 0,219	ACTB – 0,171
3	YWHAZ – 0,268	GAPDH – 0,334
4	GAPDH – 0,287	YWHAZ – 0,704
5	B2M – 0,578	B2M – 1,033

GC: Células murais da granulosa; CC: Células do *cumulus oophorus*.

**Tabela 4.** Medidas de dispersão dos valores de  $C_Q$  dos genes analisados.

<b>Gene (GC)</b>	<b>Média dos <math>C_{Qs}</math></b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>CV (%)</b>	<b><i>MFC</i></b>	<b>Gene (CC)</b>	<b>Média dos <math>C_{Qs}</math></b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>CV (%)</b>	<b><i>MFC</i></b>
HPRT-1	27,79	2,03	7,29	1,35	HPRT-1	24,64	3,33	13,51	1,61
ACTB	20,69	2,20	10,62	1,51	GAPDH	21,68	3,32	15,30	1,84
YWHAZ	27,27	3,16	11,57	1,52	YWHAZ	22,02	3,86	17,54	1,85
GAPDH	19,39	2,75	14,20	1,71	ACTB	22,82	4,19	18,36	1,95
B2M	21,27	3,22	15,16	1,57	B2M	25,51	5,26	20,61	1,89

CV: coeficiente de variação; *MFC*: *Maximum Fold Change*; GC: Células murais da granulosa; CC: Células do *cumulus oophorus*.

## Referências bibliográficas

1. Benyamini, Y., M. Gozlan, and E. Kokia, *Variability in the difficulties experienced by women undergoing infertility treatments*. Fertil Steril, 2005. **83**(2): p. 275-83.
2. Dzik, A., et al., *Atlas de Reprodução Humana*. 1st. ed. Vol. 1. 2012, São Paulo: Segmento Farma Editores Ltda. 280.
3. Uyar, A., S. Torrealday, and E. Seli, *Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality*. Fertil Steril, 2013. **99**(4): p. 979-97.
4. Bromer, J.G. and E. Seli, *Assessment of embryo viability in assisted reproductive technology: shortcomings of current approaches and the emerging role of metabolomics*. Curr Opin Obstet Gynecol, 2008. **20**(3): p. 234-41.
5. Goovaerts, I.G., et al., *Noninvasive bovine oocyte quality assessment: possibilities of a single oocyte culture*. Theriogenology, 2010. **74**(9): p. 1509-20.
6. Hyttel, P., et al., *Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle*. Theriogenology, 1997. **47**: p. 23-32.
7. Tsutsumi, O., et al., *Determination of enzyme activities of energy metabolism in the maturing rat oocyte*. Mol Reprod Dev, 1992. **33**(3): p. 333-7.
8. Williams, T.J., *A technique for sexing mouse embryos by a visual colorimetric assay of the X-linked enzyme, glucose 6-phosphate dehydrogenase*. Theriogenology, 1986. **25**(5): p. 733-9.
9. Ericsson, S.A., et al., *Assessment of porcine oocytes using brilliant cresyl blue*. Theriogenology, 1993. **39**.
10. Mota, G.B., et al., *Developmental competence and expression of the MATER and ZAR1 genes in immature bovine oocytes selected by brilliant cresyl blue*. Zygote, 2010. **18**(3): p. 209-16.
11. Fragouli, E., M.D. Lalioti, and D. Wells, *The transcriptome of follicular cells: biological insights and clinical implications for the treatment of infertility*. Hum Reprod Update, 2014. **20**(1): p. 1-11.
12. Bhatia, P., et al., *Comparison of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 28S-ribosomal RNA gene expression as RNA loading controls for northern blot analysis of cell lines of varying malignant potential*. Anal Biochem, 1994. **216**(1): p. 223-6.
13. Romanowski, T., et al., *[Housekeeping genes as a reference in quantitative real-time RT-PCR]*. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2007. **61**: p. 500-10.
14. Souza, A.F., et al., *Reference gene for primary culture of prostate cancer cells*. Mol Biol Rep, 2013. **40**(4): p. 2955-62.
15. Andersen, C.L., J.L. Jensen, and T.F. Orntoft, *Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets*. Cancer Res, 2004. **64**(15): p. 5245-50.
16. Ohl, F., et al., *Gene expression studies in prostate cancer tissue: which reference gene should be selected for normalization?* J Mol Med (Berl), 2005. **83**(12): p. 1014-24.

