

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

RICARDO NOVATO PIMENTEL

Identificação e caracterização de substância amiloide em oócitos murinos e humanos e embriões de camundongos

Ribeirão Preto
2019

RICARDO NOVATO PIMENTEL

**Identificação e caracterização de substância amiloide em oócitos murinos
e humanos e embriões de camundongos**

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Ginecologia e
Obstetrícia (opção: Biologia da
Reprodução)

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Paula Andrea de
Albuquerque Salles Navarro

Coorientador: Dr. David Lawrence Keefe

Ribeirão Preto

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Pimentel, Ricardo Novato
Identificação e caracterização de substância amiloide em
oócitos murinos e humanos e embriões de camundongos,
2019.

123 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Ginecologia e
Obstetrícia

Versão Original

Orientador: Navarro, Paula A de Albuquerque Sales.

Coorientador: Keefe, David Lawrence.

1. Amiloide. 2. Qualidade Oocitária. 3. Envelhecimento Reprodutivo.
4. Fertilidade Feminina.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: PIMENTEL, R. N.

Título: Identificação e caracterização de substância amiloide em oócitos murinos e humanos e embriões de camundongos

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências Médicas.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

À minha família, com amor, admiração e gratidão por toda compreensão, carinho, apoio, presença e incansável apoio ao longo do período de elaboração deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Há aproximadamente quatro anos atrás optei por me aventurar no mundo da Reprodução Humana. Longe da família e amigos comecei a me dedicar ao universo da infertilidade e suas situações inusitadas e imprevisíveis. Através do meu espelho vivo, Dr. David Keefe viajei pelo incrível país dos óvulos, passando por beta-HCGs positivos cheios de alegrias e algumas vezes negativos, mas sempre regados por esperança! Aprendi a lidar com os anseios e expectativas das mães, mas nunca deixando de lado o apoio aos futuros pais! E por tudo isso e muito mais, tenho que agradecer imensamente a esta fase da minha vida que se encerra com o doutorado e que, me mostrou minhas dificuldades e limitações, mas, ao mesmo tempo, me ensinou a superá-las. A conclusão dessa jornada não seria possível sem uma série de pessoas que tem seu lugar especial em meu coração por terem me ajudado tanto e me permitido chegar até aqui.

Inicialmente, gostaria de agradecer a equipe do Fertility Center por todo apoio durante o período em que desenvolvi o meu projeto. Ao meu mentor, amigo, conselheiro e meu praticamente pai americano Dr. David Keefe, por em todos os momentos de dúvidas e angústias ter tido sempre um abraço amigo e uma mensagem de incentivo não permitindo nunca que eu desistisse. Um agradecimento especial ao meu querido amigo Leroy Robinson! Sua paciência em me ensinar os procedimentos no laboratório, suas brincadeiras sempre me estimulando a amar a ciência básica! Do mesmo laboratório, estendo meus agradecimentos à amiga do coração Hellen (Fang Wang), sempre dedicada e presente, fazendo de tudo para este projeto acontecer! E ainda aos colegas de laboratório Reza Radjab, Sagi e Michelle.

Durante o processo, pude contar com a ajuda incansável da minha mentora, Dra. Paula Navarro, que além de uma professora incrível, dotada de

uma sabedoria incomparável, é um ser humano singular, com quem aprendi também os valores da vida e que hoje tenho muito orgulho de considerar como amiga do coração.

Aos docentes do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia (especialmente os docentes do Lab GO: Maria Célia, Lúcia Alves, Marcos Felipe, Carolina Sales, Ana Carolina Sá, Rosana Reis, Rui Ferriani) pelo incentivo, conhecimentos e boa convivência.

Aos funcionários do oitavo andar do HC, Suélen (amiga do coração e salvadora da pátria), Ricardo (meu grande amigo e xará) e Suleimy (minha maestra dos números), obrigada por toda ajuda e orientações, sempre com muita atenção e simpatia!

A todos os envolvidos na pós-graduação em Ginecologia e Obstetrícia da FMRP-USP, à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Código de Financiamento 001) e à FAEPA (Fundação de Amparo ao Ensino, Pesquisa e Assistência do HC-FMRP) pelo suporte e incentivo ao aprendizado.

Aos alunos, ex-alunos e coordenadores do grupo de pesquisa da Dr^a. Paula Navarro, Paulinha, Vanessa, Eduardo, Thalita, Fernanda e Michele pelo bom convívio, amizade e generosidade.

Aos meus amigos irmãos que a vida me deu, Thiago Sampaio (Jakó) e Alexandre Caiado (Xandão), que me acompanham há muitos anos, que estavam comigo em todas as alegrias mas também em todas as tristezas e em momento algum me negaram um abraço amigo que me fizesse renascer e continuar caminhando.

Ao meu grande amigo Marroquino/Brasileiro, Yassine Houachem, o meu muito obrigado por quando na ausência da minha família e amigos, vivendo em outro país, você ter sido para mim um verdadeiro irmão, companheiro e amigo até nos momentos de solidão como em nosso Natal do ano de 2015.

As minhas grandes inspirações que me fizeram optar pela área de Ginecologia e Obstetrícia e após, Reprodução Humana, Aldair Novato Silva e Luiz Augusto Batista, muito obrigado por serem para mim meus exemplos de profissionais e seres humanos.

A minha maior inspiração de vida, aquela que na Terra não pode ter o privilégio de conquistar o diploma de medicina, mas que era a minha médica de almas. A você minha mãe, minha rainha, um muito obrigado bem grande por me permitir ser um tanto de ti. Estendendo também a minha gratidão ao meu amado pai, que me deu as condições para que eu pudesse dedicar esses últimos quase 4 anos a este sonho e também aos meus irmãos, pelo incentivo e coragem.

A minha família do coração, que eu ganhei ao ter me casado com o grande amor da minha vida, Mamis, Serjão e Lalá, o meu muito obrigado por vocês terem sido pra mim um porto seguro e uma viga de sustentação nos momentos mais difíceis.

E agora a estrela principal desse sonho, a minha esposa, companheira, grande incentivadora, minha ídola, Lorena Paiva de Ávila Pimentel. A você minha vida ofereço o que eu tenho de melhor no meu coração, porque se hoje felizes celebramos mais esta conquista é porque nas horas de queda, tropeços e tristezas você não permitiu que eu olhasse para baixo e me fez seguir adiante cada vez mais certo de que iríamos conseguir.

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

A dignidade do homem é da altura do bem que ele faz a humanidade.

Emmanuel

RESUMO

PIMENTEL, Ricardo Novato. **Identificação e caracterização de substância amiloide em oócitos murinos e humanos e embriões de camundongos.** Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Introdução: Estudos prévios com leveduras evidenciaram um importante papel de substâncias amiloide (SA) na regulação da gametogênese, questionando seu potencial como marcador da qualidade gamética. Contudo, até o presente momento, nenhum estudo avaliou a presença de SA em óocitos e embriões de mamíferos.

Objetivos: Descrever a presença, caracterizar o padrão de distribuição e comparar os níveis das SA em óocitos maduros e embriões pré-implantação, utilizando modelo murino. Identificar, caracterizar o padrão de distribuição e quantificar SA em óocitos humanos em diferentes estágios de desenvolvimento (VG- vesícula germinativa, MI- metáfase I e MII- metáfase II) e estabelecer a correlação entre os níveis de SA nos óocitos e as características clínicas de pacientes submetidas a estimulação ovariana controlada (EOC) para fertilização *in vitro* (FIV).

Metodologia: Realizou-se um estudo piloto experimental, prospectivo, utilizando 20 óocitos maduros e 200 embriões pré-implantação de camundongos (1 célula, 2 células, 4 células, 8 células e blastocistos) e 46 óocitos humanos imaturos e *in vitro* maturados, doados por 11 pacientes submetidas à EOC para FIV. Óocitos em MII e embriões pré-implantação de camundongos congelados, imediatamente após o descongelamento, foram fixados para imunocoloração para visualização de SA por microscopia confocal e por microscopia imunoeletrônica de transmissão. Óocitos humanos imaturos (VG e MI) e maturados *in vitro* (VG Parado, MI, MI Parado e MII) também foram fixados e imunocorados para avaliação de SA, utilizando o mesmo anticorpo, por microscopia confocal. Para quantificar a imunocoloração de SA, nos óocitos e ao longo do desenvolvimento embrionário inicial, foi utilizado o programa ImageJ.

Resultados: Em todas as amostras (camundongos e humanos), a imunocoloração para SA aparece por toda a zona pelúcida, bem como no citoplasma e no núcleo de óocitos, corpúsculos polares e embriões pré-implantação. Em camundongos, o estágio embrionário de 2 células apresentou níveis mais elevados de SA (69000187,4 DP 6733098,1 a.u.), quando comparado aos outros estágios de desenvolvimento ($p < 0,0001$). A microscopia imunoeletrônica confirmou a presença de SA em óocitos e embriões pré-implantação. Em humanos, óocitos no estágio de VG, frescos, apresentaram níveis mais elevados de substância amiloide (4164.7 DP 1573.5 a.u.), quando comparados a óocitos em MI e MII ($p = 0,008$). Foi encontrada uma associação negativa entre níveis de SA e o índice de massa corporal (IMC) (-0,54; $p = 0,0007$), o número de dias de estimulação ovariana (-0,44; $p = 0,002$), a dose de hMG (-0,44; $p = 0,002$), o tempo entre a captação dos óocitos e a fixação das amostras (-0,33; $p = 0,02$) e o tempo decorrido após o trigger (-0,33; $p = 0,02$). Níveis elevados de SA foram encontrados em óocitos de pacientes que apresentaram valores de hormônio anti-mülleriano (AMH) entre 1 e 3 ng/ml, quando comparados a < 1 ng/ml (4592,7 DP 2126,3 a.u. vs. 737,3 DP 14,7 a.u.; $p = 0,0002$) e > 3 ng/ml (4592,7 DP 2126,2 a.u. vs. 3197,3 DP 895,0 a.u. ; $p = 0,006$).

Conclusões: Nós demonstramos pela primeira vez que as SA estão presentes no citoplasma e núcleo de oócitos murinos e humanos e embriões pré-implantação de camundongos. Também mostramos que as SA se distribuem de forma heterogênea ao longo do processo de maturação de oócitos humanos e do desenvolvimento pré-implantacional de embriões de camundongos. Embriões murinos no estágio de 2 células e oócitos humanos no estágio de VG apresentaram os maiores níveis de SA. Evidenciamos também uma correlação entre os níveis de SA nos oócitos humanos e características clínicas de bom prognóstico em pacientes submetidas a FIV, como por exemplo, baixo IMC e valores normais de AMH. Levando em conta que as SA estão envolvidas em mecanismos fundamentais relacionados a alterações celulares patológicas, bem como no processo de divisão celular, estudos futuros devem investigar o seu possível papel como biomarcador do envelhecimento e/ou da qualidade oocitária.

Palavras-chave: Amiloide. Qualidade Oocitária. Envelhecimento Reprodutivo. Fertilidade Feminina.

ABSTRACT

PIMENTEL, Ricardo Novato. Amyloid like substance in mice and human oocytes and embryos. Thesis (Doctoral Degree in Medical Sciences) – Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil, 2019.

Introduction: Previous studies with budding yeasts evidenced an important role of amyloid substances (AS) in the regulation of gametogenesis, questioning its potential as a marker of gametic quality. However, to date, no study has evaluated the presence of AS in mammalian oocytes and embryos.

Objectives: To describe the presence, to characterize the distribution pattern and to compare AS levels in mature oocytes and preimplantation embryos using murine model. Identify, characterize the distribution pattern and quantify AS in human oocytes at different stages of development (GV- germinal vesicle, MI-metaphase I and MII-metaphase II) and establish the correlation between oocytes AS levels and clinical characteristics of patients undergoing control ovarian stimulation (COE) for in vitro fertilization (IVF).

Methods: An experimental prospective pilot study was carried out using 20 mature oocytes and 200 preimplantation mouse embryos (1-cell, 2-cell, 4-cell, 8-cell and blastocysts) and 46 immature and in vitro mature human oocytes donated from 11 consenting patients submitted to COE for IVF. Frozen MII oocytes and mouse preimplantation embryos, immediately after thawing, were fixed for immunostaining for visualization of AS by confocal microscopy and by transmission electron microscopy. Immature (GV and MI) and *in vitro* mature (GV Arrested, MI, MI Arrested and MII) human oocytes were also fixed and immunostained for AS evaluation, using the same antibody, by confocal microscopy. Fluorescence intensity from immunofluorescent staining and data from confocal microscopy were quantified using ImageJ program.

Results: In all samples (mice and humans), immunostaining for AS appears throughout the zona pellucida, as well as in the cytoplasm and nucleus of oocytes, polar bodies, and preimplantation embryos. In mouse, 2-cell embryos exhibited higher levels of AS (69000187,4 SD 6733098,1 a.u.) when compared to the other stages of development ($p < 0.0001$). Electron microscopy confirmed the presence of AS in mouse oocytes and preimplantation embryos. In humans, fresh GV stage oocytes exhibited higher levels of AS (4164.7 SD 1573.5 a.u.) when compared to MI and MII oocytes ($p = 0.008$). A negative association was found between levels of AS and patient body mass index (BMI) (-0.54; $p = 0.0007$), number of days of control ovarian stimulation (-0.44; $p = 0.002$); (-0.34, $p = 0.002$), dose of gonadotropin used, time between oocyte retrieval and fixation (-0.33; $p = 0.02$) and time after the hCG trigger (-0.33; $p = 0.02$). Significantly higher levels of AS were found in patients with AMH between 1 and 3 ng/ml, compared to < 1 ng/ml (4592.7 SD 2126.3 a.u. vs. 737, 3 SD 14.7 a.u.; $p = 0.0002$) and > 3 ng/ml (4592.7 SD 2126.2 a.u. vs. 3197.3 SD 895.0 a.u.; $p = 0.006$).

Conclusions: We demonstrate for the first time the presence, distribution, and change in AS throughout mouse and human oocyte maturation, and mouse embryonic development. Two-cell mouse embryos and GV human oocytes had the highest levels of AS. We also determine associations between AS in human oocytes with good prognosis clinical characteristics in patients submitted to IVF, such as low BMI and normal AMH values. Considering that AS are involved in fundamental mechanisms related to pathological cell changes, as well as in the

conclusion of cell division process, future studies should investigate their possible role as a biomarker of oocyte aging and/or quality.

Key words: Amyloid. Oocyte Quality. Reproductive Aging. Female Fertility.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Visualização da distribuição de substâncias amiloide por microscopia confocal de oócitos maduros e embriões pré-implantação de camundongo.....**57**

Figura 2: Boxplot mostrando os níveis de substância amiloide por intensidade média do sinal de imunocoloração de acordo com o estágio de fixação de oócitos maduros e embriões pré-implantação de camundongos.....**58**

Figura 3: Distribuição das substâncias amiloide em um embrião de camundongo de 8 células, analisado por microscopia imunoelétrica.....**61**

Figura 4: Visualização da distribuição de substâncias amiloide por microscopia confocal de oócitos humanos imaturos (VG e MI) e maturados *in vitro* (MII), obtidos de ciclos estimulados com gonadotrofinas.....**65**

Figura 5: Boxplot representando os níveis de substância amiloide analisados pela intensidade média do sinal de imunocoloração de acordo com o estágio de maturação nuclear de oócitos humanos imaturos frescos (VG e MI) e maturados *in vitro* (VG Parado, MI, MI Parado e MII), obtidos de ciclos estimulados com gonadotrofinas, analisados por microscopia confocal e processados pelo programa Image J.....**66**

Figura 6: Boxplot representando os níveis de substância amiloide analisados pela intensidade média do sinal de imunocoloração de oócitos humanos avaliados de acordo com: A. Causa da infertilidade, B. Categorias de hormônio anti-Mulleriano (AMH) e C. Tipo de análogo do GnRH utilizado.....**69**

Figura 7. Correlação entre os níveis de substância amiloide, analisados pela intensidade média do sinal de imunocoloração, de oócitos humanos e: A. Índice de massa corporal (IMC), B. Número de dias de estimulação ovariana controlada, C. Dose de hMG utilizada, D. Tempo entre a captação e a fixação dos oócitos, E. Tempo decorrido após o *trigger*.....**71**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação dos níveis de substâncias amiloide (SA) entre oócitos maduros e embriões pré-implantação de camundongos (1 célula, 2 células, 4 células, 8 células e blastocistos) imunocorados para SA e material genético, analisados por microscopia confocal e processados pelo programa ImageJ.....**59**

Tabela 2: Características clínicas das pacientes submetidas à estimulação ovariana controlada para fertilização *in vitro* (n=9) ou criopreservação eletiva de oócitos (n=2) que doaram oócitos imaturos para o estudo.....**63**

Tabela 3: Comparação dos níveis de substâncias amiloide (SA) entre oócitos de humano imaturos (VG e MI) e maturados *in vitro* (VG Parado, MI, MI Parado e MII), imunocorados para SA e material genético, analisados por microscopia confocal e processados pelo programa ImageJ.....**67**

LISTA DE ABREVIATURAS

A.U.	Unidades arbitrárias
AFOC	Anti-amyloid Fibrils OC Antibody
AMH	Hormônio anti-mülleriano
ANOVA	Análise de variância
ASRM	Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva
BLAST	Blastocisto
BS	Blocking Solution
BSA	Bovine sérum albumin
CEL	Célula
CEO	Congelamento eletivo de oócitos
CLB3	Ciclina tipo B
CO	Captação de oócitos
CP	Corpúsculo Polar
DAPI	4',6'-diamino-2-fenil-indol
ddH2O	Água purificada
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DP	Desvio padrão
E2	Estradiol
EOC	Estimulação Ovariana Controlada
ESCA	Esterilidade sem causa aparente
FF	Fluido Folicular
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
FX	Fixação das amostras
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
HC	Hospital das Clínicas
hCG	Gonadotrofina Coriônica Humana
hMG	Gonadotrofina da mulher menopausada
ICSI	Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoide
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IMC	Índice de Massa Corpórea
IRB	Institutional review board

LH	Hormônio luteinizante
MI	Metáfase I
MII	Metáfase II
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
mRNA	Messenger RNA
NYU	New York University
PBS	Phosphate-buffered saline
PVP	Polyvinyl pyrrolidone
RNA	Ácido Ribonucleico
SA	Substâncias amiloides
SAA	Substância amiloide tipo A
SART	National Summary Report of Assisted Reproductive Technology
TRA	Técnicas de reprodução assistida
UI	Unidades internacionais
USP	Universidade de São Paulo
VG	Vesícula Germinativa
ZGA	Ativação do gene zigótico

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	32
2.	OBJETIVOS	38
2.1.	Objetivo Primário.....	38
2.2.	Objetivos Secundários.....	38
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1.	Estudo com modelo murino	41
3.1.1.	Descongelamento de Oócitos e Embriões de Camundongos.....	41
3.1.2.	Imunofluorescência para marcação das substâncias amiloide.....	42
3.1.3.	Análise das imagens obtidas por microscopia confocal.....	43
3.1.4.	Microscopia Imunoeletrônica de Transmissão.....	44
3.1.5.	Morfologia.....	44
3.1.6.	Imunocoloração de substância amiloide para Microscopia Imunoeletrônica.....	45
3.1.7.	Tamanho amostral.....	46
3.1.8.	Análise dos resultados.....	47
3.2.	Estudo com modelo humano	47
3.2.1.	Pacientes.....	48
3.2.2.	Oócitos doados.....	50
3.2.3.	Imunofluorescência para marcação das substâncias amiloide.....	50
3.2.4.	Análise das imagens obtidas por microscopia confocal.....	51
3.2.5.	Tamanho amostral.....	52
3.2.6.	Análise dos resultados.....	53
4.	RESULTADOS	56
4.1.	Oócitos e embriões pré-implantação de camundongos.....	56

4.2.	Oócitos humanos imaturos (VG e MI) e maturados <i>in vitro</i> (VG, MI e MII), obtidos de ciclos estimulados com gonadotrofinas.....	61
5.	DISCUSSÃO.....	74
6.	CONCLUSÕES.....	84
7.	BIBLIOGRAFIA.....	87
8.	APÊNDICES.....	102
8.1.	Fluxograma das Amostras.....	102
9.	MANUSCRITO.....	104

INTRODUÇÃO

1. Introdução

A infertilidade, definida como a incapacidade de conceber após um ano de intercursos sexuais regulares sem uso de qualquer método contraceptivo, vem se tornando uma condição alarmante e hoje atinge cerca de 80 milhões de indivíduos pelo mundo, chegando a uma grave estimativa de 10-15% dos casais em idade reprodutiva (Luke B et al., 2017). Observa-se uma tendência atual de postergar a maternidade e, como a fertilidade feminina diminui significativamente com o avanço da idade da mulher, principalmente após os 35 anos, espera-se um aumento expressivo na prevalência da infertilidade conjugal (Szekeres-Bartho J et al., 2016). Em consequência, a procura por técnicas de reprodução assistida (TRA) tem aumentado, chegando a um acréscimo de 26% nos Estados Unidos entre 2005 e 2014 (Mathews et al., 2016). Segundo o relatório americano nacional sobre TRA, (National Summary Report of Assisted Reproductive Technology - CDC/SART) em 2014, mulheres abaixo de 35 anos representaram apenas 38% do total de pacientes que procuraram por TRA (CDC/SART Summary Report, 2016), enquanto dados compilados pela Rede Latino Americana de Reprodução Assistida (REDLARA), em 2015, apontaram que menos de 31% das pacientes se enquadravam nessa mesma faixa etária (Zegers-Hochschild F et al., 2018). Com o avanço da idade, erros durante o processo de divisão celular, tornam-se mais frequentes e com isso ocorre um aumento nas taxas de infertilidade, aborto e síndromes congênitas (Webster A et al., 2017). Entretanto, apesar dos avanços tecnológicos estarem propiciando um aumento na longevidade e uma melhora na qualidade de vida, parece que estamos presos a um limite biológico, quando falamos de fertilidade feminina e sucesso com o uso de TRA. Segundo as últimas estimativas do CDC/SART, apenas 33% dos ciclos que usam

óvulos e embriões frescos de não-doadora, alcançam gravidez clínica (Mathews et al., 2016).