17. Radonic, A., et al., *Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **313**(4): p. 856-62.
18. Bustin, S.A., *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays*. J Mol Endocrinol, 2000. **25**(2): p. 169-93.
19. Huggett, J., et al., *Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations*. Genes Immun, 2005. **6**(4): p. 279-84.
20. Santos, A.R. and C.B. Duarte, *Validation of internal control genes for expression studies: effects of the neurotrophin BDNF on hippocampal neurons*. J Neurosci Res, 2008. **86**(16): p. 3684-92.
21. Pfaffl, M.W., et al., *Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations*. Biotechnol Lett, 2004. **26**(6): p. 509-15.
22. Vandesompele, J., et al., *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes*. Genome Biol, 2002. **3**(7): p. RESEARCH0034.
23. Assou, S., et al., *Comparative gene expression profiling in human cumulus cells according to ovarian gonadotropin treatments*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 354582.
24. Zhao, K.K., et al., *Effect of HSP10 on apoptosis induced by testosterone in cultured mouse ovarian granulosa cells*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2013. **171**(2): p. 301-6.
25. Collado-Fernandez, E., H.M. Picton, and R. Dumollard, *Metabolism throughout follicle and oocyte development in mammals*. Int J Dev Biol, 2012. **56**(10-12): p. 799-808.
26. Radonic, A., et al., *Reference gene selection for quantitative real-time PCR analysis in virus infected cells: SARS corona virus, Yellow fever virus, Human Herpesvirus-6, Camelpox virus and Cytomegalovirus infections*. Virol J, 2005. **2**: p. 7.
27. Wan, Q., et al., *Validation of housekeeping genes as internal controls for studying biomarkers of endocrine-disrupting chemicals in disk abalone by real-time PCR*. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2011. **153**(3): p. 259-68.
28. Teino, I., et al., *Transcriptional repression of the Ahr gene by LHCGR signaling in preovulatory granulosa cells is controlled by chromatin accessibility*. Mol Cell Endocrinol, 2014. **382**(1): p. 292-301.
29. Troppmann, B., et al., *microRNA miR-513a-3p acts as a co-regulator of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor gene expression in human granulosa cells*. Mol Cell Endocrinol, 2014. **390**(1-2): p. 65-72.
30. Pereira, G.R., et al., *The involvement of growth hormone in equine oocyte maturation, receptor localization and steroid production by cumulus-oocyte complexes in vitro*. Res Vet Sci, 2013. **95**(2): p. 667-74.
31. Assou, S., et al., *MicroRNAs: new candidates for the regulation of the human cumulus-oocyte complex*. Hum Reprod, 2013. **28**(11): p. 3038-49.
32. Ghanem, N., et al., *Differential expression of selected candidate genes in bovine embryos produced in vitro and cultured with chemicals modulating lipid metabolism*. Theriogenology, 2014.



33. Lisowski, P., et al., *Evaluation of reference genes for studies of gene expression in the bovine liver, kidney, pituitary, and thyroid*. J Appl Genet, 2008. **49**(4): p. 367-72.

## Conclusões e perspectivas

Este estudo foi realizado devido à necessidade de determinar qual o gene normalizador mais adequado para estudos de expressão gênica em cultura primária de células murais da granulosa e de células do *cumulus oophorus* expostas e não expostas ao BCB. De acordo com a análise do *software NormFinder*, dentre os cinco genes avaliados, o gene ACTB foi o que apresentou menor variabilidade de expressão em células murais da granulosa, enquanto que o gene HPRT-1 foi o indicado pelo programa como sendo o mais estável em células do *cumulus oophorus*, sendo assim indicados para normalização de experimentos de expressão gênica em culturas primárias de células foliculares.

Estes resultados poderão ser utilizados para a próxima etapa do projeto maior ao qual este trabalho está vinculado, ou seja, para a avaliação da expressão gênica de três genes alvo relacionados com ciclo celular e apoptose. É também importante ressaltar que os genes indicados pelo *software* poderão ser utilizados como genes normalizadores não somente pelo grupo de pesquisa do qual faço parte, mas também por outros pesquisadores que venham a trabalhar com culturas primárias de células foliculares expostas e não expostas ao corante BCB.

## Bibliografia adicional

- Assou, S., D. Haouzi, et al. (2013). "Comparative gene expression profiling in human cumulus cells according to ovarian gonadotropin treatments." Biomed Res Int **2013**: 354582.
- Benyamini, Y., M. Gozlan, et al. (2005). "Variability in the difficulties experienced by women undergoing infertility treatments." Fertil Steril **83**(2): 275-283.
- Bhatia, P., W. R. Taylor, et al. (1994). "Comparison of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 28S-ribosomal RNA gene expression as RNA loading controls for northern blot analysis of cell lines of varying malignant potential." Anal Biochem **216**(1): 223-226.
- Bhojwani, S., H. Alm, et al. (2007). "Selection of developmentally competent oocytes through brilliant cresyl blue stain enhances blastocyst development rate after bovine nuclear transfer." Theriogenology **67**(2): 341-345.
- Bromer, J. G. and E. Seli (2008). "Assessment of embryo viability in assisted reproductive technology: shortcomings of current approaches and the emerging role of metabolomics." Curr Opin Obstet Gynecol **20**(3): 234-241.
- Bustin, S. A. (2000). "Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays." J Mol Endocrinol **25**(2): 169-193.
- Bustin, S. A. (2002). "Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems." J Mol Endocrinol **29**(1): 23-39.
- Bustin, S. A., V. Benes, et al. (2005). "Quantitative real-time RT-PCR--a perspective." J Mol Endocrinol **34**(3): 597-601.
- de Jonge, H. J., R. S. Fehrmann, et al. (2007). "Evidence based selection of housekeeping genes." PLoS One **2**(9): e898.
- Dzik, A., N. F. Donadio, et al. (2012). Atlas de Reprodução Humana. São Paulo, Segmento Farma Editores Ltda.
- Dzik, A., D. H. M. Pereira, et al. (2010). Tratado de reprodução assistida. São Paulo, Segmento Farma.
- Edirisinghe, W. R., S. M. Junk, et al. (1997). "Birth from cryopreserved embryos following in-vitro maturation of oocytes and intracytoplasmic sperm injection." Hum Reprod **12**(5): 1056-1058.

- Ericsson, S. A., M. L. Boice, et al. (1993). "Assessment of porcine oocytes using brilliant cresyl blue." Theriogenology **39**.
- Finette, B. A., H. Kendall, et al. (2002). "Mutational spectral analysis at the HPRT locus in healthy children." Mutat Res **505**(1-2): 27-41.
- Fragouli, E., M. D. Lalioti, et al. (2014). "The transcriptome of follicular cells: biological insights and clinical implications for the treatment of infertility." Hum Reprod Update **20**(1): 1-11.
- Goovaerts, I. G., J. L. Leroy, et al. (2010). "Noninvasive bovine oocyte quality assessment: possibilities of a single oocyte culture." Theriogenology **74**(9): 1509-1520.
- He, X. H., L. H. Xu, et al. (2004). "[Cloning of human beta-microglobulin gene and its high expression in Escherichia coli]." Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao **20**(1): 99-103.
- Huggett, J., K. Dheda, et al. (2005). "Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations." Genes Immun **6**(4): 279-284.
- Hyttel, P., T. Fair, et al. (1997). "Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle." Theriogenology **47**: 23-32.
- Jaroudi, K. A., J. M. Hollanders, et al. (1997). "Pregnancy after transfer of embryos which were generated from in-vitro matured oocytes." Hum Reprod **12**(4): 857-859.
- Jiang, J. Y., H. Xiong, et al. (2010). "Mural granulosa cell gene expression associated with oocyte developmental competence." J Ovarian Res **3**: 6.
- Khimani, A. H., A. M. Mhashilkar, et al. (2005). "Housekeeping genes in cancer: normalization of array data." Biotechniques **38**(5): 739-745.
- Le Du, A., I. J. Kadoch, et al. (2005). "In vitro oocyte maturation for the treatment of infertility associated with polycystic ovarian syndrome: the French experience." Hum Reprod **20**(2): 420-424.
- Li, R. and D. F. Albertini (2013). "The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte." Nat Rev Mol Cell Biol **14**(3): 141-152.
- Liu, J., E. Katz, et al. (1997). "Successful in vitro maturation of human oocytes not exposed to human chorionic gonadotropin during ovulation induction, resulting in pregnancy." Fertil Steril **67**(3): 566-568.
- Mota, G. B., R. I. Batista, et al. (2010). "Developmental competence and expression of the MATER and ZAR1 genes in immature bovine oocytes selected by brilliant cresyl blue." Zygote **18**(3): 209-216.

- Nishimura, Y., S. Komatsu, et al. (2013). "Overexpression of YWHAZ relates to tumor cell proliferation and malignant outcome of gastric carcinoma." Br J Cancer **108**(6): 1324-1331.
- Pujol, M., M. Lopez-Bejar, et al. (2004). "Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test." Theriogenology **61**(4): 735-744.
- Romanowski, T., A. Markiewicz, et al. (2007). "[Housekeeping genes as a reference in quantitative real-time RT-PCR]." Postepy Hig Med Dosw (Online) **61**: 500-510.
- Schmittgen, T. D. and B. A. Zakrajsek (2000). "Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR." J Biochem Biophys Methods **46**(1-2): 69-81.
- Tricarico, C., P. Pinzani, et al. (2002). "Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies." Anal Biochem **309**(2): 293-300.
- Tsutsumi, O., K. Satoh, et al. (1992). "Determination of enzyme activities of energy metabolism in the maturing rat oocyte." Mol Reprod Dev **33**(3): 333-337.
- Uyar, A., S. Torrealday, et al. (2013). "Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality." Fertil Steril **99**(4): 979-997.
- Williams, T. J. (1986). "A technique for sexing mouse embryos by a visual colorimetric assay of the X-linked enzyme, glucose 6-phosphate dehydrogenase." Theriogenology **25**(5): 733-739.
- Yang, Y. J., Y. J. Zhang, et al. (2009). "Ultrastructure of human oocytes of different maturity stages and the alteration during in vitro maturation." Fertil Steril **92**(1): 396 e391-396.
- Zhao, K. K., Y. G. Cui, et al. (2013). "Effect of HSP10 on apoptosis induced by testosterone in cultured mouse ovarian granulosa cells." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **171**(2): 301-306.