Oócitos de mamíferos são únicos entre as células germinativas, pois apesar de apresentarem excepcionalmente uma vida longa, envelhecem precocemente. Ao contrário dos homens, que continuam produzindo espermatozoides ao longo da vida, as mulheres interrompem sua oogênese ainda na vida intra-útero, com cerca de vinte semanas de gestação (Pastore LM et al., 2017). Os folículos primordiais, contendo oócitos, que paralisaram sua divisão nuclear no estágio de diplóteno da primeira divisão meiótica, permanecem em estado de dormência metabólica parcial ao longo da vida reprodutiva da mulher (Adhikari D et al., 2010). Já ao nascimento, 75% da reserva folicular da mulher foi perdida por processos de atresia e morte celular programada, sem haver qualquer potencial de regeneração (Zhang K et al., 2015). A depleção folicular acelera na puberdade e continua de forma progressiva até a quase completa escassez quando a mulher atinge a menopausa. Durante a fase reprodutiva da mulher, cerca de 1000 folículos são recrutados mensalmente, mas somente um atinge o estado de dominância, culminando com o fenômeno ovulatório e todo o restante é perdido por atresia (Sun X et al., 2015).

Além de uma perda progressiva da reserva ovariana, as mulheres experimentam uma diminuição da fertilidade com a idade, com uma queda mais expressiva após os 35 anos (ASRM, 2017). O oócito deve ser considerado o maior culpado no envelhecimento reprodutivo, uma vez que conseguimos anular os efeitos do envelhecimento sobre a fertilidade em ciclos de doação, onde mulheres jovens doam oócitos para mulheres mais velhas. Quando mulheres mais velhas utilizam seus próprios oócitos em tratamentos de reprodução assistida, os resultados refletem efeitos profundos do envelhecimento (Hornstein MD et al., 2016). Esse declínio

acentuado da fertilidade com a idade feminina, resulta da diminuição da qualidade oocitária, que é a principal determinante da qualidade embrionária e das taxas de implantação (Takahashi T et al., 2013 ; Broekmans FJ et al., 2006). Marcadores de competência ou qualidade oocitária são importantes e necessários no momento de tomar decisões clínicas decisivas (Hassold T et al., 2001 ; Battaglia DE et al., 1996 ; Keefe DL et al., 1995 ; Polani PE et al., 1991 ; Liu L et al., 2004). Apesar de uma intensa busca no campo científico, os verdadeiros mecanismos celulares e moleculares que impulsionam o envelhecimento oocitário permanecem pouco compreendidos. Por essa razão, a idade materna continua sendo o melhor marcador da competência do desenvolvimento oocitário/embrionário, que é a capacidade de um óvulo ou embrião gerar um nascido vivo (Scheffer JB et al., 2017).

A qualidade ou competência oocitária depende de uma adequada sincronia entre a maturação citoplasmática e nuclear. É sabido que não só fatores nucleares, mas também fatores citoplasmáticos, estão envolvidos na aquisição da competência oocitária (Ferreira EM et al., 2009). Diferentes metodologias têm sido utilizadas visando avaliar a qualidade oocitária (Amanvermez R et al., 2016). Entretanto, até o presente momento, não existe uma metodologia única passível de prever a competência oocitária.

Estruturas pouco estudadas até o momento, mas com grande potencial para se tornarem um marcador da competência oocitária, são as substâncias amiloide (SA). SA estão intimamente envolvidas no processo de envelhecimento de muitas células de vida longa, como os neurônios por exemplo. Amiloides são proteínas alongadas e não ramificadas que geram um padrão de difração característico (difração beta cruzada), quando expostas a raios-X e se agregam entre si, formando de uma maneira altamente ordenada, estruturas fibrilares conhecidas como β -unidades (Shewmaker F

et al., 2011). Uma característica particular dessas proteínas é sua capacidade de replicação e fácil adaptação a diferentes ambientes (Riek R et al., 2016). Desde o seu descobrimento há mais de 150 anos, a maioria das pesquisas, relacionadas às SA ou a proteínas com propriedades semelhantes à amiloide, é voltada ao seu papel negativo importante envolvendo depleção de funções proteicas, interferindo em diversas funções celulares, morte celular programada e indução de processos inflamatórios (Li J et al., 2012 ; Loo Dt et al., 1993 ; Thomas T et al., 1996 ; Akiyama H et al., 2000). Destaca-se, portanto, seu papel contributivo em várias doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, doença de Lou Gehrig, Esclerose Lateral Amiotrófica, Diabetes, Doenças de Prion e Encefalopatia Espongiforme Bovina (Pinzer BR et al., 2012 ; Knowles TP et al., 2014). Curiosamente, além de seu papel patológico, estudos realizados com bactérias e leveduras, sugerem que as SA também possuem papel funcional importante (Fowler DM et al., 2007). Amiloides funcionais, são definidas como amiloides que carregam funções biológicas na ausência de qualquer patologia. Já é bem conhecido na literatura o papel funcional das SA nos melanossomos, formando uma estrutura estável para a síntese de melatonina e na glândula pituitária, onde vários hormônios são armazenados em forma de amiloide até que se convertam em monômeros no momento oportuno para serem secretados (Chapman MR et al., 2002 ; Kwan AH et al., 2006 ; Fowler DM et al., 2006 ; Maji SK et al., 2009).

Um fato interessante é que SA também estão presentes no trato reprodutivo (Guyonnet B et al., 2014). Alguns estudos descreveram sua presença no lúmen do epidídimo de camundongos e também no acrossoma de espermatozoides, sugerindo um importante papel na maturação espermática e principalmente na interação entre espermatozoide e zona pelúcida (Whelly S et al., 2012). A confirmação veio mais

tarde, onde alguns autores utilizando modelo murino, confirmaram que a própria zona pelúcida seria uma amiloide funcional e que o mecanismo de amiloidogênese, seria então um mecanismo conservador importante responsável pela estrutura e função da zona pelúcida (Egge N et al., 2015). Também foi descrito sua interação com os canais de cálcio interferindo na comunicação entre o oócito e suas células foliculares em oócitos de rã (Parodi J et al., 2012).

Em um recente estudo, utilizando leveduras cultivadas como modelo, evidenciou-se que agregações amiloides, amplamente conhecidas por seu estado inativo e tóxico na maioria dos ensaios, na verdade exercem um papel central e determinante no processo de divisão celular para formação dos gametas e consequentemente no processo reprodutivo em geral. Durante a primeira divisão meiótica, uma proteína de ligação de RNA que *in vitro* forma estruturas fibrilares amiloides, Rim4, inibe a transdução da Ciclina tipo B (CLB3) e de inúmeros outros microRNAs, possibilitando a separação adequada dos cromossomos homólogos. Já na segunda divisão meiótica, Rim4, ao ser degradada, permite a correta transdução da CLB3 completando o processo de divisão celular para a formação dos gametas (Berchowitz LE et al., 2015).

Considerando o potencial das SA para se tornarem um futuro marcador da competência e qualidade oocitária e a falta de estudos investigando sua presença e distribuição em oócitos e embriões de mamíferos, propusemos o presente estudo. Acreditamos que, após a identificação e caracterização das SA em oócitos e embriões pré-implantação de mamíferos, haverá motivação para novos estudos investigando o seu mecanismo de ação e papel biológico.

OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1. Objetivo Primário:

Descrever a presença e caracterizar o padrão de distribuição das substâncias amiloide em oócitos maduros e embriões pré-implantação murinos, por meio de microscopia confocal e microscopia imunoeletrônica de transmissão.

Comparar os níveis de substâncias amiloide entre oócitos maduros e embriões pré-implantação murinos avaliados pela quantificação da intensidade de fluorescência analisada por microscopia confocal e processada por meio do programa ImageJ.

2.2. Objetivos Secundários:

Descrever a presença e caracterizar o padrão de distribuição das substâncias amiloide em oócitos humanos imaturos (VG e MI) e maturados *in vitro* (VG Parado, MI, MI Parado e MII), por meio de microscopia confocal.

Comparar os níveis de substâncias amiloide entre oócitos humanos imaturos (VG e MI) e maturados *in vitro* (VG Parado, MI, MI Parado e MII) avaliados pela quantificação da intensidade de fluorescência analisada por microscopia confocal e processada por meio do programa Image J.

Estabelecer a correlação entre os níveis de substância amiloide nos oócitos e características clínicas (idade, peso, altura, índice de massa corporal (IMC), uso de tabaco e derivados, tratamento realizado (FIV ou congelamento eletivo de oócitos),

causa da infertilidade (fator masculino, fator feminino ou esterilidade sem causa aparente [ESCA]), dosagem de hormônio anti-mülleriano (AMH), número de dias de estimulação ovariana, classe e dose das gonadotrofinas utilizadas no tratamento, protocolo de inibição utilizado no tratamento (Antagonista ou Agonista do GnRH), classe e dose da droga utilizada para o trigger, data e hora da captação dos oócitos, data e hora da fixação e tempo entre captação e fixação das amostras) de pacientes submetidas a técnicas de fertilização *in vitro*.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. Materiais e Métodos

3.1. Estudo com modelo murino:

Estudo piloto experimental desenvolvido no laboratório de pesquisa do Dr. David L. Keefe, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, *New York University, New York, NY*.

O estudo não necessitou de aprovação junto à Comissão de Ética em Experimentação Animal da New York University, uma vez que os oócitos e embriões murinos utilizados foram comprados congelados da Embryotech Laboratories, (Inc., Wilmington, MA).

Optamos pelo uso de camundongos como modelo experimental, em virtude da similaridade na morfologia ovariana de humano e camundongo, por ambas as espécies serem monovulatórias e policíclicas e por serem um material abundante, de baixo custo e de fácil manipulação (Brigid H et al., 1986).

3.1.1. Descongelamento de Oócitos e Embriões de Camundongos

Oócitos em metáfase II e embriões de camundongos produzidos *in vivo* (1 célula, 2 células, 4 células, 8 células e blastocistos) e congelados (congelamento lento usando protocolo da Embryotech) foram obtidos da Embryotech Laboratories, Inc. (Wilmington, MA). Para o descongelamento oocitário e embrionário, cada cânula foi removida do container contendo nitrogênio líquido e deixada a temperatura ambiente por 2 minutos. Em seguida foram movidos para um container contendo água aquecida

a 37°C por mais 1 minuto. A cânula então foi cortada e os oócitos transferidos para uma placa de Petri contendo meio de cultura M2 (EmbryoMax® M2 Medium (1X), Liquid, with phenol red, Billerica, MA) onde foram lavados em 6 gotas diferentes de 50µL cada. Em sequência, foram transferidos para uma nova gota de 50µL contendo meio de cultura M2 por 15 minutos em temperatura ambiente para finalizar o processo.

3.1.2. Imunofluorescência para marcação das substâncias amiloide

Imediatamente após o descongelamento, os oócitos maduros e embriões (1 célula, 2 células, 4 células, 8 células e blastocistos) após a remoção da zona pelúcida (para melhor qualidade da imagem), foram lavados duas vezes em uma placa de Petri com PBS contendo 0,1% de polyvinyl pyrrolidone (PBS-PVP), e fixados na mesma placa em uma solução recém preparada de paraformaldeído a 3,7%, por 15 minutos, em temperatura ambiente. A seguir foram lavados brevemente em solução de bloqueio (Blocking Solution [BS], 5% goat serum e 1% bovine serum albumin [BSA]) e depois transferidos para a solução de permeabilização, contendo 1µL de Triton X-100 e 1000µL de BS, por 30 minutos em uma placa de 4 poços (4 wells plate). Em sequência, foram lavados em BS, em 3 diferentes gotas, 15 minutos em cada, a temperatura ambiente e depois transferidos para uma nova solução de BS por 10 horas. As amostras foram incubadas na solução contendo os anticorpos primários (1000µL de BS com 1µL de Anti-amyloid Fibrils OC Antibody [AFOC] e 5µL de γ H2AZ; Millipore), por mais 10 horas. Em sequência, novamente foram lavadas em BS, em 3 diferentes gotas, 15 minutos em cada, a temperatura ambiente e depois incubadas na solução contendo os anticorpos secundários (500µL de BS com 1µL de Texas Red

Goat Anti-Rabbit IgG Antibody e 1 μ L de Fluorescein [FITC]- AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG) por 1 hora, coberto com papel alumínio. Novamente foram lavadas em BS, em 3 diferentes gotas, 15 minutos em cada a temperatura ambiente e por último, lavadas em solução de PBS-PVP. Em seguida foram montadas, utilizando meio de montagem Vectashield com 0,5 μ g mL⁻¹ DAPI (H-1000, Vector, Burlingame, CA, EUA) sobre uma lâmina de vidro coberta por uma lamínula.

3.1.3. Análise das imagens obtidas por microscopia confocal

As imagens foram capturadas utilizando o microscópio confocal (Zeiss 880 laser scanning) utilizando aumento óptico de 63X (63X Plan-Apochromat N.A. 1.4 lens), equipado com epi-fluorescência, AXIOCAM e AXIOVISION 4.0 software. Séries Z foram coletadas de cada amostra e posteriormente analisadas utilizando uma projeção média de pixels com ajuste de contraste linear para avaliar a morfologia e distribuição das substâncias amiloide em cada oócito ou embrião.

Um segundo microscópio (Zeiss AxioObserver) com blocos de filtro de passagem estreita para fluorescência e AxioCam 503 cooled CCD de 14 bits, foi utilizado com o aumento de 20X (20X Plan-Apochromat N.A. 0.8), para capturar uma imagem de cada amostra com constantes níveis de iluminação, exposição e mesma configuração de ganho da imagem. Essas imagens lineares foram processadas por meio do programa ImageJ, em que cada amostra, após a demarcação manual de seus limites, teve sua intensidade aferida. O segundo plano (background) de cada amostra foi subtraído em uma linear constante. A intensidade fluorescente (média e integrada) do sinal amiloide foi expressa em unidades arbitrárias (a.u.). A escolha da unidade se

deve ao fato de que a intensidade do sinal é relativa apenas para determinado conjunto de imagens por sessão, portanto todas as amostras devem ser coradas e fotografadas sob condições exatas previamente padronizadas. Os valores foram transportados para uma planilha no Excel e os gráficos foram feitos por meio do programa GraphPad Prism 5.0.

3.1.4. Microscopia Imunoeletrônica de Transmissão

3.1.5. Morfologia

Imediatamente após o descongelamento, os oócitos (MII) e embriões (1 célula, 2 células, 4 células, 8 células e blastocistos) após a remoção da zona pelúcida (para melhor qualidade da imagem), foram lavados duas vezes em uma placa de Petri com PBS contendo 0.1% de polyvinyl pyrrolidone (PBS-PVP), e fixados na mesma placa em uma solução recém preparada de glutaraldeído 2,5%, por 1 hora, em temperatura ambiente e depois movidos para temperatura de 4°C. A seguir foram lavados brevemente em 0,1M PB (ph:7.2), três vezes de 10 minutos cada. Foram fixados em 1% de OsO4 contendo 0,1M PB por 1 hora e meia. Novamente lavados com ddH2O três vezes de 10 minutos cada e depois transportados para a solução de bloqueio contendo 1% de UA diluído em água por 1 hora, a temperatura ambiente. Em seguida foram desidratados utilizando etanol nas seguintes concentrações (30%, 50%, 70%, 85%, 95% e 100%), 5 minutos em cada, após etanol a 100%, 2 vezes de 5 minutos, propileno oxidado a 100%, 1 vez de 5 minutos, PO: EMBED812 a 100% na concentração de 1:1, por 1-3 horas e logo após deixados durante a noite na

concentração de 1:2. Foram transportados para uma solução contendo EMBED812 com BDMA, por 1-3 horas em temperatura ambiente e por fim em solução contendo EMBED 812, onde então foram polimerizados em forno com temperatura de 60°C por 48 horas.

3.1.6. Imunocoloração de substância amiloide para Microscopia Imunoeletrônica

Imediatamente após o descongelamento, os oócitos (MII) e embriões (1 célula, 2 células, 4 células, 8 células e blastocistos) após a remoção da zona pelúcida (para melhor qualidade da imagem) foram lavados duas vezes em uma placa de Petri com PBS contendo 0,1% de polyvinyl pyrrolidone (PBS-PVP) e fixados na mesma placa em uma solução recém preparada de paraformaldeído a 3,7%, por 15 minutos, em temperatura ambiente. A seguir foram lavados brevemente em solução de bloqueio (Blocking Solution-BS, 5% goat serum e 1% bovine serum albumin-BSA) e depois transferidos para a solução de permeabilização, contendo 1µL de Triton X-100 e 1000µL de BS, por 30 minutos em uma placa de 4 poços (4 wells plate). Em sequência, foram lavados em BS, em 3 diferentes gotas, 15 minutos em cada, a temperatura ambiente e depois transferidos para uma nova solução de BS por 10 horas. As amostras foram incubadas na solução contendo os anticorpos primários (1000µL de BS com 1µL de Anti-amyloid Fibrils OC Antibody [AFOC]; Millipore), por mais 10 horas. Em seguida foram lavadas em solução de bloqueio 6 vezes, 30 minutos cada e incubadas em solução contendo o anticorpo secundário (Nanogold-labeled Fab"anto-rabbit, 1:400) diluído em solução de bloqueio, por 1 hora a temperatura ambiente e após movidas para 4°C durante a noite. Foram lavadas novamente em solução de

bloqueio, 6 vezes, 30 minutos em cada, e logo após em solução de PBS, 2 vezes, 10 minutos em cada. Foram fixadas em solução com glutaraldeído a 2% diluído em PBS por 2 horas, e por fim lavadas com PBS, 3 vezes de 10 minutos e água purificada, 6 vezes, 5 minutos cada.

Após, foi realizado o procedimento de reforço de solução de prata (Nanogold), que consiste em lavar as amostras em uma solução buffer de citrato de sódio a 0,02M, com ph de 7,0, 3 vezes de 5 minutos. O reforço em prata foi realizado utilizando o quite (HQ Silver enchancement kit, Nanoprobes, NY). Após o reforço em prata foram lavadas em água deionizada, 4 vezes de 10 minutos e processadas para microscopia imunoeletrônica somente as amostras em boas condições. O processo de desidratação das amostras seguiu o mesmo padrão da preparação para morfologia. Após serem preparadas e desidratadas em etanol, as amostras foram submetidas a cortes de 70nm, montadas em grelha de cobre com orifícios revestidos por *formver* e coradas com acetato de uranilo e citrato de chumbo. Para a captação de imagens utilizamos o microscópio para microscopia imunoeletrônica Philips CM-12 (FEI; Eindhoven, The Netherlands), equipado com a câmera digital Gatan 4K x 2.7K (Gatan, Inc., Pleasanton).

3.1.7. Tamanho amostral

Como trata-se do primeiro estudo investigando a presença e distribuição de substâncias amiloide em oócitos e embriões de mamíferos, propusemos a realização de um estudo piloto, onde inicialmente, foi realizada uma análise descritiva dos achados e em seguida padronizada a metodologia de avaliação das referidas

substâncias por microscopia confocal e microscopia imunoeletrônica de transmissão. Um tamanho amostral de 20 a 50 oócitos e embriões em cada estágio de desenvolvimento foi considerado adequado para estudos-piloto (Lancaster GA et al., 2004 ; Julious SA et al., 2005 ; Sim J et al., 2012), permitindo estimar o desvio padrão para o cálculo do tamanho da amostra em estudos posteriores. Desta forma, propusemos analisar 20 oócitos e embriões em cada estágio de desenvolvimento.

3.1.8. Análise dos resultados

Inicialmente, foi realizada uma análise descritiva dos achados (presença e distribuição/localização das SA) nos oócitos e nos embriões (1 célula, 2 células, 4 células, 8 células e blastocistos) de camundongos. Após padronizada a metodologia de avaliação das referidas substâncias por microscopia confocal e microscopia imunoeletrônica de transmissão, realizamos as análises quantitativas comparativas das imagens. Uma análise exploratória da intensidade média do sinal foi conduzida por meio de medidas de posição central e dispersão e gráficos box plot. A comparação entre os grupos (oócitos, embriões de 1 célula, 2 células, 4 células, 8 células e blastocistos) em relação a variável dependente (intensidade média do sinal amiloide) foi realizada por meio de ANOVA seguida do pós-teste de LeastSquare-MEANS.