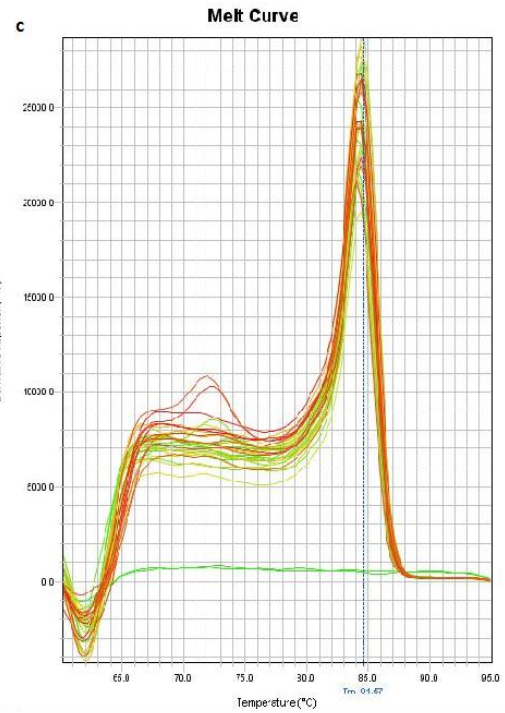
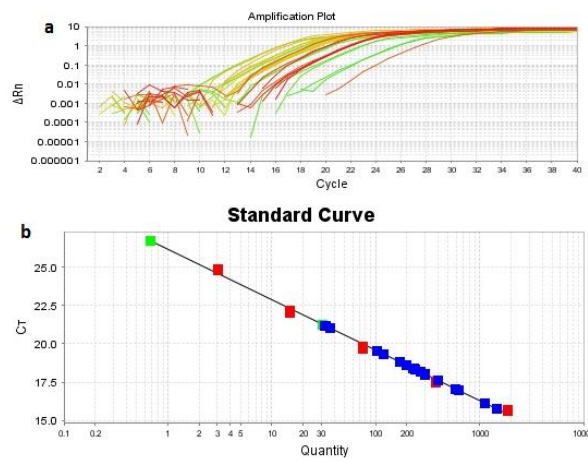
## Anexos

### Anexo 1

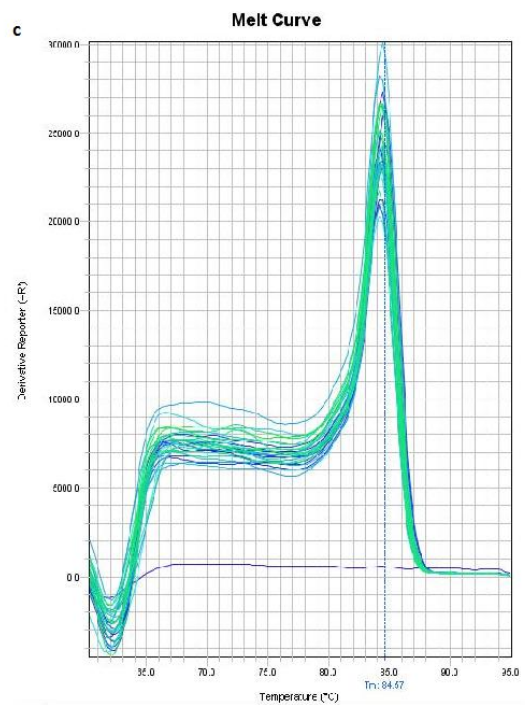
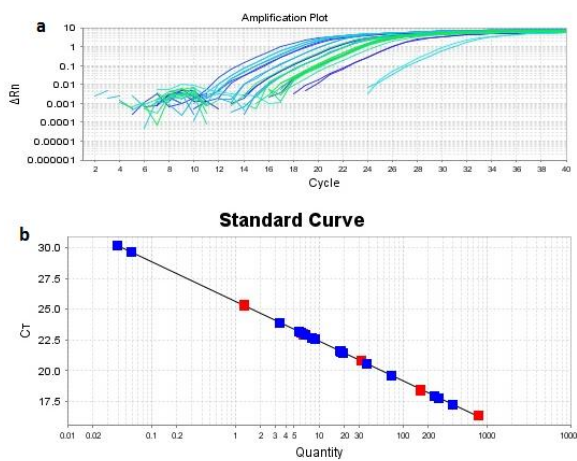
Gráficos de amplificação, curva-padrão e curva de desnaturação (curva de *melting*) resultantes da amplificação dos transcritos dos genes GAPDH (Figura 1 – A: GC; B: CC), ACTB (Figura 2 – A: GC; B:CC), YWHAZ (Figura 3 – A: GC; B: CC), HPRT-1 (Figura 4 – A: GC; B: CC) e B2M (Figura 5 – A: GC; B: CC).

Em **a** (gráfico de amplificação),  $\Delta Rn$  representa a diferença entre os valores finais e iniciais da razão unidade de fluorescência da amostra por unidade de fluorescência do corante Rox e está plotado *versus* o número de ciclos da reação. As linhas verdes e azuis escuras representam a amplificação das diluições seriadas da curva-padrão, para GC e CC, respectivamente, e as linhas coloridas representam a amplificação das amostras. Em **b** (gráfico da curva-padrão) estão representados os valores de  $C_t$  (*threshold cycle*) *versus* os valores de quantidade das amostras. Os pontos vermelhos representam os pontos da curva-padrão e os pontos em azul ou em verde representam as amostras. Em **c** a curva de *melting* está representada por Derivativa negativa da fluorescência (*Derivative Reporter (-Rn)*) *versus* temperatura (°C).

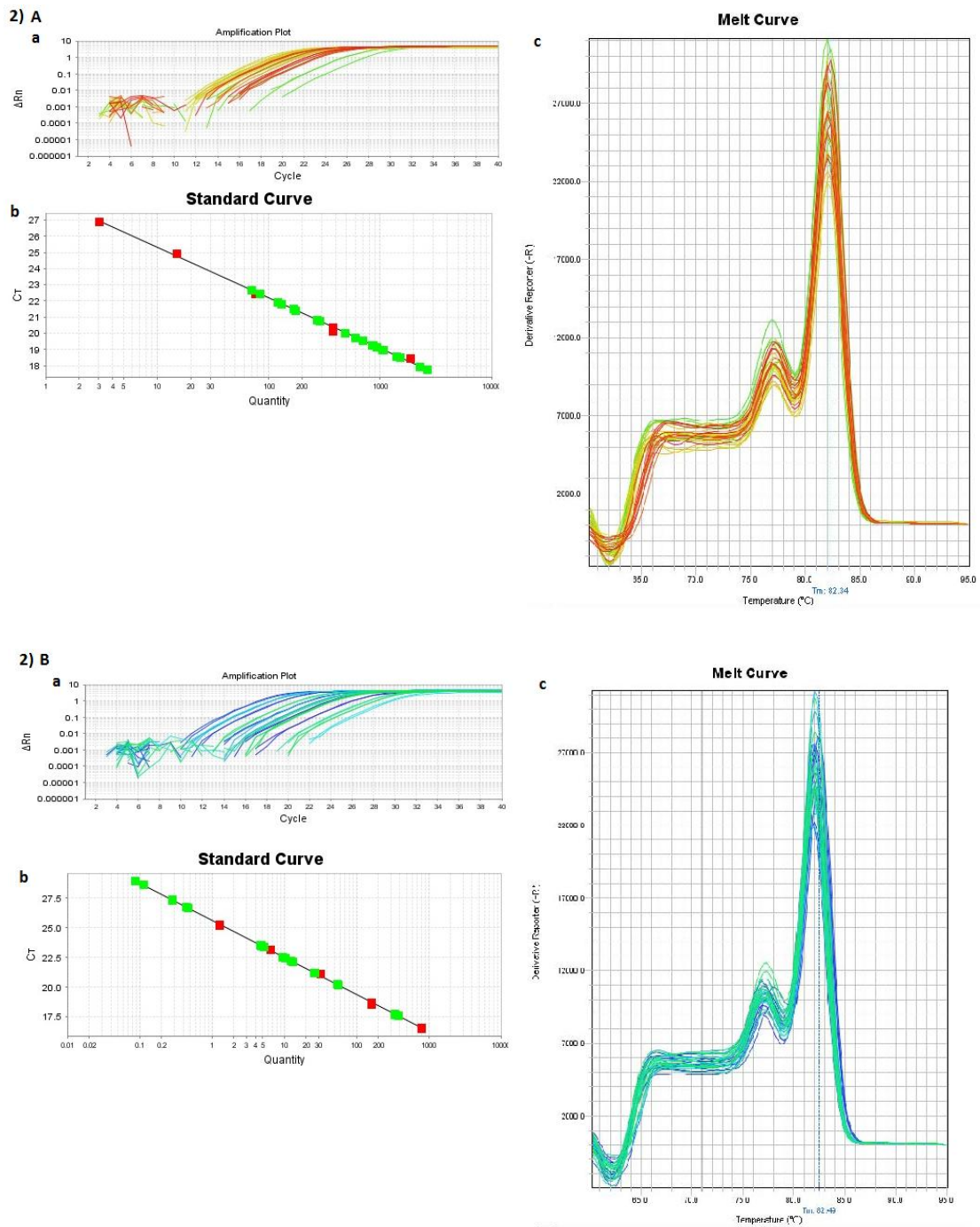
1) A



1) B



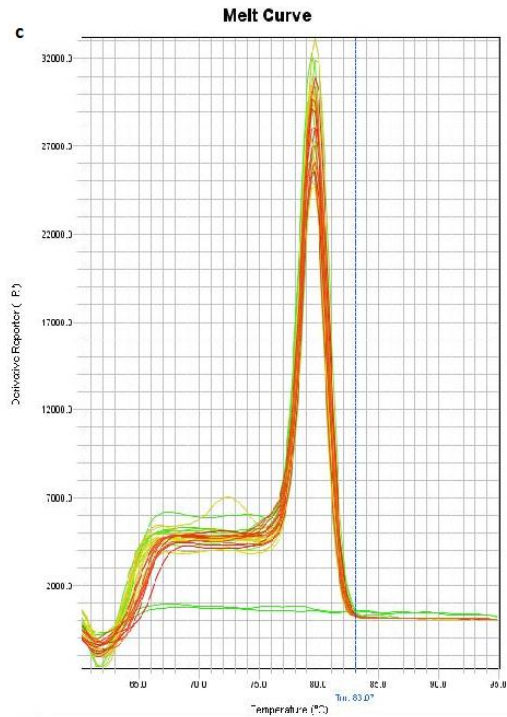
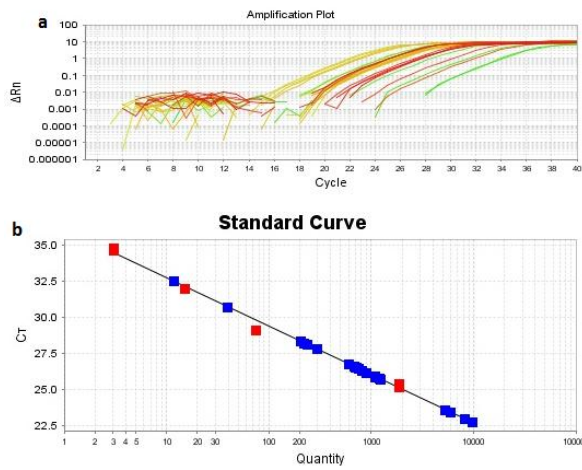
**Figura 1.** Gráficos representativos da reação de amplificação para os transcritos do gene GAPDH. A: Células da granulosa; B: Células do *cumulus oophorus*. a: Gráfico de amplificação; b: Gráfico da curva-padrão; c: Gráfico da curva de *melting*.