As análises foram realizadas no programa SAS versão 9.4 (SAS Institute), considerando-se um nível de significância de 5%.

3.2. Estudo com modelo humano:

Realizou-se um estudo piloto experimental, desenvolvido no Centro de Reprodução Humana, *Langone Medical Center* e no laboratório de pesquisa do Dr. David L. Keefe, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, *New York University, New York, NY*, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Nova Iorque (*University Committee on Activities Involving Human Subjects – UCAIHS*), através do protocolo H6902.

3.2.1. Pacientes

As pacientes submetidas a estimulação ovariana controlada (EOC) para a realização de injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) por fator masculino severo ou EOC para criopreservação eletiva de oócitos (CEO), onde também foi realizado ICSI, no período de 20 de abril a 24 de Julho de 2017, foram convidadas para participar do estudo, doando seus oócitos imaturos (VG e MI), que não são utilizados de rotina nos procedimentos de reprodução assistida. Dois colaboradores vinculados ao presente laboratório de pesquisa (Fang Wang e Leroy Robinson) nos auxiliaram na coleta dos oócitos doados para pesquisa.

As pacientes foram submetidas a estimulação ovariana controlada utilizando antagonista ou agonista do GnRH para impedir o pico prematuro do hormônio luteinizante (LH), associado a gonadotrofinas exógenas (FSH recombinante ou gonadotrofina de mulher menopausada (hMG)), sob monitorização ecográfica do desenvolvimento folicular. Ao atingir o tamanho folicular médio de aproximadamente 17mm, a maturação final oocitária foi precipitada pela injeção intramuscular de gonadotrofina coriônica humana (hCG) recombinante na dose de 250 µg. A captação dos oócitos por meio da aspiração folicular, guiada por ultrassonografia transvaginal,

foi realizada 36 horas após a administração do hCG. Oócitos imaturos que não foram utilizados para o prosseguimento do tratamento das pacientes, foram doados para a pesquisa após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

Características clínicas das pacientes como, idade, peso, altura, índice de massa corporal (IMC), uso de tabaco e derivados, tratamento realizado (FIV ou congelamento eletivo de oócitos), causa da infertilidade (fator masculino, fator feminino ou esterilidade sem causa aparente [ESCA]), dosagem de hormônio anti-mülleriano (AMH), número de dias de estimulação ovariana, classe e dose das gonadotrofinas utilizadas no tratamento, protocolo de inibição utilizado no tratamento (Antagonista ou Agonista do GnRH), classe e dose da droga utilizada para o trigger, data e hora da captação dos oócitos, data e hora da fixação e tempo entre captação e fixação das amostras, foram coletadas e comparadas, através de testes estatísticos adequados, com níveis de substância amiloide detectados nos oócitos. A confidencialidade do registro e privacidade das pacientes foram mantidas.

Em relação a variável idade (anos), optamos por categorizar as pacientes em < 35 anos e ≥ 35 anos. Segundo dados atuais a idade materna de 35 anos é um ponto de corte aceitável, já que pacientes com 35 anos ou mais, apresentam menores taxas de gravidez clínica e nascidos vivos, e, um aumento progressivo das taxas de aborto e aneuploidia (ESHRE, 2017).

Outro dado importante que foi levado em consideração foi o índice de massa corporal. Sabendo que a obesidade materna e até mesmo o sobrepeso estão associados à várias sequelas reprodutivas, incluindo anovulação, subfertilidade e infertilidade, aumento do risco de aborto espontâneo e resultados obstétricos desfavoráveis tanto maternos como neonatais, optamos por categorizar nossas pacientes em $< 25 \text{ kg/m}^2$ e $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ (Talmor A et al., 2015).

As dosagens de AMH foram obtidas pela mesma metodologia (Quest Diagnostics Tests - CPT 82397) em laboratórios clínicos diversos. Em relação a dosagem de AMH, escolhemos como ponto de corte o valor de 1,06 ng/ml, porque segundo a literatura atual, valores inferiores a este estão relacionados com resultados piores de resposta à estimulação ovariana, número de oócitos captados e taxa de nascidos vivos (Gleicher et al., 2010).

3.2.2. Oócitos doados

Os oócitos doados nos estágios de VG e MI foram obtidos após o desnudamento oocitário (realizado cerca de 2 a 5 horas após a captação oocitária), sendo que os primeiros 10 a 15 oócitos foram fixados imediatamente a seguir e o restante submetidos a maturação *in vitro* (MIV). Os oócitos em VG foram reavaliados, quanto ao grau de maturidade nuclear, após 24 horas de MIV e fixados em estágio de VG Parado ou MI. Adotamos a terminologia “VG Parado” para os oócitos em VG que não progrediram em seu desenvolvimento após 24 horas de MIV. Os oócitos em MI foram reavaliados, quanto ao grau de maturidade nuclear, após 24 horas de MIV e fixados em estágio de MI Parado ou MII. Adotamos a terminologia “MI Parado” para os oócitos em MI que não progrediram em seu desenvolvimento após 24 horas de MIV. Desta forma, as amostras foram fixadas em um intervalo que variou, aproximadamente, entre 3 e 27 horas após a captação.

3.2.3. Imunofluorescência para marcação das substâncias amiloide

Obedecendo os estágios e tempos de fixação de cada grupo pré-estabelecido,

os oócitos (VG, VG Parado, MI, MI Parado e MII) com zona pelúcida intacta foram lavados duas vezes em uma placa de Petri com PBS contendo 0,1% de polyvinyl pyrrolidone (PBS-PVP) e fixados na mesma placa em uma solução recém preparada de paraformaldeído a 3,7%, por 15 minutos, em temperatura ambiente. A seguir foram lavados brevemente em solução de bloqueio (Blocking Solution-BS, 5% goat serum e 1% bovine serum albumin-BSA) e depois transferidos para a solução de permeabilização, contendo 1 μ L de Triton X-100 e 1000 μ L de BS, por 30 minutos em uma placa de 4 poços (4 wells plate). Em sequência, foram lavados em BS, em 3 diferentes gotas, 15 minutos em cada, a temperatura ambiente e depois transferidos para uma nova solução de BS por 10 horas. As amostras foram incubadas na solução contendo os anticorpos primários (1000 μ L de BS com 1 μ L de Anti-amyloid Fibrils OC Antibody [AFOC] e 5 μ L de γ H2AZ; Millipore), por mais 10 horas. Em sequência, novamente foram lavadas em BS, em 3 diferentes gotas, 15 minutos em cada, a temperatura ambiente e depois incubadas na solução contendo os anticorpos secundários (500 μ L de BS com 1 μ L de Texas Red Goat Anti-Rabbit IgG Antibody e 1 μ L de Flourescein [FITC]- AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG) por 1 hora, coberto com papel alumínio. Novamente foram lavadas em BS, em 3 diferentes gotas, 15 minutos em cada a temperatura ambiente e por último, lavadas em solução de PBS-PVP. Em seguida foram montadas, utilizando meio de montagem Vectashield com 0.5 μ g ml⁻¹ DAPI (H-1000, Vector, Burlingame, CA, EUA), sobre uma lâmina de vidro coberta por uma lamínula.

3.2.4. Análise das imagens obtidas por microscopia confocal

As imagens foram capturadas utilizando o microscópio confocal (Zeiss 880 laser scanning) com aumento óptico de 63X (63X Plan-Apochromat N.A. 1.4 lens), equipado com epi-fluorescência, AXIOCAM e AXIOVISION 4.0 software. Séries Z foram coletadas de cada amostra e posteriormente analisadas utilizando uma projeção média de pixels com ajuste de contraste linear para avaliar a morfologia e distribuição das substâncias amiloide em cada oócito.

Um segundo microscópio (Zeiss AxioObserver) com blocos de filtro de passagem estreita para fluorescência e AxioCam 503 cooled CCD de 14 bits, foi utilizado com o aumento de 20X (20X Plan-Apochromat N.A. 0.8) para capturar uma imagem de cada amostra com constantes níveis de iluminação, exposição e mesma configuração de ganho da imagem. Essas imagens lineares foram processadas através do programa ImageJ, onde cada amostra, após terem seus limites manualmente demarcados, tiveram sua intensidade aferida. O segundo plano (background) de cada amostra foi subtraído em uma linear constante. A intensidade fluorescente (média e integrada) do sinal amiloide foi expressa em unidades arbitrárias (a.u.). A escolha da unidade se deve ao fato de que a intensidade do sinal é relativa apenas para determinado conjunto de imagens por sessão, portanto todas as amostras devem ser coradas e fotografadas sob condições exatas previamente padronizadas. Os valores foram transportados para uma planilha no Excel e os gráficos foram feitos através do programa GraphPad Prism 5.0.

3.2.5. Tamanho amostral

Como trata-se do primeiro estudo investigando a presença e distribuição de

substâncias amiloide em oócitos humanos, propusemos a realização de um estudo piloto analisando o total de amostras doadas no período do estudo.

3.2.6. Análise dos resultados

Inicialmente, foi realizada uma análise descritiva dos achados (presença e distribuição/localização das substâncias amiloide) nos oócitos humanos. Após padronizada a metodologia de avaliação das referidas substâncias por microscopia confocal, realizamos as análises quantitativas comparativas das imagens. Uma análise exploratória da intensidade média do sinal amiloide foi conduzida por meio de medidas de posição central e dispersão e gráficos box plot. Uma análise de variância foi utilizada para verificar se a variável dependente (intensidade do sinal amiloide) está relacionada com os estágios de fixação (VG, VG Parado, MI, MI Parado e MII) , a causa de infertilidade (Fator masculino, Fator feminino e Esterilidade sem causa aparente), Dosagem de AMH (<1 ng/ml, 1-3 ng/ml e >3ng/ml) e protocolo de bloqueio (Antagon, Cetrotide e MDL-microdose de Lupron). Foi aplicado o pós-teste de LeastSquare-MEANS quando necessário. O coeficiente de correlação de Pearson foi aplicado para estimar a correlação da variável dependente (intensidade do sinal amiloide) em relação as variáveis quantitativas (idade, IMC, AMH, número de dias de estimulação, dose do hMG, níveis de estradiol no dia do trigger, dose total de gonadotrofina, número de óvulos captados, tempo entre captação e fixação e tempo após o trigger). O teste t de student foi utilizado para verificar se a variável intensidade do sinal amiloide difere em relação ao tipo de ciclo realizado (Fresco vs. Congelado), Tipo de gonadotrofina utilizada (Follist vs. Gonal F), tratamento realizado (FIV vs. CEO), IMC (< 25kg/m² ou ≥ 25kg/m²) e idade (< 35 anos ou ≥ 35 anos).

Para as amostras de oócitos humanos, como o nosso n era pequeno (n=46) e esta etapa do projeto fazia parte dos nossos objetivos secundários, optamos por realizar a análise estatística agrupando todos os estágios de desenvolvimento oocitário (VG, VG Parado, MI, MI Parado e MII) em um grupo único. Isso nos deu a condição de levantarmos algumas hipóteses que poderão ser respondidas e confirmadas em estudos futuros.

As análises foram realizadas no programa SAS versão 9.4, considerando-se um nível de significância de 5%.

RESULTADOS

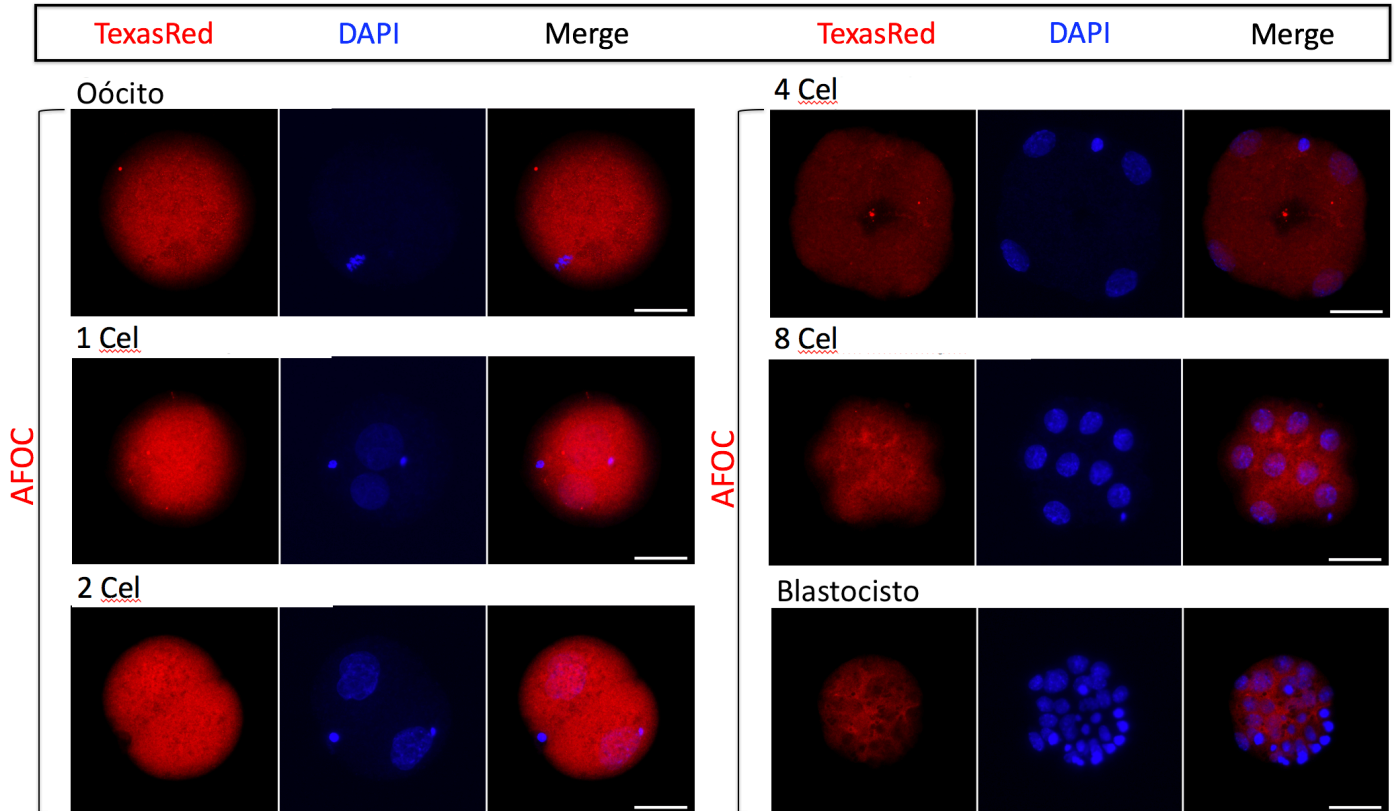
4. Resultados

4.1. Oócitos e embriões pré-implantação de camundongos

Para análise por microscopia confocal, foram fixados 20 oócitos maduros, 20 embriões de 1 célula, 20 de 2 células, 20 de 4 células, 20 de 8 células e 20 blastocistos. Após imunocoloração para as SA, foram analisados 20 oócitos maduros, 20 embriões de 1 célula, 20 de 2 células, 20 de 4 células, 20 de 8 células e 20 blastocistos.

Em todas as amostras, a imunocoloração para SA foi positiva, tanto para zona pelúcida, como para citoplasma e núcleo de oócitos maduros, corpúsculos polares e embriões pré-implantação (Figura 1). Em oócitos, grande quantidade de SA foi encontrada distribuída de forma heterogênea pelo citoplasma. Menor sinal na imunocoloração foi observado nos corpúsculos polares. Nos embriões de 1 e 2 células, a distribuição foi mais homogênea e um sinal mais intenso por imunocoloração foi observado nos núcleos. Nos embriões de 4 células, a intensidade do sinal foi proporcionalmente distribuída entre citoplasma e núcleo. Nos embriões de 8 células, uma clara predominância do sinal para SA foi observada no núcleo, quando comparado ao citoplasma. No estágio de blastocisto, a maior parte do sinal foi observado na massa celular interna, com predominância nos núcleos, enquanto nas células do trofotoderma, a imunocoloração para amiloide foi negativa (Figura 1).

Figura 1. Visualização da distribuição de substâncias amiloide por microscopia confocal de oócitos maduros e embriões pré-implantação de camundongo.

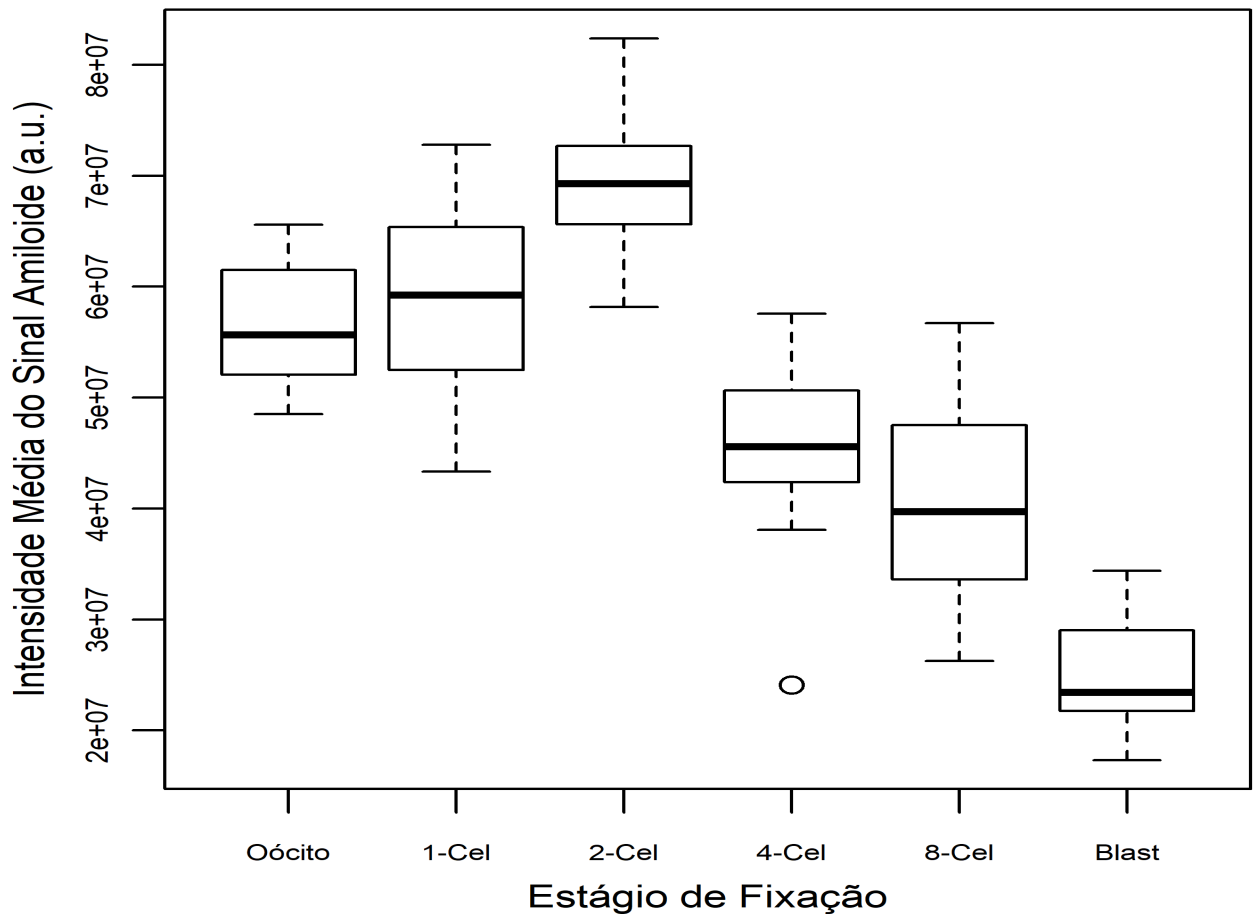


Nota. Em vermelho, marcação das substâncias amiloide pelo anticorpo primário Anti-amyloid Fibrils OC Antibody [AFOC] e anticorpos secundários conjugados com Texas Red e FITC. Em azul, marcação para material genético com Hoechst. Barra branca no canto direito inferior: escala de 5 μ m. Merge = TexasRed + DAPI. Cel: célula.

A análise quantitativa mostrou que embriões de 2 células possuíram os mais altos níveis de SA, caracterizado por um intenso sinal na imunocoloração, com uma intensidade média de 69000187,4 (DP 6733098,1 a.u.). Este estágio foi seguido por oócitos maduros (56232479,7 DP 5362949,4 a.u.) e embriões de 1 célula (58544435,0 DP 7823810,4 a.u.) que também possuem grande quantidade de SA, sem diferenças significativas entre si. A partir do estágio de 4 células (458221432,8 DP 7155402,9

a.u.) observamos um declínio acentuado dos níveis de amiloide em comparação com os estágios anteriores, sendo que o estágio de blastocisto (24423606,2 DP 4882808,4 a.u.) apresentou a menor concentração de SA (Figura 2, Tabela 1).

Figura 2. Boxplot mostrando os níveis de substância amiloide por intensidade média do sinal de imunocoloração de acordo com o estágio de fixação de oócitos maduros e embriões pré-implantação de camundongos.



Nota: A quantificação do sinal marcado pelo anticorpo primário Anti-amyloid Fibrils OC Antibody [AFOC] e anticorpos secundários conjugados com Texas Red e FITC foi estabelecida usando o programa Image J. A intensidade fluorescente média do sinal amiloide foi expressa em unidades arbitrárias (a.u.). Cel: célula; Blast: blastocisto.