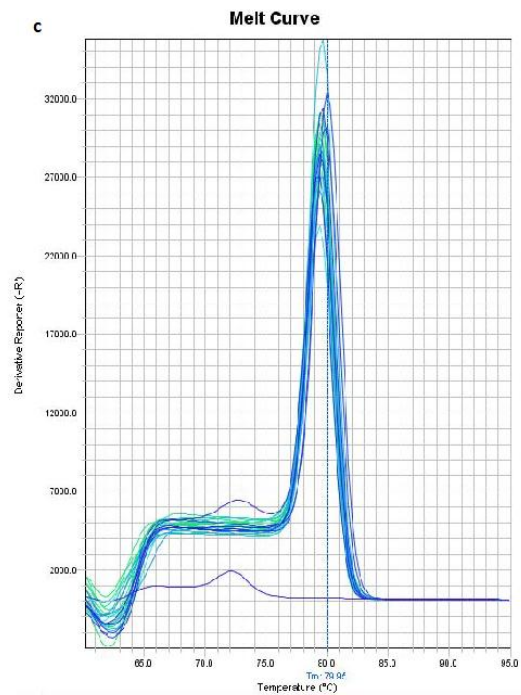
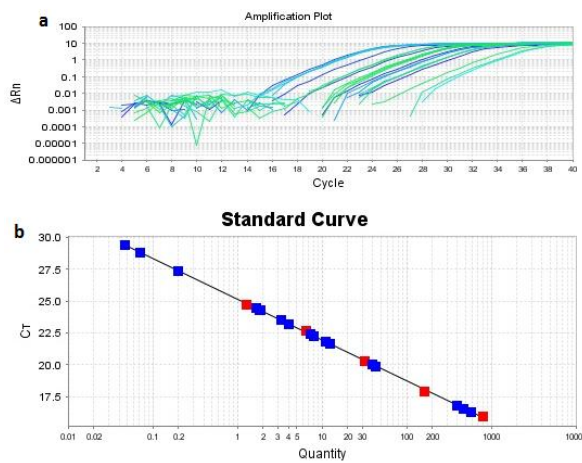
**Figura 2.** Gráficos representativos da reação de amplificação para os transcritos do gene ACTB. A: Células da granulosa; B: Células do *cumulus oophorus*. a: Gráfico de amplificação; b: Gráfico da curva-padrão; c: Gráfico da curva de *melting*.



3) A

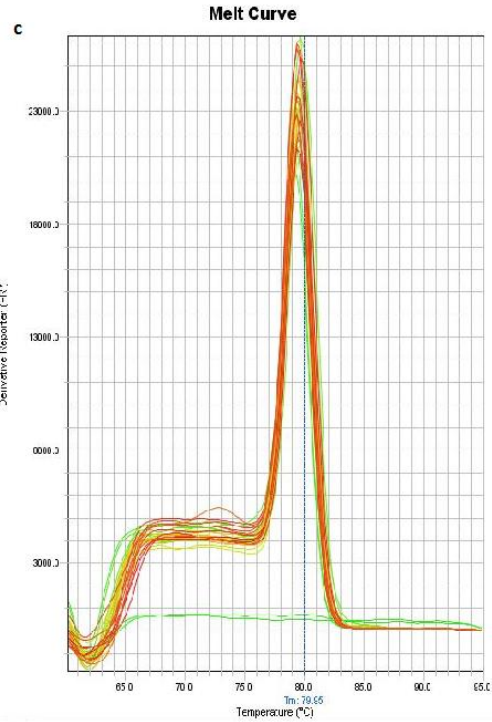
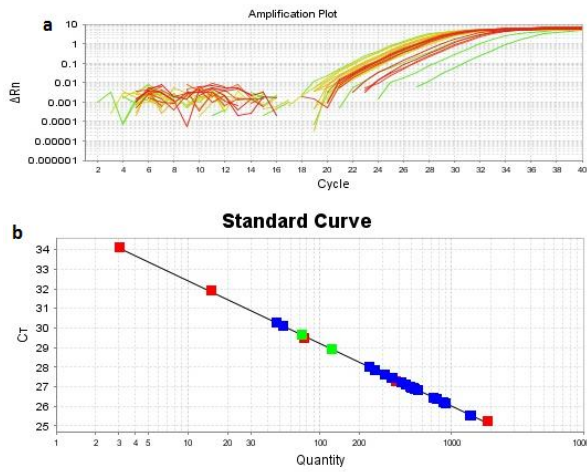