TABELA 1. Comparação dos níveis de substâncias amiloide (SA) entre oócitos maduros e embriões pré-implantação de camundongos (1 célula, 2 células, 4 células, 8 células e blastocistos) imunocorados para SA e material genético, analisados por microscopia confocal e processados pelo programa ImageJ.

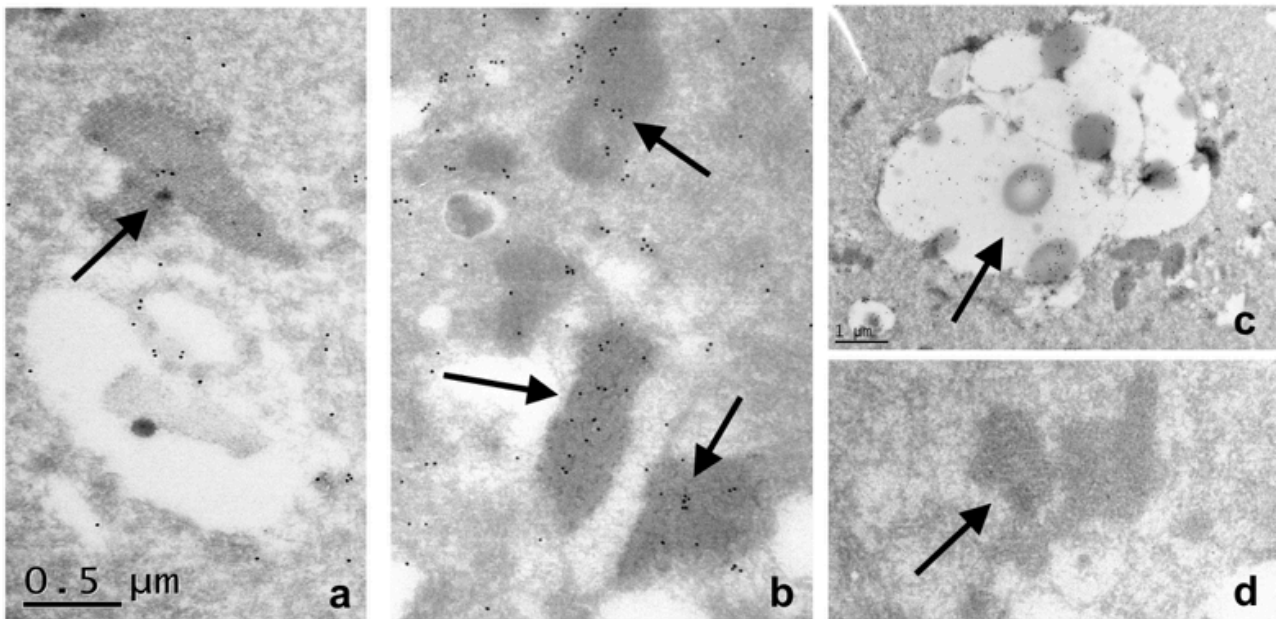
Grupos	Intensidade Média (DP) (a.u.)	Intensidade Média (DP) (a.u.)	p valor *
Oócito vs. Emb 1-Cel	56232479,7 (5362949,4)	58544435,0 (7823810,4)	0,2715
Oócito vs. Emb 2-Cel	56232479,7 (5362949,4)	69000187,4 (6733098,1)	<,0001
Oócito vs. Emb 4-Cel	56232479,7 (5362949,4)	45821432,8 (7155402,9)	<,0001
Oócito vs. Emb 8-Cel	56232479,7 (5362949,4)	40071588,0 (8553533,0)	<,0001
Oócito vs. Blastocisto	56232479,7 (5362949,4)	24423606,2 (4882808,4)	<,0001
Emb 1-Cel vs. Emb 2-Cel	58544435,0 (7823810,4)	69000187,4 (6733098,1)	<,0001
Emb 1-Cel vs. Emb 4-Cel	58544435,0 (7823810,4)	45821432,8 (7155402,9)	<,0001
Emb 1-Cel vs. Emb 8-Cel	58544435,0 (7823810,4)	40071588,0 (8553533,0)	<,0001
Emb 1-Cel vs. Blastocisto	58544435,0 (7823810,4)	24423606,2 (4882808,4)	<,0001
Emb 2-Cel vs. Emb 4-Cel	69000187,4 (6733098,1)	45821432,8 (7155402,9)	<,0001
Emb 2-Cel vs. Emb 8-Cel	69000187,4 (6733098,1)	40071588,0 (8553533,0)	<,0001
Emb 2-Cel vs. Blastocisto	69000187,4 (6733098,1)	24423606,2 (4882808,4)	<,0001
Emb 4-Cel vs. Emb 8-Cel	45821432,8 (7155402,9)	40071588,0 (8553533,0)	0,0067
Emb 4-Cel vs. Blastocisto	45821432,8 (7155402,9)	24423606,2 (4882808,4)	<,0001
Emb 8-Cel vs. Blastocisto	40071588,0 (8553533,0)	24423606,2 (4882808,4)	<,0001

Nota. Os dados são expressos como média (DP: desvio padrão) em cada grupo. Emb: Embrião; Cel: Células; a.u.: unidades arbitrárias; DP: desvio padrão. * Valores de p obtidos por meio do pós-teste de LS-means, quando $p < 0,05$ (ANOVA).

Para análise por microscopia imunoeletrônica foram fixados 20 oócitos maduros, 20 embriões de 1 célula, 20 de 2 células, 20 de 4 células, 20 de 8 células e 20 blastocistos. Após imunocoloração para as SA, foram analisados 20 oócitos maduros, 20 embriões de 1 célula, 20 de 2 células, 20 de 4 células, 20 de 8 células e 20 blastocistos.

A microscopia imunoeletrônica confirmou a presença das SA em oócitos maduros e embriões pré-implantação de camundongos, bem como sua distribuição heterogênea de acordo com o estágio embrionário (Figura 3). Foram identificados filamentos e agrupamentos característicos das proteínas com propriedades amiloides em todos os estágios de desenvolvimento (oócitos maduros, embriões 1 célula, 2 células, 4 células, 8 células e blastocisto). Um interessante achado, encontrado nos embriões no estágio de 8 células, foi a presença de SA no interior dos autofagossomos, estrutura responsável pela eliminação de proteínas anormais e organelas danificadas que são consideradas como não utilizáveis pelo organismo celular (Figura 3c). Amostras pertencentes aos grupos controle (n=10 em diferentes estágios de desenvolvimento embrionário), onde o primeiro anticorpo (AFOC anti-amiloide) não foi utilizado, foram todas negativas para a imunocoloração de SA.

Figura 3. Distribuição das substâncias amiloide em um embrião de camundongo de 8 células, analisado por microscopia imunoelétrica.



Nota. Partículas de ouro são marcadas em agregados de proteínas semelhante a amiloide (seta em 3a e 3b) e dentro de autofagossomos (3c). Não houve marcação nas amostras em que o anticorpo primário anti-amiloide (AFOC) não foi utilizado (seta em 3d). Uma mesma barra de referência foi utilizada para as imagens 3a, 3b e 3d.

4.2. Oócitos humanos imaturos (VG e MI) e maturados *in vitro* (VG, MI e MII), obtidos de ciclos estimulados com gonadotrofinas

Durante o período do estudo, onze pacientes aceitaram participar. Estas pacientes captaram um total de 206 oócitos, sendo que 46 oócitos imaturos (20 VG e 26 MI) foram doados para o presente estudo (Tabela 2). Das 9 pacientes submetidas a EOC para FIV, em 27,5% a causa da infertilidade foi relacionada a fatores femininos,

58,6% a fatores masculinos e em 13,7% não foi diagnosticado uma causa (ESCA). Duas pacientes foram submetidas a tratamento eletivo de congelamento de oócitos. As características clínicas e da resposta à EOC das pacientes foram descritas na Tabela 2. As mulheres apresentaram em média 36,7 (DP 3) anos de idade, negaram tabagismo e tinham IMC médio de 24,2 (DP 3,3) kg/m². Em relação a dosagem do AMH, encontramos o valor médio de 4,4 (DP 2,1) ng/mL. O número de dias de estimulação ovariana foi em média de 10,3 (DP 0,9) dias. O valor médio da dosagem de estradiol no dia do trigger foi de 3285,3 (DP 1511,5) ng/dL e a dose total de gonadotrofinas utilizada foi de 2957,6 (DP 1249,0) UI. O tempo entre a captação dos oócitos e a fixação da amostra para análise foi em média de 7 horas para oócitos nos estágios de VG e MI frescos e 27 horas para os estágios de VG e MI Parados. Parte das amostras foi deixada em meio de cultura para evoluir até o estágio de MII. O tempo após o trigger foi em média de 42 horas para os estágios de VG e MI frescos e 63 horas para VG Parado, MI Parado e MII.

Tabela 2. Características clínicas das pacientes submetidas à estimulação ovariana controlada para fertilização *in vitro* (n=9) ou criopreservação eletiva de oócitos (n=2) que doaram oócitos imaturos para o estudo.

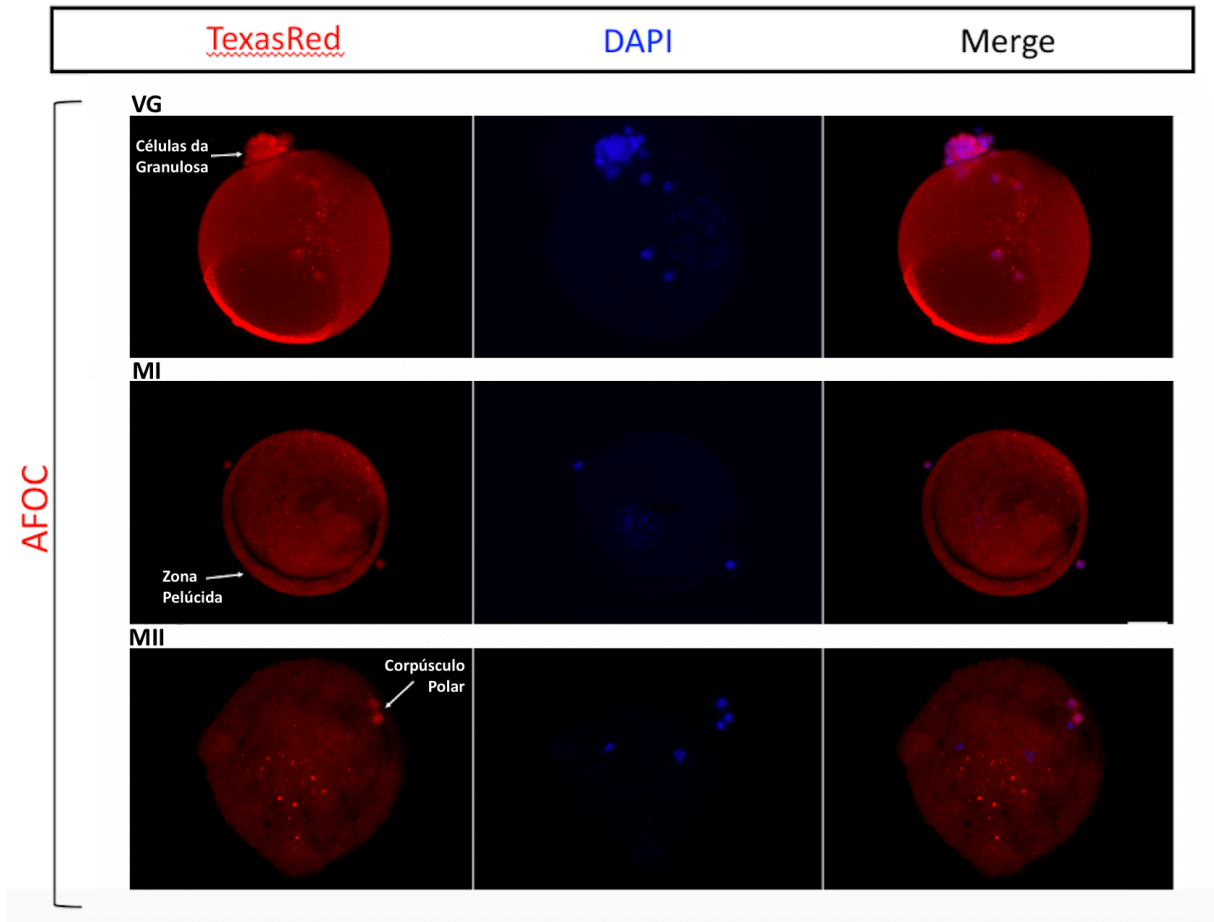
Características	Média	Desvio Padrão	N	(%)
Idade (anos)	36,7	3,0		
IMC (kg/m ²)	24,2	3,3		
AMH (ng/mL)	4,4	2,1		
Causa de Infertilidade				
Fator feminino			5	17,2
Fator Masculino			10	34,6
ESCA			14	48,2
Tratamento realizado				
FIV			29	63,0
CEO			17	37,0
Tipo de Ciclo				
Fresco			38	82,6
Congelado			8	17,4
Nº de Dias de EOC	10,3	0,9		
E2 no dia do <i>Trigger</i> (ng/dL)	3285,3	1511,5		
Dose Total de Gonadot. (UI)	2957,6	1249,0		
Análogo do GnRH (nº pacientes)				
Antagon			20	43,4
Cetrotide			23	50,1
MDL			3	6,5
FSH (nº pacientes)				
Follistim			15	32,6
Gonal F			31	67,4
Nº oócitos captados	25,2	12,4		
Tempo entre CO/FX (min)	995,1	649,6		
Tempo após o <i>Trigger</i> (min)	3116,8	1525,3		
Nº Oócitos / Estágio de FX				
VG Fresco			16	34,8
VG Parado			4	8,7
MI Fresco			12	26,1
MI Parado			4	8,7
MII Fresco			10	21,7

Nota. Os dados são expressos como média (DP) ou como porcentagem. IMC: Índice de massa corporal; AMH: Hormônio anti-mülleriano, FIV: Fertilização *in vitro*, CEO: Congelamento eletivo de oócitos, E2: Estradiol, Gonadot.: Gonadotrofina; FSH: Hormônio folículo-estimulante, CO: Captação de oócitos; FX: Fixação de oócitos, ESCA: Esterilidade sem causa aparente, ECO: Estimulação ovariana controlada, MDL: Microdose de Lupron (Agonista do GnRH). N: representa número de oócitos.

Os 46 oócitos fixados foram imunocorados e analisados à microscopia confocal, evidenciando que a imunocoloração para SA foi positiva em toda a extensão da zona pelúcida, bem como no citoplasma e núcleo de oócitos e nos corpúsculos polares. Nos oócitos em estágio de VG, uma grande quantidade de SA foi distribuída de forma heterogênea em todo o citoplasma. Um menor sinal de coloração, porém também com distribuição heterogênea, foi identificado nos oócitos MI e MII (Figura 4).

Todos os grupos controle (ausência do primeiro anticorpo no processo de imunocoloração) (n = 10 amostras entre diferentes estágios) não coraram para nenhuma estrutura.

Figura 4. Visualização da distribuição de substâncias amiloide por microscopia confocal de oócitos humanos imaturos (VG e MI) e maturados *in vitro* (MII), obtidos de ciclos estimulados com gonadotrofinas.

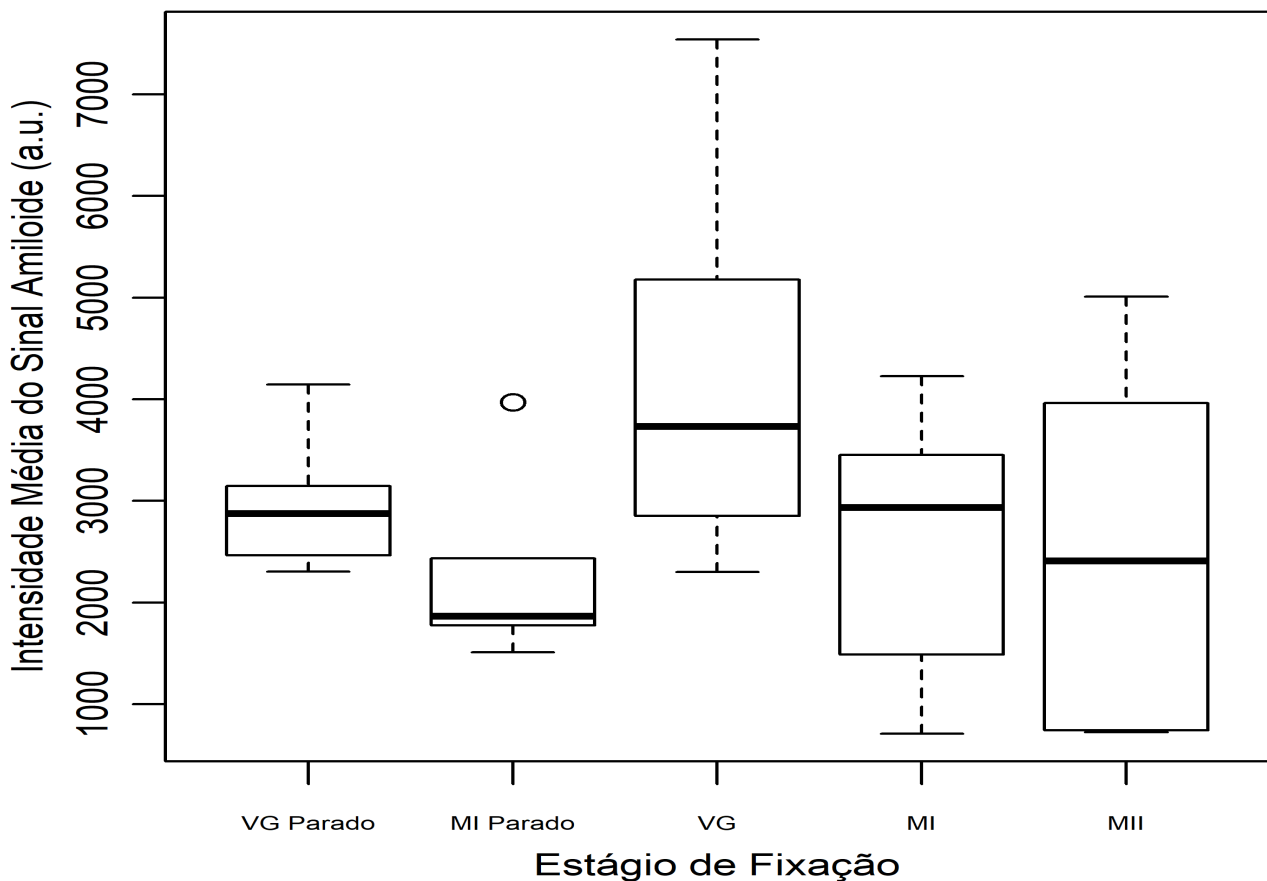


Nota. Em vermelho, marcação das substâncias amiloide pelo anticorpo primário Anti-amyloid Fibrils OC Antibody [AFOC] e anticorpos secundários conjugados com Texas Red e FITC. Em azul, marcação para material genético com Hoechst. Barra branca no canto direito inferior: escala de 5 μm . VG: vesícula germinativa; MI: metáfase I; MII: metáfase II. Seta branca em VG: células da granulosa imunocoradas para substância amiloide pelo anticorpo AFOC. Seta branca em MI: zona pelúcida imunocorada para substância amiloide pelo anticorpo AFOC. Seta branca em MII: dois corpúsculos polares imunocorados para substância amiloide pelo anticorpo AFOC.

A análise quantitativa mostrou que oócitos em estágio de VG frescos possuem os maiores níveis de SA, com uma intensidade média de 4164,7 (DP 1573,5 a.u.). Este estágio foi seguido por VG Parado (2967,7 DP 659,1 a.u.), MI frescos (2601,6

DP 1143,7 a.u.), MII (2495,3 DP 1775,9 a.u.) e MI Parado (2311,8 DP 986,4 a.u.) (Figura 5).

Figura 5. Boxplot representando os níveis de substância amiloide analisados pela intensidade média do sinal de imunocoloração de acordo com o estágio de maturação nuclear de oócitos humanos imaturos frescos (VG e MI) e maturados *in vitro* (VG Parado, MI, MI Parado e MII), obtidos de ciclos estimulados com gonadotrofinas, analisados por microscopia confocal e processados pelo programa Image J.



Nota: A quantificação do sinal marcado pelo anticorpo primário Anti-amyloid Fibrils OC Antibody [AFOC] e anticorpos secundários conjugados com Texas Red e FITC foi estabelecida usando o programa Image J. A intensidade fluorescente média do sinal amiloide foi expressa em unidades arbitrárias (a.u.). VG: Vesícula Germinativa; MI: Metáfase I; MII: Metáfase II.

Usando a análise de variância, houve diferenças na intensidade média do sinal entre VG e MI frescos (4164,7 DP 1573,5 a.u. vs. 2601,6 DP 1143,7 a.u.; $p = 0,008$) e VG e MII frescos (4164,7 DP 1573,5 a.u. vs. 2495,3 DP 1775,9 a.u.; $p = 0,008$). Não houve diferença dos níveis de amiloide entre VG frescos e VG Parados (4164,7 DP 1573,5 a.u. vs. 2967,7 DP 659,1 a.u.; $p = 0,07$) e entre MI frescos e MI Parados (2601,6 DP 1143,7 a.u. vs. 2311,8 DP 986,4 a.u.; $p = 0,71$) (Tabela 3).

TABELA 3. Comparação dos níveis de substâncias amiloide (SA) entre oócitos de humano imaturos (VG e MI) e maturados *in vitro* (VG Parado, MI, MI Parado e MII), imunocorados para SA e material genético, analisados por microscopia confocal e processados pelo programa ImageJ.

Grupos	Intensidade Média (DP) (a.u.)	Intensidade Média (DP) (a.u.)	<i>p</i> valor *
VG vs. VG Parado	4164,7 (1573,5)	2967,7 (659,1)	0,079
VG vs. MI	4164,7 (1573,5)	2601,6 (1143,8)	0,008
VG vs. MI Parado	4164,7 (1573,5)	2311,8 (986,4)	0,012
VG vs. MII	4164,7 (1573,5)	2495,3 (1775,9)	0,008
MI vs. VG Parado	2601,6 (1143,8)	2967,7 (659,1)	0,612
MI vs. MI Parado	2601,6 (1143,8)	2311,8 (986,4)	0,705
MI vs. MII	2601,6 (1143,8)	2495,3 (1775,9)	0,872
MII vs. VG Parado	2495,3 (1775,9)	2967,7 (659,1)	0,532
MII vs. MI Parado	2495,3 (1775,9)	2311,8 (986,4)	0,817

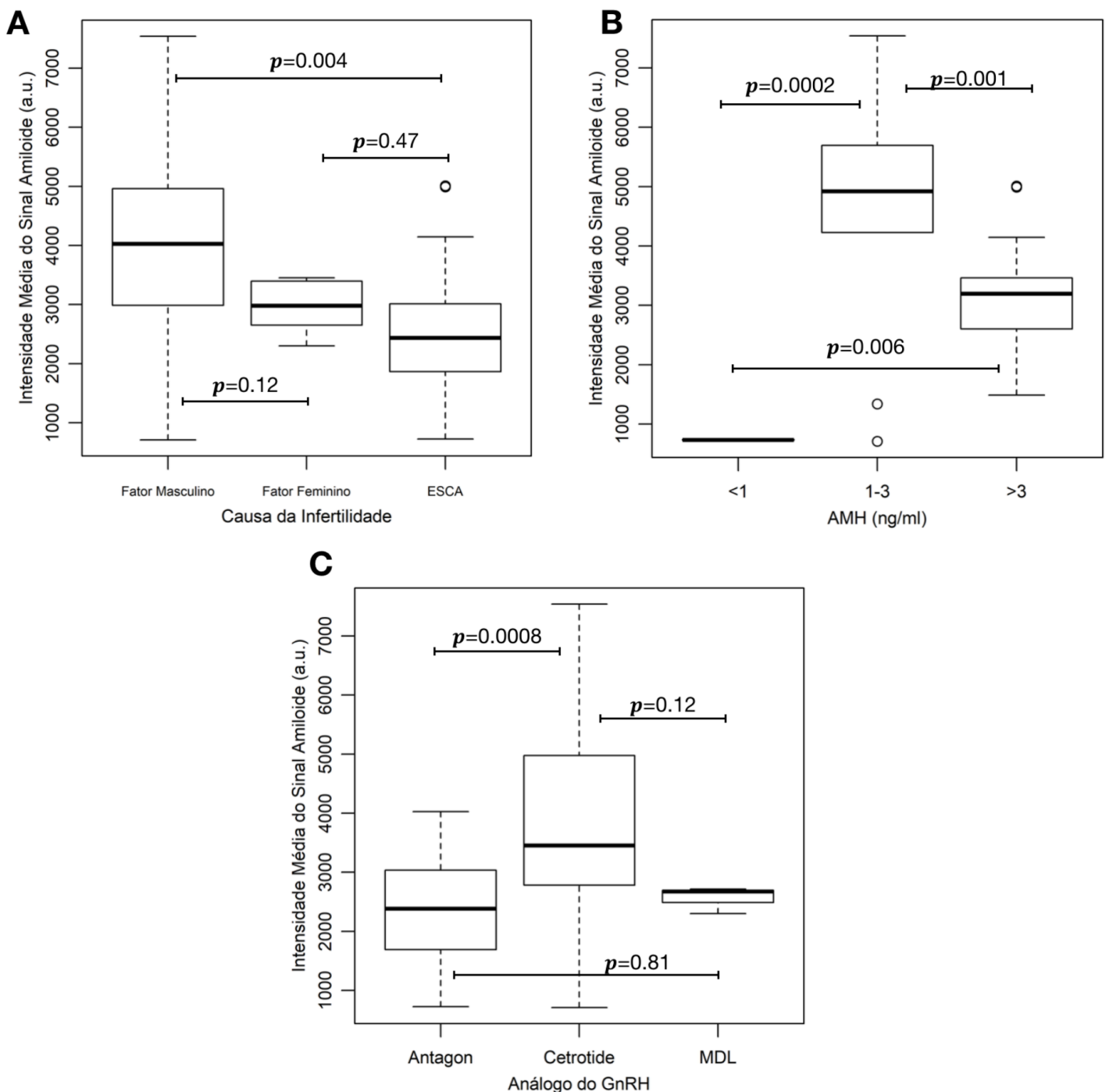
Os dados são expressos como média (DP: desvio padrão) em cada grupo. VG: Vesícula Germinativa, MI: Metáfase I, MII: Metáfase II. * Valores de *p* obtidos através do pós-teste de LS-means (ANOVA).

Para estabelecer a associação entre os níveis de SA nos oócitos e algumas características clínicas das pacientes submetidas à EOC, inicialmente, categorizamos algumas variáveis estudadas. Assim comparamos os níveis de SA de oócitos oriundos de pacientes com idade < 35 anos vs. ≥ 35 anos, IMC < 25 kg/m² vs. ≥ 25 Kg/m² e segundo o tipo de tratamento de fertilidade (FIV vs. CEO), o tipo de gonadotrofina utilizada (Follistim vs. Gonal F) e o tipo de ciclo realizado (Fresco vs. Congelado). Níveis mais altos de SA foram encontrados em pacientes que realizaram ciclos congelados, quando comparados a ciclos a fresco (4178,2 DP 2087,0 a.u vs. 2912,8 DP 1311,3 a.u.; $p = 0,03$) e também em pacientes que usaram Gonal-F, em vez de Follistim (3672,3 DP 1516,4 a.u. vs. 2017,9 DP 758,2 a.u.; $p = <0,001$). Não houve diferença nos níveis de SA quando comparamos pacientes com idade < 35 anos vs. ≥ 35 anos (4026,6 DP 1987,7 a.u. vs. 2998,8 DP 1427,1 a.u.; $p = 0,12$), IMC < 25 kg/m² vs. ≥ 25 Kg/m² (3474,1 DP 1705,3 a.u. vs. 2290,7 DP 1312,1 a.u.; $p = 0,07$) e em pacientes que realizaram ciclos de FIV, quando comparados a ciclos de CEO (3335,6 DP 1736,5 a.u. vs. 2786,9 DP 1032,0 a.u.; $p = 0,18$).

Outras variáveis foram categorizadas em três grupos diferentes e comparadas em relação aos níveis de SA nos oócitos humanos. Foram elas: causa da infertilidade (fator feminino vs. fator masculino vs. ESCA), dosagem de AMH (<1 ng/mL vs. 1-3 ng/mL vs. > 3 ng/mL) e tipo de Análogo do GnRH (Antagon vs. Cetrotide vs. MDL). Níveis mais altos de SA foram encontrados em pacientes submetidas a FIV por fator masculino (3926,35 DP 1861,0 a.u.), quando comparados aos de pacientes com ESCA (2550,47 DP 1222,10 a.u.; $p = 0,004$) e também em pacientes que utilizaram Cetrotide (2368,57 DP 993,40 a.u.) ao invés de Antagon (3871,74 DP 1660,09 a.u.; $p = 0,0008$). Também foram encontradas diferenças entre as categorias de valores de AMH. Maiores níveis de SA foram encontrados em pacientes com AMH entre 1 e 3

ng/mL(4592,65 DP 2126,29 a.u.), quando comparados a < 1 ng/mL (737,33 DP 14,74 a.u.; $p = 0,0002$) e > 3 ng/mL (3197,25 DP 895,02 a.u.; $p = 0,006$) (Figura 6).

Figura 6. Boxplot representando os níveis de substância amiloide analisados pela intensidade média do sinal de imunocoloração de oócitos humanos avaliados de acordo com: A. Causa da infertilidade, B. Categorias de hormônio anti-Mulleriano (AMH) e C. Tipo de análogo do GnRH utilizado.

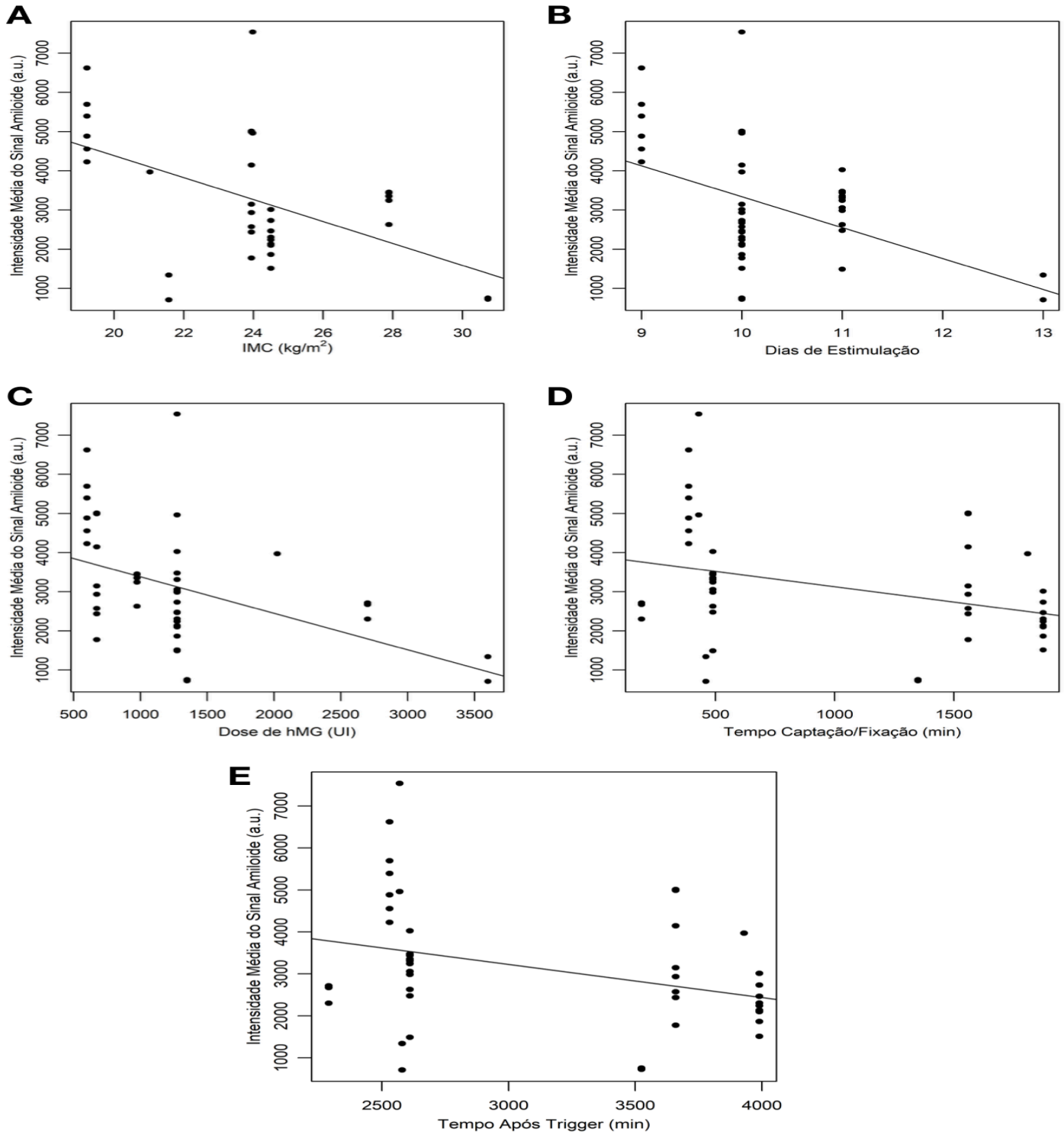


Nota: MDL: microdose de Lupron (Agonista do GnRH); ESCA: Esterilidade sem causa aparente; AMH: hormônio anti-mülleriano. Valores de p obtidos através do pós-teste de LS-means (ANOVA).

Foi observada uma correlação negativa entre níveis de amiloide e o IMC (-0,54; $p = 0,0007$), número de dias de estimulação ovariana (-0,44; $p = 0,002$), dose de hMG (-0,44; $p = 0,002$), tempo entre a captação e fixação dos oócitos (-0,33; $p = 0,02$) e tempo decorrido após o *trigger* (-0,33; $p = 0,02$) (Figura 7). Não houve associação entre níveis de amiloide e idade (0,06; $p = 0,66$), dosagem de AMH (0,001; $p = 0,99$), dose do Análogo de GnRH (-0,27; $p = 0,66$), níveis de estradiol no dia do *trigger* (-0,11; $p = 0,43$), dose total de gonadotrofinas (-0,27; $p = 0,66$) e número de oócitos captados (-0,10; $p = 0,46$).

Todos os grupos controle (ausência do primeiro anticorpo no processo de imunocoloração) ($n = 10$ amostras entre diferentes estágios) não coraram para nenhuma estrutura.

Figura 7. Correlação entre os níveis de substância amiloide, analisados pela intensidade média do sinal de imunocoloração, de oócitos humanos e: A. Índice de massa corporal (IMC), B. Número de dias de estimulação ovariana controlada, C. Dose de hMG utilizada, D. Tempo entre a captação e a fixação dos oócitos, E. Tempo decorrido após o *trigger*.



Nota: IMC: índice de massa corporal; a.u.: unidades arbitrárias; hMG: gonadotrofina da mulher menopausada. A. Correlação linear negativa entre a intensidade média do sinal amiloide e IMC (Coeficientes de Correlação de Pearson - 0,54097; $p = 0,0007$). B. Correlação linear negativa entre a intensidade média do sinal amiloide e dias de estimulação ovariana (Coeficientes de Correlação de Pearson - 0,44136; $p = 0,0021$). C. Correlação linear negativa entre a intensidade média do sinal amiloide e dose de hMG (Coeficientes de Correlação de Pearson - 0,44208; $p = 0,0021$). D. Correlação linear negativa entre a intensidade média do sinal amiloide e tempo entre captação e fixação das amostras (Coeficientes de Correlação de Pearson - 0,33304; $p = 0,0237$). E. Correlação linear negativa entre a intensidade média do sinal amiloide e tempo após o trigger (Coeficientes de Correlação de Pearson - 0,33420; $p = 0,0232$).

DISCUSSÃO

5. Discussão

De forma inédita, demonstramos que as SA, convencionalmente encontradas desempenhando papéis tóxicos e degenerativos, estão presentes em oócitos e embriões de mamíferos em níveis que variam de acordo com o estágio de desenvolvimento embrionário. Mostramos aqui, que além de estarem presentes no núcleo e no citoplasma de oócitos murinos e humanos e em embriões de camundongos, as SA, na análise quantitativa, apresentaram distribuição heterogênea entre os vários estágios do desenvolvimento embrionário, destacando a presença de níveis mais altos nos estágios iniciais, como por exemplo em oócitos humanos maduros e embriões de camundongos nos estágios de 1 e 2 células. Com base nos resultados, especulamos que as SA estão envolvidas nos mecanismos relacionados ao desenvolvimento embrionário inicial. Como já foi citado anteriormente, em leveduras cultivadas, as SA participam, de forma dominante e premeditada, dos processos de maturação oocitária e divisão celular. Levando em conta nossos resultados, onde os níveis de SA foram encontrados em maior quantidade em oócitos humanos no estágio de VG, hipotetizamos que essas substâncias também possam desempenhar um importante papel na maturação de oócitos humanos, participando também aqui, da conclusão da primeira meiose oocitária. Nosso estudo também mostrou que existe uma correlação entre os níveis de SA e características clínicas de bom prognóstico em pacientes submetidas a tratamentos de fertilização *in vitro*, como IMC dentro da normalidade, níveis adequados de AMH e ciclos mais curtos de estimulação ovariana controlada. Levando em consideração os resultados encontrados, será interessante determinar, em estudos subsequentes, se os níveis de SA estão associados às taxas de sucesso dos procedimentos de fertilização *in vitro*.

Recentemente, vários estudos estão sendo conduzidos para entender melhor a complexa composição molecular dos oócitos de mamíferos. Usando perfis de transcrição e proteômica, Yurttas e colaboradores, concluíram que o oócito maduro transcreve e armazena uma quantidade significativa de transcritos que, ao contrário do que se pensava anteriormente, não são utilizadas durante a oogênese, mas sim poupadas para mais tarde regular, de forma essencial, a embriogênese. Esses transcritos são considerados primordiais para que o fenômeno, conhecido como transição oócito-embrionário, transcorra de forma adequada, permitindo assim que uma célula totalmente controlada pelos transcritos maternos adquira o próprio controle (Yurttas P et al., 2010). Curiosamente, oócitos de camundongos com aproximadamente 2,5 semanas de vida, iniciam uma intensa atividade metabólica refletindo um aumento na síntese de mRNAs e proteínas. Esse processo se estende até os estágios embrionários iniciais. No entanto, a maioria dessas estruturas são armazenadas no próprio oócito e de certa forma reservadas para serem utilizadas após a fertilização (Nothias JY et al., 1996). O mecanismo exato de armazenamento dessas moléculas ainda não é completamente compreendido, porém, é comum no nosso organismo algumas moléculas se converterem em uma configuração estrutural amiloide para serem armazenadas de forma mais eficiente, como por exemplo, na tireoide, onde os hormônios peptídicos e proteicos são armazenados em grânulos de secreção na conformação de agregações semelhantes à amiloide (Maji SK et al., 2009). Hipotetizamos que alguns desses mRNAs e proteínas possam ser armazenados, após assumirem uma configuração semelhante a estrutura amiloide, até os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário, particularmente até o estágio de embrião 2 células, onde possivelmente participarão, de forma mais ativa, dessa importante etapa do fenômeno de transição oócito-embrionário. Nossas descobertas

de que os níveis de SA atingem um pico em oócitos maduros e apresentam um aumento progressivo até o estágio de embrião 2 células, são consistentes com o papel de armazenamento desempenhado pelas SA, já demonstrado em diversos órgãos e tecidos.

Uma outra observação interessante é que a distribuição diferente dos níveis de SA entre os vários estágios, nos chama a atenção para uma possível função regulatória durante o desenvolvimento embrionário inicial. Um dos principais marcos da transição oócito-embrionária é a ativação do gene zigótico (ZGA), onde um programa de desenvolvimento embrionário governado por proteínas e transcritos herdados da mãe, é substituído por um novo programa genético comandado pela expressão de novos genes (Schultz RM et al., 2002). Três modificações que ocorrem durante este período são consideradas fundamentais para o desenvolvimento correto do embrião. Primeiro, é necessário que ocorra uma destruição de transcritos oocitários específicos já existentes, provenientes de um controle predominantemente materno. Em seguida, ocorre a substituição de transcritos maternos por transcritos zigóticos, iniciando uma programação absolutamente nova. E finalmente, desenvolve-se uma completa reprogramação da expressão gênica do zigoto, que a partir desse momento adquire o controle do próprio desenvolvimento (Yu J et al., 2001 ; Latham KE et al., 1991). Em camundongos, a transformação mais crítica começa no estágio de embrião 1 célula, onde se inicia o processo de transcrição do pronúcleo masculino (Aoki F et al., 1997). Embora o processo tenha início nesse estágio inicial, a sincronização completa entre transcrição e tradução gênica, ocorre apenas no estágio de embrião 2 células. Portanto, podemos afirmar que a ativação do genoma só ocorre de fato no estágio de embrião 2 células, onde os núcleos zigóticos são formados, e os genes passam a ser expressos com maior intensidade (Schultz RM et al., 1993). No estágio

de desenvolvimento embrionário seguinte, o de embrião 4 células, aproximadamente 45% dos genes são reprimidos, caracterizando-o em um estágio transitório conhecido como “estado transcricionalmente repressivo” ou de “quiescência transcricional”. Este fenômeno de repressão transcricional é controlado pelo processo de metilação das histonas a nível da cromatina, visto que este mecanismo é completamente reversível com a hiperacetilação das histonas. O mecanismo referido é tão importante para o correto desenvolvimento embrionário que a indução do mecanismo de hiperacetilação das histonas no estágio de embrião de 2 células impede sua clivagem para o estágio de embrião 4 células (Ma J et al., 2001). Estas observações nos sugerem que o aparecimento das SA nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário não foi um acidente. É concebível que elas possam estar envolvidas nos processos de transcrição e tradução gênica do zigoto, uma vez que níveis mais elevados de SA foram encontrados no citoplasma e no núcleo dos embriões de 1 e 2 células. Seguindo o mesmo raciocínio, foi justamente no estágio de embrião de 4 células, conhecido como “estado transcricionalmente repressivo”, onde a grande maioria dos genes e seus respectivos transcritos estão suprimidos, que identificamos o início de uma queda progressiva dos níveis de SA.