3) B

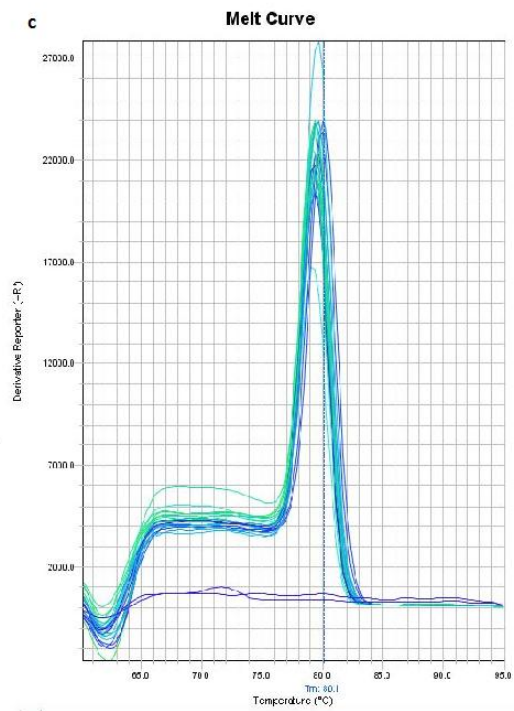
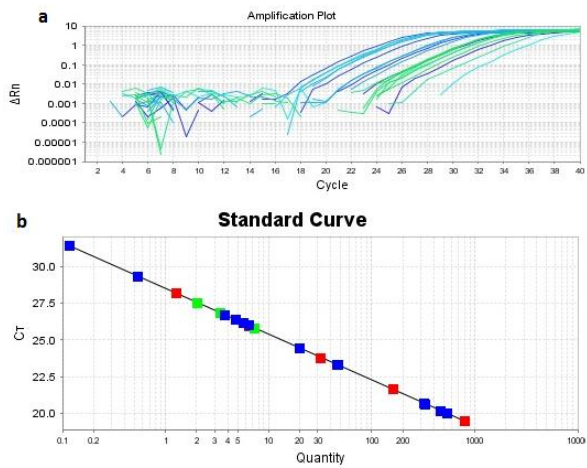


**Figura 3.** Gráficos representativos da reação de amplificação para os transcritos do gene YWHAZ. A: Células da granulosa; B: Células do *cumulus oophorus*. a: Gráfico de amplificação; b: Gráfico da curva-padrão; c: Gráfico da curva de *melting*.

4) A

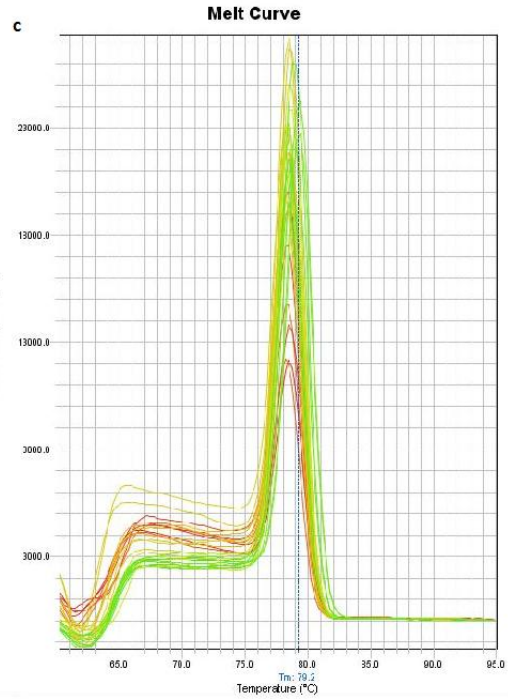
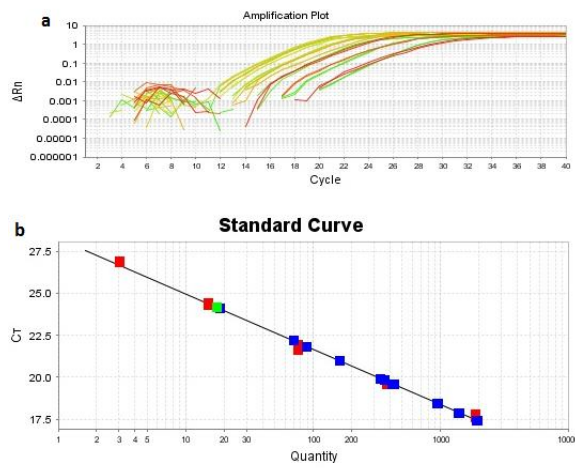