Alguns estudos mostraram que os componentes masculinos do zigoto, como a mitocôndria do espermatozoide, os precursores do centro de organização dos microtúbulos e os componentes celulares do espermatozoide, desempenham um papel discreto na embriogênese durante os estágios de clivagem (Sutovsky P et al., 2000). Portanto, os embriões em estágios iniciais do desenvolvimento são inteiramente dependentes das moléculas e organelas oocitárias para sua sobrevivência, até que ocorra a ativação do genoma embrionário nos estágios de clivagem subsequentes (Tang F et al., 2007). Nos embriões de 4 e 8 células, a

degradação do RNA e das proteínas maternas está quase completa (Li L et al., 2010). Esse mecanismo de depleção é essencial para o desenvolvimento embrionário, uma vez que os embriões de camundongos geneticamente alterados em laboratório, desprovidos desse mecanismo, não progridem além dos estágios de desenvolvimento de 4 e 8 células (Tsukamoto S et al., 2008). Em nossos resultados, encontramos que os níveis de SA caem precisamente a partir do estágio de embrião de 4 células, atingindo os níveis mais baixos no estágio de blastocisto. Os mesmos resultados foram posteriormente confirmados por microscopia imunoelétrica de transmissão. Os embriões no estágio de 8 células apresentaram níveis bastante reduzidos de SA quando comparado a estágios mais iniciais. Mas o que nos chamou a atenção, foi que, neste estágio de desenvolvimento, encontramos uma grande quantidade de SA concentradas principalmente dentro de autofagossomos, que são as organelas responsáveis pela remoção e limpeza de proteínas e transcritos que não são mais considerados como fundamentais para os diversos mecanismos celulares ou que não possuem mais potencial para utilização. Desse modo, podemos concluir que esses achados são consistentes com a teoria que hipotetizamos, em que as SA realmente possuem um papel crítico durante os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário, mas que com o avançar do desenvolvimento vão perdendo importância e funcionalidade, sendo praticamente descartadas nos estágios embrionários mais tardios.

O processo de maturação oocitária, que está intimamente relacionado à aquisição da competência gamética, requer uma perfeita sincronização entre a maturação nuclear e a maturação citoplasmática (Ferreira et al., 2009). São envolvidos nesse processo não apenas o mecanismo correto de segregação dos cromossomos homólogos e cromátides irmãs, mas também, a distribuição adequada

de organelas citoplasmáticas e o correto armazenamento de mRNAs, proteínas e fatores de transcrição (Ferreira EM et al., 2009). Alterações moleculares, intra e intercelulares, também estão envolvidas nesse mecanismo, como podemos citar, as modificações na configuração da cromatina, as mudanças na distribuição citoplasmática mitocondrial, a reorganização do retículo endoplasmático e as mudanças que ocorrem na sinalização dos canais de cálcio intracelulares (Coticchio et al., 2015). No momento em que ocorre o pico de liberação do hormônio luteinizante (LH), o oócito, que já nesta fase alcançou sua adequada maturação citoplasmática no estágio de VG, retoma a meiose I, com o objetivo de alcançar sua maturação nuclear. Nesta fase, considerada de extrema importância, o processo de maturação oocitária se intensifica com o objetivo de finalizar a primeira divisão meiótica e alcançar o estágio de MII. Coincidentemente, em oócitos humanos imaturos no estágio de VG, encontramos os maiores níveis de SA, corroborando com os achados de Berchowitz e colaboradores, onde, em leveduras cultivadas, oócitos no estágio de prófase I apresentaram maiores níveis de SA, que por sua vez, controlaram, de forma dominante e essencial, a finalização da primeira divisão meiótica. Uma proteína com propriedades semelhantes à estrutura amiloide, denominada Rim4, reprime a tradução de vários mRNAs até o início da meiose II, permitindo a correta separação dos cromossomos homólogos. Porém, durante a segunda divisão meiótica, é necessário que esta proteína seja completamente degradada, permitindo assim a transcrição do mRNA CLB3, para que ocorra a correta finalização da divisão meiótica (Berchowitz LE et al., 2015). Em nosso estudo, de forma a corroborar com os achados do estudo citado acima, níveis mais baixos de SA foram encontrados justamente após a conclusão da primeira divisão meiótica, no estágio de MII. Portanto, nossos resultados sugerem que, em humanos, as SA podem estar envolvidas no mecanismo

de conclusão da meiose I. Acreditamos que estudos futuros devem ser conduzidos no intuito de examinar o potencial, que as SA possuem, de se tornarem um promissor biomarcador da qualidade ou competência oocitária.

Uma relação existente, entre os níveis de SA no fluido folicular de oócitos humanos e as taxas de gravidez em ciclos de FIV, foi descrita anteriormente por Duan e colaboradores (Duan FH et al., 2014). Um produto da proteólise de uma proteína precursora amiloide, conhecida como A β 40, foi encontrado em níveis mais altos no fluido folicular de pacientes inférteis, submetidas à EOC para FIV, que alcançaram a gravidez (228.60 ± 53.21 pg/ml), quando comparado aos níveis das que não engravidaram (178.90 ± 76.59 pg/ml ; $p=0,024$). Eles também encontraram uma correlação positiva entre os níveis de A β 40 e o número de folículos antrais recrutados ($R=0,407$, $p=0,000$) e de oócitos recuperados ($R=0,476$, $p=0,000$). Ainda no mesmo estudo, foi demonstrado que as células da granulosa de camundongos tratados com essa mesma substância amiloide, apresentaram melhor capacidade de proliferação e melhor expressão de moléculas-chave envolvidas diretamente na esteroidogênese, como por exemplo, IGF-1, receptores de FSH e de aromatase, concluindo que níveis adequados de SA são de fundamental importância para um correto desenvolvimento embrionário. Esses resultados são consistentes com nosso estudo, onde encontramos níveis mais altos de SA em oócitos de pacientes com características clínicas de bom prognóstico para fertilização *in vitro*, como por exemplo, IMC adequado, ciclos mais curtos de estimulação ovariana controlada, níveis de AMH entre 1 e 3 ng/ml e casos de infertilidade por fator masculino ou ESCA.

Outro achado interessante foi descrito por Urieli-Shoval e colaboradores (Urieli-Shoval S et al., 2013). Níveis séricos de uma substância amiloide tipo A (SAA), um tipo diferente de proteína amiloide relacionada a processos inflamatórios como lesão

tecidual, infecção e neoplasia, foram aferidos no fluido folicular e no plasma de mulheres inférteis submetidas a EOC para FIV. Curiosamente, o grupo de mulheres que apresentou maiores níveis de SAA, além de ser composto por pacientes com mais idade e maior índice de massa corporal, teve uma redução de 50% na taxa de gravidez, quando comparado ao grupo com menores níveis de SAA. Estes achados são consistentes com os que apresentamos, sugerindo que os níveis de SA podem estar relacionados aos resultados de FIV.

Nosso estudo apresenta algumas limitações. Em primeiro lugar, o pequeno número amostral, característico de estudos pilotos, limita a generalização dos achados. Todavia, justifica-se por ser o primeiro estudo investigando a presença, distribuição e quantificação de SA em oócitos murinos e humanos e em embriões pré-implantação de camundongo. Em segundo lugar, como os oócitos e embriões murinos avaliados foram obtidos congelados, não podemos extrapolar os presentes achados para amostras frescas, justificando novos estudos utilizando oócitos e embriões frescos. Mas, é importante salientar que a utilização de embriões murinos produzidos *in vivo* é um ponto forte do nosso estudo, pois elimina o viés do uso de embriões produzidos *in vitro*, uma vez que a manipulação gamética e embrionária, assim como as condições de cultivo, potencialmente poderia interferir com a principal variável estudada. Em terceiro lugar, as metodologias empregadas para avaliação das SA (imunocoloração para SA e análise por microscopia confocal e imunoeletrônica de transmissão) são invasivas, não permitindo avaliar as mesmas amostras ao longo do tempo. Entretanto, nosso estudo permite comparar as mudanças na distribuição e níveis de SA em diferentes estágios do desenvolvimento, agregando novos conhecimentos na temática do estudo. Em quarto lugar, utilizamos oócitos humanos maduros maturados *in vitro* e obtidos de ciclos estimulados. Tanto a maturação *in*

vitro, como os diferentes protocolos de EOC utilizados, potencialmente poderiam interferir com a variável de estudo, justificando a realização de novos estudos investigando oócitos maduros, maturados *in vivo* e doados para pesquisa. Por último lugar, trata-se de um estudo preliminar, em que não realizamos ensaios para investigar as funções das SA em oócitos e embriões de camundongos. Neste sentido, nosso estudo permite apenas elaborarmos hipóteses relativas ao papel potencial das SA no processo de maturação oocitária em humanos e desenvolvimento embrionário pré-implantação em camundongos, que somente poderão ser comprovadas após a realização de estudos funcionais.

Como nenhum estudo anteriormente realizado investigou a presença e localização das SA em oócitos e embriões pré-implantação de mamíferos, então acreditamos que este trabalho serve como o estudo pioneiro nesta temática. Demonstramos, utilizando duas metodologias diferentes, que os níveis de SA variam nos diferentes estágios de desenvolvimento embrionário pré-implantação de camundongos, atingindo um pico no estágio de duas células. Também demonstramos a presença e distribuição de imunocoloração para SA em oócitos humanos maduros e imaturos e demosntramos que os níveis de SA nos mesmos, se correlacionam com características clínicas de bom prognóstico em pacientes submetidas à EOC e fertilização *in vitro*. Como as SA podem produzir alterações celulares patológicas, principalmente relacionadas à idade do hospedeiro, estudos futuros devem investigar o papel dessas substâncias no envelhecimento oocitário e conseqüentemente na infertilidade feminina, caracterizando os mecanismos fisiológicos e/ou fisiopatológicos envolvidos nesta etapa importante do desenvolvimento embrionário inicial.

CONCLUSÕES

6. Conclusões

Demonstramos, pela primeira vez, que as SA estão presentes na zona pelúcida, citoplasma e núcleo de oócitos maduros, corpúsculos polares e embriões pré-implantação de camundongos, com distribuição distinta nos diferentes estágios embrionários. Também evidenciamos, por análise por microscopia confocal (MC), que embriões murinos de duas células possuem os mais altos níveis de SA, seguido por oócitos maduros e embriões de uma célula. A partir do estágio de quatro células, observamos um declínio acentuado dos níveis de SA em comparação com os estágios anteriores, sendo que os blastocistos apresentam a menor concentração de SA. A análise por microscopia imunoelétrica de transmissão corroborou os achados da MC, evidenciando que no estágio de oito células uma grande quantidade de SA está concentrada principalmente dentro de autofagossomos. Desse modo, esses achados nos permitiram hipotetizar que as SA possuem um papel crítico durante os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário murino, mas, com o avançar do desenvolvimento, vão perdendo importância e funcionalidade, sendo praticamente descartadas nos estágios embrionários mais tardios.

Demonstramos também que as SA estão presentes na zona pelúcida, citoplasma e núcleo de oócitos humanos imaturos (VG e MI) e maduros e corpúsculos polares, com distribuição distinta nos diferentes estágios de maturação nuclear. Também evidenciamos, por análise por microscopia confocal (MC), que oócitos em VG (frescos e parados em VG após MIV) possuem os mais altos níveis de SA, seguido por oócitos em MI e MII. Também evidenciamos que os níveis de SA nos oócitos humanos possuem uma correlação com características clínicas de bom prognóstico em pacientes submetidas à EOC e FIV, como, baixo IMC e valores normais de AMH.

Seja na gravidez natural ou oriunda do uso das técnicas de reprodução assistida, a fertilidade feminina atinge um limite biológico e o principal responsável pelo envelhecimento reprodutivo é o gameta feminino. Portanto, a identificação de um marcador da qualidade oocitária tornaria mais eficaz a seleção de embriões com adequada capacidade de desenvolvimento. Devido ao significado biológico e patológico das SA, como seu envolvimento em alterações celulares patológicas, bem como sua participação na maturação oocitária e na embriogênese inicial de alguns organismos, acreditamos que estudos futuros devem investigar o seu possível papel como um biomarcador do envelhecimento e/ou da qualidade oocitária.

BIBLIOGRAFIA

7. Bibliografia

Adhikari D, Zheng W, Shen Y, Gorre N, Hämäläinen T, Cooney AJ *et al.* Tsc/mTORC1 signaling in oocytes governs the quiescence and activation of primordial follicles. In: Hum Mol Genet. 2010;19:397-410.

Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Tsc%2FmTORC1+signaling+in+oocytes+governs+the+quiescence+and+activation+of+primordial+follicles>

Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM *et al.* Inflammation and Alzheimer's disease. Neurobiol Aging 2000;21:383-421.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10858586>

Amanvermez R, Tosun M. An update on ovarian aging and ovarian reserve tests. Int J Fertil Steril. 2016; 9(4):411-415.

Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=An+update+on+ovarian+aging+and+ovarian+reserve+tests>

Aoki F, Worrada DM, Schultz RM. Regulation of transcriptional activity during the first and second cell cycles in the preimplantation mouse embryo. Dev Biol 1997;181:296-307.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9013938>

ASRM. Optimizing natural fertility: a committee opinion. Fertil Steril 2017;107:52-8.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28228319>

Battaglia DE, Goodwin P, Klein NA, Soules MR. Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women. *Hum Reprod* 1996;11:2217-22.

Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Influence+of+maternal+age+on+meiotic+spindle+assembly+in+oocytes+from+naturally+cycling+women>

Berchowitz LE, Kabachinski G, Walker MR, Carlile TM, Gilbert WV, Schwartz TU *et al.* Regulated Formation of an Amyloid-like Translational Repressor Governs Gametogenesis. *Cell* 2015;163:406-18.

Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Regulated+Formation+of+an+Amyloid-like+Translational+Repressor+Governs+Gametogenesis>

Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update* 2006;12:685-718.

Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=A+systematic+review+of+tests+predicting+ovarian+reserve+and+IVF+outcome>

Centers for Disease Control and Prevention, American Society for Reproductive Medicine, Society for Assisted Reproductive Technology 2014; Assisted Reproductive Technology National Summary Report. Atlanta (GA): US Dept of Health and Human Services; 2016.

Disponível em: <https://www.cdc.gov/art/pdf/2016-report/ART-2016-National-Summary-Report.pdf>

Chapman MR, Robinson LS, Pinkner JS, Roth R, Heuser J, Hammar M *et al.* Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science* 2002;295:851-5.

Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Role+of+Escherichia+coli+curli+operons+in+directing+amyloid+fiber+formation>

Coticchio G, Dal Canto M, Mignini Renzini M, Guglielmo MC, Brambillasca F, Turchi D *et al.* Oocyte maturation: gamete-somatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization. *Hum Reprod Update* 2015;21:427-54.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Oocyte+maturation%3A+gamete-somatic+cells+interactions%2C+meiotic+resumption%2C+cytoskeletal+dynamics+and+cytoplasmic+reorganization>

Duan FH, Chen SL, Chen X, Niu J, Li P, Liu YD *et al.* Follicular fluid Abeta40 concentrations may be associated with ongoing pregnancy following in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet* 2014;31:1611-20.

Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Follicular+fluid+Abeta40+concentrations+may+be+associated+with+ongoing+pregnancy+following+in+vitro+fertilization>

Egge N, Muthusubramanian A, Cornwall GA. Amyloid Properties of the Mouse Egg Zona Pellucida. *PLoS ONE* 2015;10(6): e0129907. doi:10.1371/journal.pone.0129907.

Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Amyloid+Properties+of+the+Mouse+Egg+Zona+Pell>

ucida

ESHRE. A prognosis-based approach to infertility: understanding the role of time. *Hum Reprod* 2017;32:1556-9.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=A+prognosis-based+approach+to+infertility%3A+understanding+the+role+of+time>

Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Ferriani RA, Navarro PA. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I reversibly arrests meiosis without increasing meiotic abnormalities after in vitro maturation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009;145:76-80.

Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Prematuration+of+bovine+oocytes+with+butyrolactone+I+reversibly+arrests+meiosis+without+increasing+meiotic+abnormalities+after+in+vitro+matur+ation>

Fowler DM, Koulov AV, Alory-Jost C, Marks MS, Balch WE, Kelly JW. Functional amyloid formation within mammalian tissue. *PLoS Biol* 2006;4:e6.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16300414>

Fowler DM, Koulov AV, Balch WE, Kelly JW. Functional amyloid--from bacteria to humans. *Trends Biochem Sci* 2007;32:217-24.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17412596>

Gleicher N, Weghofer A, Barad DH. Anti-Mullerian hormone (AMH) defines, independent of age, low versus good live-birth chances in women with severely diminished ovarian reserve. *Fertil Steril*. 2010;94(7):2824-2827.

Disponível em: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Anti-Mullerian+hormone+\(AMH\)+defines%2C+independent+of+age%2C+low+versus+good+live-birth+chances+in+women+with+severely+diminished+ovarian+reserve](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Anti-Mullerian+hormone+(AMH)+defines%2C+independent+of+age%2C+low+versus+good+live-birth+chances+in+women+with+severely+diminished+ovarian+reserve)

Guyonnet B, Egge N, Cornwall GA. Functional amyloids in the mouse sperm acrosome. *Mol Cell Biol.* 2014; 34:2624–2634.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24797071>

Hassold T, Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet* 2001;2:280-91.

Disponível em:

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=To+err+\(meiotically\)+is+human%3A+the+genesis+of+human+aneuploidy](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=To+err+(meiotically)+is+human%3A+the+genesis+of+human+aneuploidy)

Hogan, Brigid, Frank Costantini, and Elizabeth Lacy. *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1986.

Disponível em: http://web.mit.edu/7.31/restricted/pdfs/lab_man_all.pdf

Hornstein MD. State of the ART: Assisted Reproductive Technologies in the United States. *Reprod Sci* 2016;23:1630-3.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27624310>

Julious, S.A. Sample size of 12 per group rule of thumb for a pilot study. *Pharmaceutical Statistics* 2005;4(4):287-291.

Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/pst.185>

Keefe DL, Niven-Fairchild T, Powell S, Buradagunta S. Mitochondrial

deoxyribonucleic acid deletions in oocytes and reproductive aging in women. *Fertil Steril* 1995;64:577-83.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7641914>

Knowles TP, Vendruscolo M, Dobson CM. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15:384-96.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24854788>

Kwan AH, Winefield RD, Sunde M, Matthews JM, Haverkamp RG, Templeton MD *et al.* Structural basis for rodlet assembly in fungal hydrophobins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:3621-6.

Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Structural+basis+for+rodlet+assembly+in+fungal+hydrophobins>

Lancaster, G.A., Dodd, S., and Williamson, P.R. Design and analysis of pilot studies: recommendations for good practice. *J Eval Clin Pract* 2004;**10**(2):307-12.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15189396>

Latham KE, Garrels JI, Chang C, Solter D. Quantitative analysis of protein synthesis in mouse embryos. I. Extensive reprogramming at the one- and two-cell stages. *Development* 1991;112:921-32.

Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Quantitative+analysis+of+protein+synthesis+in+mouse+embryos.+I.+Extensive+reprogramming+at+the+one-+and+two-cell+stages>

Li J, McQuade T, Siemer AB, Napetschnig J, Moriwaki K, Hsiao YS *et al.* The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for

programmed necrosis. *Cell* 2012;150:339-50.

Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=The+RIP1%2FRIP3+necrosome+forms+a+functional+amyloid+signaling+complex+required+for+programmed+necrosis>

Li L, Zheng P, Dean J. Maternal control of early mouse development. *Development* 2010;137:859-70.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20179092>

Liu L, Keefe DL. Nuclear origin of aging-associated meiotic defects in senescence-accelerated mice. *Biol Reprod* 2004;71:1724-9.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Nuclear+origin+of+aging-associated+meiotic+defects+in+senescence-accelerated+mice>

Loo DT, Copani A, Pike CJ, Whittemore ER, Walencewicz AJ, Cotman CW. Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:7951-5.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8367446>

Luke B, Pregnancy and Birth Outcomes in Couples with Infertility With and Without Assisted Reproductive Technology: With an Emphasis on US Population-Based Studies, *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2017; doi: 10.1016/j.ajog.2017.03.012.

Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Pregnancy+and+Birth+Outcomes+in+Couples+with+Infertility+With+and+Without+Assisted+Reproductive+Technology%3A+With+an+Emphasis+on+US+Population-Based+Studies%2C+American+Journal+of+Obstetrics+and+Gynecology+2017>

Ma J, Svoboda P, Schultz RM, Stein P. Regulation of zygotic gene activation in the preimplantation mouse embryo: global activation and repression of gene expression. *Biol Reprod* 2001;64:1713-21.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11369600>

Maji SK, Perrin MH, Sawaya MR, Jessberger S, Vadodaria K, Rissman RA *et al.* Functional amyloids as natural storage of peptide hormones in pituitary secretory granules. *Science* 2009;325:328-32

Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Functional+amyloids+as+natural+storage+of+peptide+hormones+in+pituitary+secretory+granules>

Mathews, T.J. and Hamilton, B.E. Mean Age of Mothers is on the Rise: United States, 2000-2014, NCHS 2016.

Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Mean+Age+of+Mothers+is+on+the+Rise%3A+United+States%2C+2000-2014>

Nothias JY, Miranda M, DePamphilis ML. Uncoupling of transcription and translation during zygotic gene activation in the mouse. *Embo j* 1996;15:5715-25.

Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Uncoupling+of+transcription+and+translation+during+zygotic+gene+activation+in+the+mouse>

Parodi J., *et al.* "Functional and Structural Effects of Amyloid-B Aggregate on *Xenopus laevis* Oocyte". *Mol. Cells* 2012;34:349-355.

Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Functional+and+Structural+Effects+of+Amyloid-B+Aggregate+on+Xenopus+laevis+Oocyte>

Pastore LM, Christianson MS, Stelling J, Kearns WG, Segars JH. Reproductive ovarian testing and the alphabet soup of diagnoses: DOR, POI, POF, POR, and FOR. *J Assist Reprod Genet* 2017.

Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Reproductive+ovarian+testing+and+the+alphabet+soup+of+diagnoses%3A+DOR%2C+POI%2C+POF%2C+POR%2C+and+FOR.>

Pinzer BR, Cacquevel M, Modregger P, McDonald SA, Bensadoun JC, Thuring T *et al.* Imaging brain amyloid deposition using grating-based differential phase contrast tomography. *Neuroimage* 2012;61:1336-46.

Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Imaging+brain+amyloid+deposition+using+grating-based+differential+phase+contrast+tomography>

Polani PE, Crolla JA. A test of the production line hypothesis of mammalian oogenesis. *Hum Genet* 1991;88:64-70.

Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=A+test+of+the+production+line+hypothesis+of+mammalian+oogenesis>

Riek R, Eisenberg DS. The activities of amyloids from a structural perspective. *Nature* 2016;539:227-35.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27830791>

Scheffer JB, Scheffer BB, de Carvalho RF, Rodrigues J, Grynberg M, Mendez

Lozano DH. Age as A Predictor of Embryo Quality Regardless of The Quantitative Ovarian Response. *Int J Fertil Steril* 2017;11:40-6.

Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Age+as+A+Predictor+of+Embryo+Quality+Regardless+of+The+Quantitative+Ovarian+Response>

Schultz RM. Regulation of zygotic gene activation in the mouse. *Bioessays* 1993;15:531-8.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8135766>

Schultz RM. The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. *Hum Reprod Update* 2002;8:323-31.

Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=The+molecular+foundations+of+the+maternal+to+zygotic+transition+in+the+preimplantation+embryo>

Shewmaker F, McGlinchey RP, Wickner RB. Structural insights into functional and pathological amyloid. *J Biol Chem* 2011;286:16533-40.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21454545>

Sim, J., and Lewis, M. The size of a pilot study for a clinical trial should be calculated in relation to considerations of precision and efficiency. *J Clin Epidemiol* 2012;**65**(3):301-8.

Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=The+size+of+a+pilot+study+for+a+clinical+trial+should+be+calculated+in+relation+to+considerations+of+precision+and+efficiency>

Sun X, Su Y, He Y, Zhang J, Liu W, Zhang H *et al.* New strategy for in vitro

activation of primordial follicles with mTOR and PI3K stimulators. *Cell Cycle* 2015;14:721-31.

Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=New+strategy+for+in+vitro+activation+of+primordial+follicles+with+mTOR+and+PI3K+stimulators>

Sutovsky P, Schatten G. Paternal contributions to the mammalian zygote: fertilization after sperm-egg fusion. *Int Rev Cytol* 2000;195:1-65.

Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Paternal+contributions+to+the+mammalian+zygote%3A+fertilization+after+sperm-egg+fusion>

Szekeres-Bartho J. Successful implantation from the embryonic aspect. *Am J Reprod Immunol* 2016; 75: 382–387.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26554538>

Takahashi T, Igarashi H, Amita M, Hara S, Matsuo K, Kurachi H. Molecular mechanism of poor embryo development in postovulatory aged oocytes: mini review. *J Obstet Gynaecol Res* 2013;39:1431-9.

Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Molecular+mechanism+of+poor+embryo+development+in+postovulatory+aged+oocytes%3A+mini+review>

Talmor A, Dunphy B. Female obesity and infertility. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2015;29:498-506.

Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=talmor+Female+obesity+and+infertility>

Tang F, Kaneda M, O'Carroll D, Hajkova P, Barton SC, Sun YA *et al.* Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development. *Genes Dev* 2007;21:644-8.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17369397>

Thomas T, Thomas G, McLendon C, Sutton T, Mullan M. beta-Amyloid-mediated vasoactivity and vascular endothelial damage. *Nature* 1996;380:168-71.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8600393>

Tsukamoto S, Kuma A, Murakami M, Kishi C, Yamamoto A, Mizushima N. Autophagy is essential for preimplantation development of mouse embryos. *Science* 2008;321:117-20.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18599786>

Urieli-Shoval S, Finci-Yeheskel Z, Eldar I, Linke RP, Levin M, Prus D *et al.* Serum amyloid A: expression throughout human ovarian folliculogenesis and levels in follicular fluid of women undergoing controlled ovarian stimulation. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:4970-8.

Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Serum+amyloid+A%3A+expression+throughout+human+ovarian+folliculogenesis+and+levels+in+follicular+fluid+of+women+undergoing+controlled+ovarian+stimulation>

Webster, A. and M. Schuh. "Mechanisms of Aneuploidy in Human Eggs." Trends Cell Biol 2017; 27(1): 55-68.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27773484>

Whelly S, Johnson S, Powell J, Borchardt C, Hastert MC, Cornwall GA. Nonpathological extracellular amyloid is present during normal epididymal sperm maturation. PLoS One 2012;7:e36394.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22570708>

Yu J, Hecht NB, Schultz RM. Expression of MSY2 in mouse oocytes and preimplantation embryos. Biol Reprod 2001;65:1260-70.

Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Expression+of+MSY2+in+mouse+oocytes+and+preimplantation+embryos>

Yurttas P, Morency E, Coonrod SA. Use of proteomics to identify highly abundant maternal factors that drive the egg-to-embryo transition. Reproduction 2010;139:809-23.

Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Use+of+proteomics+to+identify+highly+abundant+maternal+factors+that+drive+the+egg-to-embryo+transition>

Zegers-Hochschild F, Schwarze JE, Crosby J, Musri C, Urbina MT. Assisted reproductive techniques in Latin America: the Latin American Registry, 2015. Reprod Biomed Online 2018;37:685-92.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30385145>

Zhang H, Liu K. Cellular and molecular regulation of the activation of mammalian primordial follicles: somatic cells initiate follicle activation in adulthood. Hum Reprod Update 2015;21:779-86.

Disponível em:

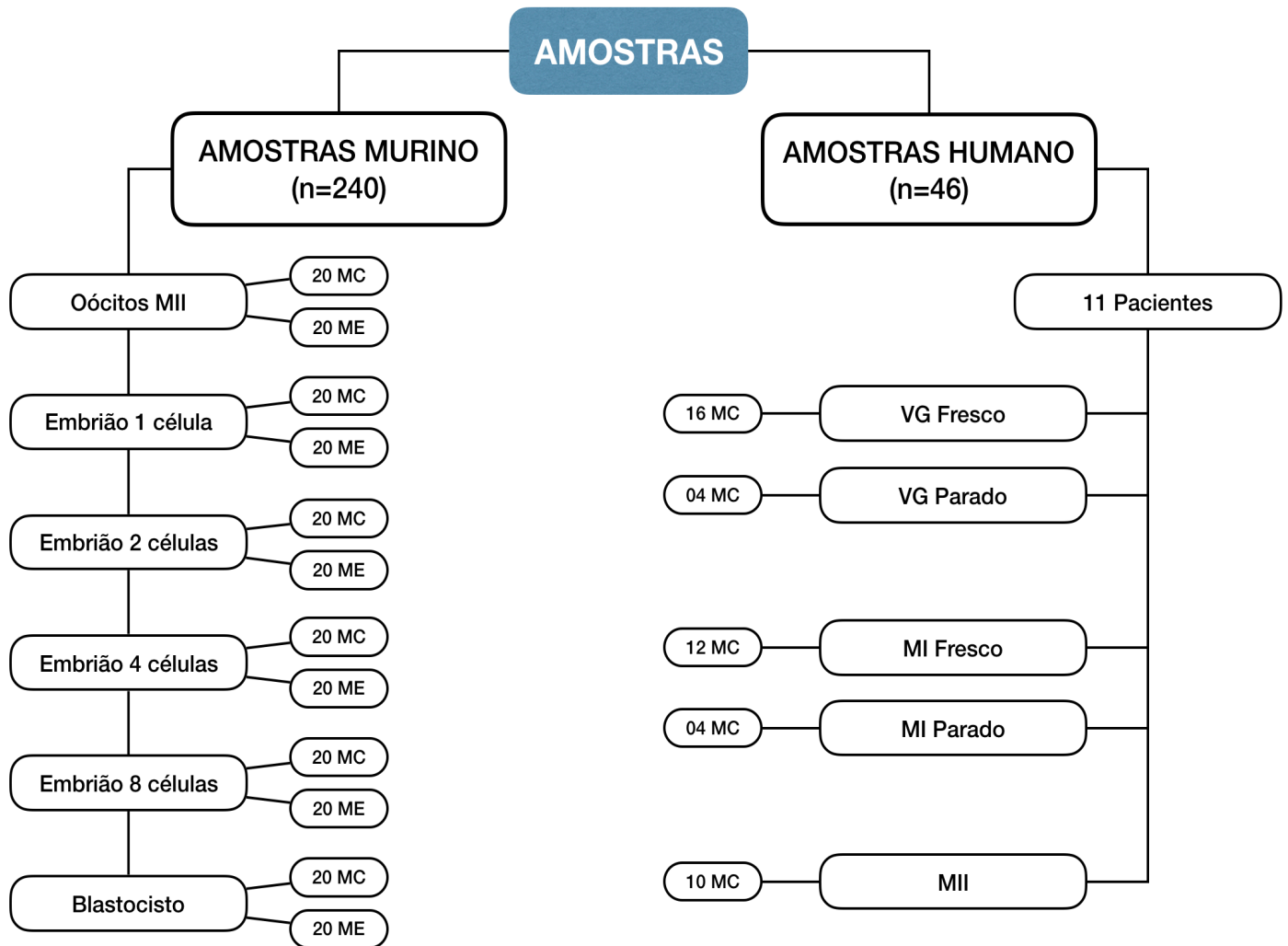
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Cellular+and+molecular+regulation+of+the+activation+of+mammalian+primordial+follicles%3A+somatic+cells+initiate+follicle+activation+in+adulthood>

APÊNDICES

8. Apêndices

8.1. Fluxograma das amostras

FLUXOGRAMA PROJETO AMILOIDE



MC – Microscopia Confocal

ME – Microscopia Imunoelétrica de Transmissão

VG – Vesícula Germinativa

MI – Metáfase I

MII – Metáfase II

MANUSCRITO

9. Manuscrito

Manuscrito submetido ao Journal of Assisted Reproduction and Genetics.

Original Article

TITLE: AMYLOID LIKE SUBSTANCE IN MICE AND HUMAN OOCYTES AND EMBRYOS

Ricardo N. PIMENTEL, MD^a *, Paula A. Navarro, MD^b, Fang Wang, PhD^c, LeRoy G. Robinson Jr., PhD^c, Michael Cammer, MFA^d, Fengxia Liang, PhD^d, Yael Kramer, MS^c and David Lawrence Keefe, MD^c.

(^a) Research Scientist from the Department of Obstetrics and Gynecology, New York University School of Medicine, New York, New York.

(^b) Human Reproduction Division, Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

(^c) Department of Obstetrics and Gynecology, New York University, Langone Medical Center, New York, New York.

(^d) DART Microscopy Laboratory, New York University School of Medicine, New York, New York.

(*) Present Address: Human Reproduction Division, Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Corresponding author: David Lawrence Keefe, MD, Stanley H. Kaplan Professor and Chairman of Obstetrics and Gynecology, Department of Obstetrics and Gynecology, 550 First Avenue, NBV 9N1, New York, New York 10016, E-mail: david.keefe@nyumc.org. Phone number: +1(212)263-3360.

Financial Disclosure

Support from FAPESP, Brazil (Process 2015/21907-0) (PN) and the Stanley H. Kaplan Endowment Fund.

Presented at a meeting: Presented at the 73rd Scientific Congress of American Society for Reproductive Medicine, October 28 – November 1, 2017, San Antonio, TX, USA.

Presented at the 74th Scientific Congress of American Society for Reproductive Medicine, October 6 – 10, 2018, Denver, CO, USA.

Acknowledgements

We thank NYULMC DART Microscopy Lab for their assistance: Alice Liang, Chris Petzold and Kristen Dancel-Manning with TEM work, and Michael Cammer for LM work.

ABSTRACT

Purpose: To identify and characterize amyloid like substance (ALS) in human and mouse oocytes and mouse preimplantation embryos.

Methods: An experimental prospective pilot study. A total of 252 mouse oocytes and preimplantation embryos and 46 immature and in vitro matured human oocytes from 11 consenting fertility patients, ages 18-45. Fluorescence intensity from Immunofluorescent staining and data from confocal microscopy were quantified. Data were compared by one-way analysis of variance, with the LeastSquare-MEANS post-test, Pearson correlation coefficients (r) and Bivariate analyses (t -tests). ALS morphology was verified using transmission electron microscopy.

Results: Immunostaining for ALS appears throughout the zona pellucida, as well as in the cytoplasm and nucleus of mouse oocytes, polar bodies, and preimplantation embryos. In mouse, 2-cell embryos exhibited the highest level of ALS ($69000187.4 \pm 6733098.07$). Electron microscopy confirmed the presence of ALS. In humans, fresh germinal vesicle stage oocytes exhibited the highest level of ALS (4164.74088 ± 1573.46) followed by metaphase I and II stages ($p=0.008$). There was a significant negative association between levels of ALS and patient body mass index, number of days of ovarian stimulation, dose of gonadotropin used, time between retrieval and fixation and time after the hCG trigger. Significantly higher levels of ALS were found in patients with AMH between 1 and 3 ng/ml compared to <1 ng/ml.

Conclusion: We demonstrate for the first time the presence, distribution, and change in ALS throughout mouse and human oocyte maturation, and mouse embryonic development. We also determine associations between ALS in human oocytes with clinical characteristics.

Key Words: *Amyloid, oocyte quality, reproductive aging, female fertility.*

INTRODUCTION

Mammalian oocytes are unique among germ cells in that they are exceptionally long-lived, and they age precociously. Unlike men, who continue to produce sperm throughout their lives, females halt oogenesis by about twenty weeks of gestation [1]. Primordial follicles, containing oocytes arrested at the diplotene stage of the first meiotic division, remain in a state of partial metabolic quiescence throughout the reproductive lifespan of the woman [2]. By birth, 75% of the follicular pool already has been lost, and does not regenerate [3]. Follicular depletion accelerates at puberty and continues until near complete depletion at menopause. During the reproductive phase, about 1000 follicles activate each month, though only one becomes dominant and ovulates. The remainder undergo atresia [4].

In addition to declining ovarian reserve, women experience decreasing fertility with age, which accelerates after age 35 [5]. The oocyte must be the locus of reproductive aging, since donation of oocytes from young to older women abrogates the effects of aging on their fertility. The outcome of ART (Assisted Reproductive Technology), when using a women's own eggs exhibits profound effects of aging [6]. This sharp decline in fertility with age results from decreasing oocyte developmental competence, which is the main determinant of embryo developmental competence and implantation rates [7, 8]. Markers of oocyte developmental competence are needed to help women make important clinical decisions [9-13]. Cellular and molecular mechanisms driving oocyte aging remain poorly understood. For this reason, maternal age remains the best marker of oocyte/embryo developmental competence, which is the ability of an egg or embryo to generate a live birth [14].

Amyloid like substances (ALS) underlie aging of many long-lived cells, such as neurons. Amyloids are elongated, unbranched proteins that generate a characteristic (cross-beta-sheet) diffraction pattern when exposed to x-rays [15]. An especially unique characteristic of these proteins is their ability to self-replicate and adapt to varying environments [16]. Since their discovery 150 years ago, they have been linked with necrosis and inflammation [17-20]. Their contributory role in several neurodegenerative diseases has been highlighted [21, 22]. Interestingly, besides their pathological role, ALS play functional roles in a number of organs [23], including melanin formation in skin and thyroid hormones storage in the thyroid gland [24-27]. They also have been described in the reproductive tract. In the epididymis and in the acrosome of mice spermatozoa ALS play essential roles in sperm maturation. In follicular cells of frog oocytes, they facilitate cellular communication, and in oocytes they contribute to the structure of the zona pellucida [28-31].

A recent study demonstrated that aggregates of ALS, widely known for its toxic effects in most cells, in budding yeast translationally represses cyclins and ensures homologous chromosome segregation and controls gametogenesis. During meiosis I, Rim4, an RNA-binding protein that in vitro forms amyloid fibrils structures, inhibits the translation of Cyclin type B (CLB3) and numerous other microRNAs, allowing proper separation of homologous chromosomes. Throughout the second meiotic division, Rim4 is degraded, granting the correct translation of CLB3 and proper conclusion of gamete cell division process [32].

Considering the potential of amyloid structures to become a future marker of oocyte function and quality, and the lack of studies investigating their presence and distribution in mammalian oocytes and embryos, we sought to identify and characterize amyloid like substance in oocytes, cleavage stage embryos, and blastocysts, using a murine model, and in immature and mature oocytes using a human model. We also aimed to evaluate the relationship between levels of amyloid in human oocytes and clinical characteristics of the patients submitted to ART treatment.

MATERIALS AND METHODS

Mouse Samples

For a pilot study, we studied metaphase II mouse oocytes and in vivo fertilized embryos (1-cell, 2-cell, 4-cell, 8-cell, and blastocyst) (n=42 samples for each stage) (Embryotech Laboratories, Inc., Wilmington, MA), which did not require approval from the Institutional Animal Committee. Each straw was removed from the liquid nitrogen container and left at room temperature for 2 minutes, then moved to a 37 ° C water heated container for another 1 minute before cutting the straw and transferring the samples to a Petri dish containing M2 culture medium (EmbryoMax® M2 Medium (1X)). Half of the samples (n=126) were used for immunofluorescence microscopy and the other half (n=126) for electron microscopy.

Human Samples

Patients were submitted to a controlled ovarian hyperstimulation cycle (COH) using gonadotropin-releasing hormone (GnRH) downregulation, microdose leuprolide acetate, or GnRH-antagonist protocols and exogenous gonadotropins (recombinant follicle stimulating hormone (FSH) and

human menopausal gonadotropin (hMG)). When lead follicles reached at least 18-mm mean diameter, final oocyte maturation was induced using a subcutaneous injection of Ovidrel, or leuprolide acetate. Oocyte retrieval via transvaginal ultrasound-guided needle aspiration of ovarian follicular fluid was performed 36 h later.

Immature oocytes were obtained according to the IRB approved study H6902. A total of 46 germinal vesicles (GV) and metaphase I (MI) human oocytes donated for research, from women ages 18-45, were collected and in vitro matured for up to 48 hours following retrieval. Some immature oocytes were in vitro matured to metaphase II (MII) stage. Samples were fixed between 3 and 48 hours after the retrieval. All human samples were assigned to immunostaining.

We analyzed clinical variables including patient's age, weight and height, body mass index, history of smoking tobacco, reproductive procedures, infertility diagnosis, anti-müllerian hormone (AMH) level before stimulation cycle, stimulation cycle length, type and dose of GnRH antagonist, type and dose of gonadotropin, stimulation protocol used, type and dose of trigger, estradiol on the day of trigger, total dose of gonadotropin, date and time of retrieval, number of eggs collected, number of eggs donated, time of the trigger, type of stimulation cycle (frozen or fresh), date/time and state of fixation, time between retrieval and fixation, and hours after trigger.

AMH levels were measured by the same assay (Quest Diagnostics Tests – CPT 82397) at clinical laboratories. AMH concentrations above and below 1.06 ng/ml were compared, because this level best differentiates response to ovarian stimulation, retrievable oocytes, and odds of live birth (Gleicher, 2010). Data were de identified to ensure privacy.

Immunofluorescence Microscopy

Mouse and human samples were processed for indirect immunofluorescence. Chromosomes were stained with Hoechst 33342. For detection of ALS, oocytes and embryos were fixed in freshly prepared 3.7% paraformaldehyde, permeabilized, incubated with Anti-Amyloid Fibril OC Antibody [AFOC] (1:1000, Millipore, AB2286), then labeled with a secondary fluorescence labeled antibody. Samples were mounted in Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, CA, USA).

A Zeiss AxioObserver with 20X Plan-Apochromat N.A. 0.8, narrow pass filter blocks for fluorescence, and an AxioCam 503 cooled CCD camera with 14 bits was used to image one picture of each field at constant illumination, exposure, and gain settings. These linear images were loaded into

ImageJ, where each feature was traced, and the mean and integrated intensity were measured. The background was subtracted and plotted using GraphPad Prism 5.0. Z series were collected using a Zeiss 880 laser scanning confocal microscope with a 63X Plan-Apochromat N.A. 1.4 lens. Images displayed using average pixel projection with linear contrast adjustment to show morphology. Here we adopted arbitrary units (a.u.) to report intensities, knowing that intensities are relative only within each set of images per imaging session assuming they were all stained and imaged under identical conditions.