4) B

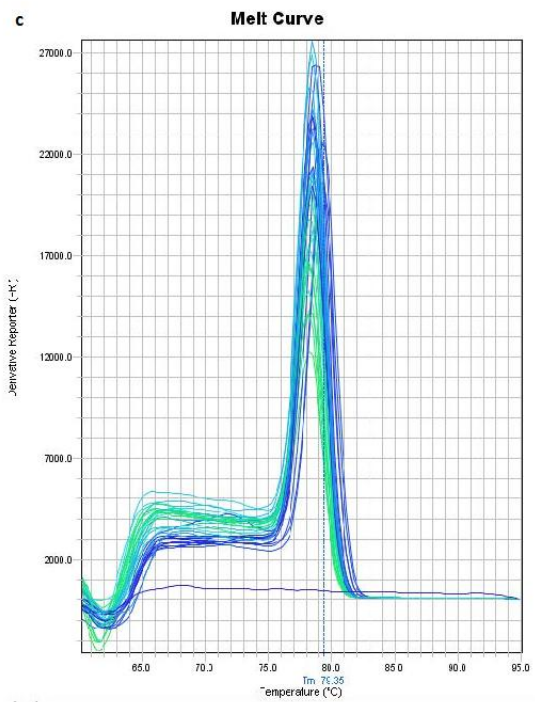
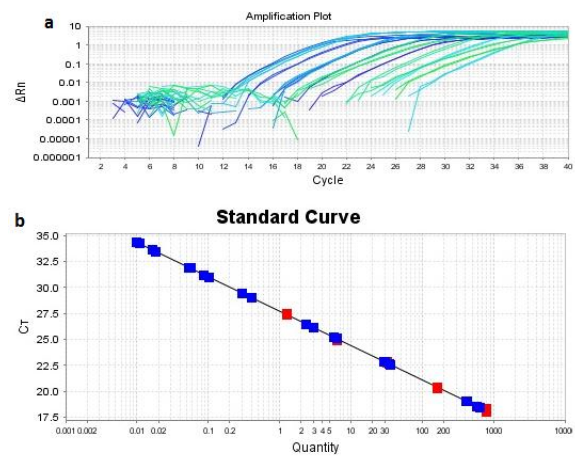


**Figura 4.** Gráficos representativos da reação de amplificação para os transcritos do gene HPRT-1. A: Células da granulosa; B: Células do *cumulus oophorus*. a: Gráfico de amplificação; b: Gráfico da curva-padrão; c: Gráfico da curva de *melting*.

5) A



5) B



**Figura 5.** Gráficos representativos da reação de amplificação para os transcritos do gene B2M. A: Células da granulosa; B: Células do *cumulus oophorus*. a: Gráfico de amplificação; b: Gráfico da curva-padrão; c: Gráfico da curva de *melting*.

## Anexo 2

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

**Projeto:** Influência do corante Azul Cresil Brilhante em modelo de cultura primária de células murais da granulosa e do *cumulus oophorus* luteinizadas.

**Pesquisador responsável:** Prof. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva

**Demais pesquisadores:** Helena von Eye Corleta, Diego Duarte Alcoba, Anita Mylius Pimentel, Ana Paula Kussler, Maiara Conzati, Júlia Schneider.

**Telefones para contato com pesquisadores:** (51) 3359 - 7640 (Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre); (51) 3314 - 3690 (Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Educação em Pesquisa do Hospital Moinhos de Vento); (51) 9326 - 1613 (Pesquisador Diego Duarte Alcoba); (51) 3359 - 7625 (Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular); (51) 3308 - 3559 (Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral).

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 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 a caracterização do modelo de cultura de células que formam o folículo ovariano (estrutura que está ao redor do óvulo) e a avaliação do efeito de um corante (chamado de Azul Cresil Brilhante) sobre essas células (chamadas de células murais da granulosa e células do *cumulus oophorus*). O objetivo do nosso estudo é, primeiramente, comprovar que podemos fazer essas células crescer fora do corpo e, posteriormente, observar se esse corante, que futuramente poderá ter aplicação clínica nas técnicas de Reprodução Assistida, apresenta toxicidade ou não sobre as células que estão próximas ao óvulo, a fim de termos uma ideia do efeito deste corante sobre o próprio óvulo.

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

1/3

Estamos convidando a senhora para fazer parte deste experimento, pois quando a senhora realizar o seu procedimento de Reprodução Assistida, as células que estão junto ao seu óvulo 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. Por isso estamos solicitando permissão para utilizar essas células, as quais seriam desprezadas, em nossa pesquisa. A coleta das células não acarretará alteração nos procedimentos de seu tratamento, pois ela ocorrerá após a técnica de coleta de seu óvulo (após a punção ovariana), no momento em que elas seriam descartadas. 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.

Os resultados deste estudo não trarão benefícios nem prejuízos diretos para a senhora, assim como não há aumento do risco de seu tratamento de Reprodução Assistida devido a sua participação no estudo (os riscos do tratamento são independentes deste estudo), pois não será realizada nenhuma técnica a mais durante o período do tratamento (não haverá nenhuma intervenção adicional). 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 ou com o Comitê de Ética dos Hospitais envolvidos 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:**

\_\_\_\_\_  
Nome (em letra de forma)

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Porto Alegre, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

**Pesquisador:**

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente todos os detalhes relevantes deste estudo ao sujeito mencionado acima.

\_\_\_\_\_  
Nome (em letra de forma)

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Porto Alegre, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_