Electron Microscopy

Transmission electron microscopy was carried out in the Microscopy Core Laboratory at NYU Langone School of Medicine. Mouse oocyte, 1-cell, 2-cell, 4-cell, and 8-cell embryos, as well as blastocysts were isolated and washed twice in 0.1% PBS-PVP.

For morphology analysis, cells were fixed with 2.5% glutaraldehyde in PBS-PVP (pH 7.2) for 1 hour and post-fixed with 1% osmium tetroxide for 1.5 hours at room temperature, then processed in a standard manner and embedded in LX112 resin (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA). Semi-thin sections were cut at 500nm and stained with 1% toluidine blue to evaluate the quality of preservation. Ultrathin sections (60 nm) were cut, mounted on copper grids and stained with uranyl acetate and lead citrate by standard methods.

To localize ALS, we performed immunolabeling using both pre-embedding and Tokuyasu methods. For pre-embedding immunolabeling, cells were fixed with 3.7% paraformaldehyde in PBS for 15min. After washing with PBS, cells were blocked with 3% goat serum, and 0.1% BSA for 30 min, then treated with 0.1% TritonX-100 in blocking buffer for 30min. Cells were washed with blocking solution over 10 hours at 4°C and incubated with anti-amyloid fibril OC antibody (AFOC, Millipore) for 2 hours at room temperature, then at 4°C overnight. The cells were washed with blocking buffer and nanogold conjugated secondary antibody (Nanoprobes, Yaphank, NY) were applied. After fixing with 1% glutaraldehyde in PBS for 5min, silver enhancement (HQ Silver enhancement kit, Nanoprobes, Yaphank, NY) was performed in the dark for 8 minutes. Cells were washed with distilled water, fixed in 0.5% OsO₄ for 15min, counterstained with 0.5% uranyl acetate for 1 hour at 4°C, dehydrated in ethanol and embedded in LX112. Ultrathin sections (60 nm) were cut, mounted on copper grids, and stained with uranyl acetate and lead citrate by standard methods.

For the Tokuyasu method, cells were fixed with 2% paraformaldehyde in 0.1M PBS-PVP containing 0.5% glutaraldehyde, pH 7.2-7.4 for 4 hours at 4C. Sucrose infused tissues were cryosectioned at 80nm and incubated with anti-amyloid fibril OC antibody, followed by application of colloidal gold conjugated protein A or goat anti-rabbit conjugated secondary antibodies (18nm colloidal gold-affiniPure goat anti-rabbit IgG (H+L), Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., West Grove, PA; 15nm protein A gold, Cell Microscopy Center, University Medical Center Utrecht, 35584 CX Utrecht, The Netherlands) were applied and stained with methyl cellulose-uranyl acetate.

All stained grids were examined under a Philips CM-12 electron microscope and photographed with a Gatan (4k x2.7k) digital camera.

Statistical Analysis

SAS version 9.4 (SAS Institute) was used to perform data analyses. Descriptive statistics were calculated for all variables in the data set. Mean, standard deviation, and ranges were computed for continuous variables, while frequencies were calculated for categorical variables. Normally distributed data were compared by one-way analysis of variance (ANOVA), with the LeastSquare-MEANS post-test for group effects. Pearson correlation coefficients (r) were calculated to evaluate the relationships between continuous variables (e.g., number of oocytes retrieved and AMH level), depending on whether data were normally distributed. Univariate analyses (t-tests and χ^2) were conducted to assess the relationships between all independent variables. Differences were considered to be statistically significant if $P < .05$.

RESULTS

Mouse - Immunofluorescence Microscopy

In all 126 samples, immunostaining for ALS appeared throughout the cytoplasm and nucleus of oocytes and preimplantation embryos. From oocyte to 8-cell embryo stages, a significant amount of ALS was distributed homogeneously throughout the cytoplasm. In blastocyst stage embryos, a greater concentration of ALS appeared in the inner cell mass. The ALS was excluded from nuclei of trophoblast cells (Fig. 1).

Quantitative analysis showed high levels of ALS in oocytes ($56232479.7 \pm 5362949.38$ a.u.), and 1-cell embryos ($58544435.0 \pm 7823810.44$ a.u.), followed by sharply increased levels in 2-cell embryos ($69000187.4 \pm 6733098.07$ a.u.). ALS reaches its lowest level in blastocysts ($24423606.2 \pm 4882808.37$ a.u.) (Fig. 2). Levels of ALS differ across the various stages of development, with significant differences between oocyte and 2-cell embryos ($p < .0001$) and 2-cell embryos and blastocysts ($p < .0001$). ALS levels did not differ between oocyte and 1-cell embryos ($56232479.7 \pm 5362949.38$ a.u. vs. $58544435.0 \pm 7823810.44$ a.u. ; $p = 0.2715$) (Table 1).

Control specimens, in which the first antibody in the immunostaining process was omitted ($n = 10$ samples among different stages), exhibited no significant immuno staining.

Mouse - Electron Microscopy

Consistent with light microscopy results, electron microscopy showed homogenous distribution of immune staining for ALS throughout the cytoplasm and nucleus of oocytes, 1-cell, 2-cell and 4-cell embryo stage (data not shown). ALS forms crystal sheet-like structures and protein aggregates inside the cytoplasm of 8-cell stage embryos (Fig. 3a, 3b) and blastocysts (data not shown). We also detected ALS in the autophagosomes of 8-cell stage embryos (Fig. 3c). No significant labeling appeared in control groups, in which the primary antibody had been omitted (Fig. 3d).

Human - Immunofluorescence Microscopy

Forty-six immature oocytes from eleven subjects were accessioned for this study. Patient characteristics and ART techniques are shown in Table 2. Patients averaged $36 (\pm 2.94)$ years of age, none smoked, and mean body mass index was $24.19 (\pm 3.25)$ kg/m². Among eight patients submitted to *in vitro* fertilization (IVF), 27.5% had female factor, 58.8% male factor and 13.7% had unexplained infertility. Two patients had elective egg freezing (EEF) cycles. AMH levels averaged $4.42 (\pm 2.13)$ ng/ml. Mean number of days of stimulation was $10.2 (\pm 0.85)$ days. The mean value of the estradiol on day of trigger was $3285 (\pm 1512)$ ng/dL, and total dose of gonadotropin used averaged $2958 (\pm 1249)$ IU. A total of 206 eggs were collected after retrievals, and 46 immature eggs were donated for our study. The time between retrieval and sample fixation averaged 7 hours for fresh GV and MI and 27 hours for arrested GV, MI and MII oocytes. The time after the trigger averaged 42 hours for fresh GV and MI and 63 hours for arrested GV, MI and MII oocytes.

In all 46 samples immunostaining for ALS appears throughout the zona pellucida, as well as in the cytoplasm and nucleus of oocytes and polar bodies. In GV oocytes, a significant amount of ALS was distributed heterogeneously throughout the cytoplasm. Less staining and more heterogeneous distribution were identified in MI and MII oocytes (Fig. 4).

Quantitative analysis showed that fresh GV oocytes possess higher levels (4164.74 ± 1573.46 a.u.) of ALS. This stage was followed by arrested GV (2967.67 ± 659.06 a.u.), fresh MI (2601.58 ± 1143.79 a.u.), MII (2495.25 ± 1775.88 a.u.), and arrested MI (2311.80 ± 986.36 a.u.) oocytes (Fig. 5). Using analysis of variance, there were significant differences of ALS between fresh GV and fresh MI (4164.74 ± 1573.46 a.u. vs. 2601.57 ± 1143.70 a.u.; $p=0.008$), and fresh GV and MII (4164.74 ± 1573.46 a.u. vs. 2495.25 ± 1775.88 a.u.; $p=0.008$) oocytes. There were no significant differences between fresh GV and arrested GV (4164.74 ± 1573.46 a.u. vs. 2967.66 ± 659.06 a.u.; $p=0.079$), and fresh MI and arrested MI (2601.57 ± 1143.70 a.u. vs. 2311.80 ± 986.36 a.u.; $p=0.705$) (Table 3).

To clarify the association between levels of ALS and clinical characteristics of patients submitted to IVF treatments, cycles were categorized in groups by age (<35 vs. ≥ 35 years old), body mass index (<25 vs. ≥ 25 Kg/m²), treatment modality (IVF vs. EEF), type of gonadotropin (Follistim vs. Gonal F), and stimulation cycle type (Fresh vs. Frozen). Higher levels of ALS were found in infertile patients submitted to IVF treatment compared to EEF (3335.6 ± 1736.5 a.u. vs. 2786.9 ± 1032.0 a.u.; $p=0.032$), and in patients who used Gonal F instead of Follistim (3672.3 ± 1516.4 a.u. vs. 2017.9 ± 758.2 a.u.; $p=0.008$) (data not shown). There were no significant differences of ALS levels between the age groups studied (4026.61 ± 1987.71 a.u. vs. 2998.77 ± 1427.13 a.u.; $p=0.219$), and type of stimulation cycle (2912.8 ± 1311.30 a.u. vs. 4178.2 ± 2087.0 a.u.; $p=0.062$) (data not shown). A significant negative correlation was found between levels of ALS and body mass index (-0.54 ; $p=0.0007$) (Fig. 6a), number of days of stimulation (-0.44 ; $p=0.002$) (Fig. 6b), dose of hMG (-0.44 ; $p=0.002$) (Fig. 6c), time between retrieval and fixation (-0.33 ; $p=0.023$) (Fig. 6d) and hours after trigger (-0.33 ; $p=0.023$) (Fig. 6e). There were no significant correlations between levels of ALS and age (0.06 ; $p=0.667$), level of estradiol day of trigger (-0.11 ; $p=0.433$), total dose of gonadotropin (-0.27 ; $p=0.666$), and number of retrieved eggs (-0.10 ; $p=0.467$) (data not shown).

Some variables were categorized into three groups and levels of ALS compared to cause of infertility (female factor vs. male factor vs. unexplained), AMH level (<1 ng/ml vs. 1-3 ng/ml vs. >3 ng/ml), and type of GnRH analogue (Antagon vs. Cetrotide vs. microdose lupron). Higher levels of ALS were

found in patients undergoing IVF treatment for male factor compared to unexplained (3926.35 ± 1861.0 a.u. vs. 2550.47 ± 1222.1 a.u.; $p=0.004$) (Fig. 7a). Significant differences also were found among AMH levels categories, where higher levels of ALS were found in patients with AMH between 1 and 3 ng/ml when compared to <1 ng/ml (4592.6 ± 2126.3 a.u. vs. 737.3 ± 14.7 a.u.; $p=0.0002$), and >3 ng/ml (4592.6 ± 2126.3 a.u. vs. 3197.2 ± 895.0 a.u.; $p=0.006$) (Fig. 7b). Higher levels of ALS were found in patients that received Cetrotide compared to those receiving Antagon (3871.7 ± 1660.1 a.u. vs. 2368.5 ± 993.4 a.u.; $p=0.0008$) (Fig. 7c). There was no significant association between levels of ALS and type of drug used on the trigger (data not shown).

All control samples, from which the first antibody was omitted, did not specifically label any structures.

DISCUSSION

Here we first show that ALS, conventionally considered to have toxic and degenerative roles, is present in mammalian oocytes and embryos at levels which vary according to stage of development. We demonstrate that ALS is present in the nucleus and cytoplasm of mice oocytes and embryos and differ among the various stages of embryo development, with higher concentrations in early embryo stages. On the basis of the results, we speculate that ALS plays an important role during embryo development. In budding yeast, it is involved in oocyte maturation and cell division. Considering our results that levels of ALS are high at the GV stage, we speculate that it may also play a role in oocyte maturation, especially at the conclusion of the first meiosis in mammalian oocytes. Our study also shows correlation between levels of ALS and good prognoses clinical characteristics in patients undergoing IVF treatments, such as normal BMI, adequate levels of AMH, and short controlled ovarian stimulation cycles. It will be interesting to determine whether ALS is associated with success rates during fertility treatment.

Recently, several studies are being conducted in order to better understand the complex molecular composition of the mammalian oocyte. Using transcriptional profiling and proteomics, Yurttas et al., concluded that the mature oocyte transcribes and stores a significant amount of substances, which, contrary to what was thought previously, are not used during oogenesis, but rather are required to regulate embryogenesis. These structures are considered essential for appropriate oocyte-to-embryo transition [33]. Intriguingly, mice oocytes, at around 2.5 weeks, begin intense metabolic activity,

reflecting increased synthesis of mRNAs and proteins. This extends until early embryonic stages. However, most of these structures are stored in the oocyte for use after fertilization [34]. The exact mechanism of storage of these molecules is not yet fully understood, but many molecules take the form of ALS to achieve efficient storage, e.g. in thyroid, where peptide and protein hormones are stored in secretory granules in amyloid like aggregations [27]. Presumably, some mRNAs and proteins can be stored in amyloid like configurations until early stages of development, particularly up to the 2-cell embryo stage. Our findings that levels of ALS peak in mature oocytes and 2-cell embryos are consistent with such a storage role for ALS.

Another interesting point is that the different distribution of ALS among various stages is consistent with a regulatory function during early embryonic development. One of the major milestones of the oocyte-embryonic transition is the zygotic gene activation (ZGA), when the development program governed by maternally inherited proteins and transcripts is replaced by a new program commanded by the expression of new genes [35]. Three main changes that occur during this period are essential to the correct embryo development. First there must be a destruction of oocyte-specific transcripts, which is followed by the replacement of maternal transcripts by zygotic transcripts and finally a complete gene expression reprogramming [36, 37]. In mice, the most critical transformation starts at the 1-cell embryo stage, when transcription from the male pronucleus begins [38]. Although the process starts at this stage, complete synchronization between transcription and translation occurs only at the 2-cell embryo stage. Therefore, genome activation actually occurs at the 2-cell embryo stage, when the zygotic nuclei are formed, and genes are rapidly expressed [39]. In the next stage of development, the 4-cell embryo stage, approximately 45% of genes are repressed, a stage known as the transcriptionally repressive state. Transcriptional repression is controlled by histone methylation [40]. These observations suggest that the appearance of ALS at earlier stages of development is not an accident. Conceivably, ALS might be involved in the zygote transcription and translation processes, since higher levels of ALS were found in the cytoplasm and nucleus of 1 and 2-cell stage embryos. From the 4-cell embryo stage, with the onset of the transcriptionally repressive state, when many genes are suppressed, levels of ALS begin to fall.

Studies have shown that the male components of the zygote, such as sperm mitochondria, the microtubule-organizing center precursors, and the cellular components from the sperm, play little role in cleavage-stage embryogenesis [41]. Therefore, early stage embryos are entirely dependent on the

oocyte molecules and organelles for their survival, until activation of the embryonic genome at cleavage-stage of development [42]. By the 4-8-cell stages, degradation of maternal RNA and proteins is nearly complete [43]. This depletion is essential for embryonic development, since mutant mouse embryos, lacking this mechanism, do not progress beyond the 4- to 8-cell stage of development [44]. In our findings, levels of ALS fall precisely from the 4-cell stage, reaching the lowest level at blastocyst stage. These findings were subsequently confirmed by electron microscopy. Eight-cell embryos have some ALS, but primarily within autophagosomes, which is the organelle responsible for cleaning proteins and transcripts that are no longer used. This is consistent with ALS having a more critical role during early rather than late embryo stages.

The process of oocyte maturation, which is closely related to the acquisition of oocyte competence, requires perfect synchronization between nuclear and cytoplasmic maturation. It involves not only the correct mechanism of homologous chromosome segregation, but also correct distribution of cytoplasmic organelles and stores of mRNA, proteins and transcription factors [45]. Intra- and intercellular molecular changes are also involved in this mechanism, such as modification of chromatin configuration, changes in mitochondrial distribution, endoplasmic reticulum reorganization, and intracellular calcium channel signaling [46]. When the peak of luteinizing hormone (LH) occurs, wholly grown oocyte in the stage of GV resume meiosis I. At this phase, considered to be of extreme importance, the process of oocyte maturation intensifies before reaching the MII stage. Coincidentally, in human immature oocytes at the GV stage, we found a higher concentration of ALS, corroborating findings by Berchowitz et al., where, in yeast, prophase I stage possesses the highest level of ALS, which controls meiosis at this point. An amyloid like protein, called Rim4, represses the translation of numerous mRNAs until the onset of meiosis II. At the MII stage, Rim4 is fully degraded, allowing the mRNA CLB3 transcription and completion of meiosis [32]. In our study, the lowest levels of ALS were found at the MII stage. Our results suggest that in humans, ALS may be involved in completion of meiosis I. Future studies should examine whether it can serve as a biomarker of oocyte quality.

A correlation between levels of ALS in follicular fluid and IVF outcome previously has been described by Duan et al. [47]. In follicular fluid of infertile women undergoing IVF, the proteolysis product of amyloid precursor protein, A β 40, was significantly higher in patients who achieved pregnancy (n=26; 50.98 %) compared to those with unsuccessful cycles (n=25; 49.02 %; $p = 0.024$). They also found a positive correlation between levels of A β 40 and number of antral follicles ($R = 0.407$, $p = 0.000$) and

oocytes retrieved ($R = 0.476$, $p = 0.000$). In the same study, granulosa cells from mice treated with amyloid substance showed better proliferation capacity and better expression of key molecules involved in steroidogenesis, such as IGF-1, FSH-receptor, and P450 aromatase, concluding that adequate level of amyloid is important for embryo development. These results are consistent with those in our study, where higher levels of ALS were found in good prognosis patients undergoing IVF, such as normal body mass index, brief controlled ovarian stimulation, AMH level between 1 and 3 ng/ml, and diagnosis of male or unexplained factor.

Another interesting finding was described by Urieli-Shoval et al. [48]. Levels of serum amyloid A(SAA), a different type of amyloid protein related to inflammatory processes, such as tissue injury, infection and neoplasia, were measured in follicular fluid aspirates and blood samples from infertile women undergoing controlled ovarian stimulation cycles. Interestingly, the group of women who presented higher concentrations of SAA had a 50% reduction in pregnancy rate and had the highest age and body mass index. All these findings suggest that levels of ALS can influence IVF results.

In regard to the mice samples, this study was cross-sectional, so we can only infer that changes in ALS across development are taking place. As the embryos used were not cultured, we can only infer the change in amyloid levels rather than track changes over time. Further, as this was a preliminary study, we have not performed functional assays to interrogate the functions of ALS in mouse oocytes and embryos.

Today, methods used to identify, and measure ALS are invasive and involve oocyte destruction, but in the future, as technology advances and the ability to screen oocytes in a noninvasive manner become possible, we will have the capacity to realistically improve the clinical outcomes of our infertility patients using the ALS levels.

No previous studies have investigated the expression and localization of ALS in mammalian oocytes and preimplantation embryos, so this work serves as the first to identify and quantify ALS in mammalian germ cells. We demonstrate, using two different methodologies, that levels of ALS vary across mouse development and peak in embryos at the 2-cell stage. We also show the presence and distribution of immunostaining for an ALS in immature and mature human oocytes and find that its level correlates with a number of good prognosis clinical characteristics. Since ALS can produce age-related cellular pathology, future studies should investigate the role of ALS in oocyte aging, and potential roles

in female infertility, characterizing the physiological and/or pathophysiological roles of ALS during early development.

CONCLUSION

Whether in natural pregnancy or assisted reproduction techniques, female fertility reaches a biological limit, and the major culprit of reproductive aging is the female gamete. A marker of oocyte quality would enhance the selection of developmentally competent embryos. Due to the biological and pathological significance of ALS, and its presence in mammalian oocytes and embryos, future studies should address its role in embryo development.

REFERENCES

1. Pastore LM, Christianson MS, Stelling J, Kearns WG, Segars JH. Reproductive ovarian testing and the alphabet soup of diagnoses: DOR, POI, POF, POR, and FOR. *J Assist Reprod Genet.* 2017.
2. Adhikari D, Zheng W, Shen Y, et al. Tsc/mTORC1 signaling in oocytes governs the quiescence and activation of primordial follicles. In: *Hum Mol Genet.* Vol 19.2010:397-410.
3. Zhang H, Liu K. Cellular and molecular regulation of the activation of mammalian primordial follicles: somatic cells initiate follicle activation in adulthood. *Hum Reprod Update.* 2015;21(6):779-786.
4. Sun X, Su Y, He Y, et al. New strategy for in vitro activation of primordial follicles with mTOR and PI3K stimulators. *Cell Cycle.* 2015;14(5):721-731.
5. Optimizing natural fertility. *Fertil Steril.* 2008;90(5 Suppl):S1-6.
6. Hornstein MD. State of the ART: Assisted Reproductive Technologies in the United States. *Reprod Sci.* 2016;23(12):1630-1633.
7. Takahashi T, Igarashi H, Amita M, Hara S, Matsuo K, Kurachi H. Molecular mechanism of poor embryo development in postovulatory aged oocytes: mini review. *J Obstet Gynaecol Res.* 2013;39(10):1431-1439.
8. Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update.* 2006;12(6):685-718.
9. Hassold T, Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet.* 2001;2(4):280-291.
10. Battaglia DE, Goodwin P, Klein NA, Soules MR. Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women. *Hum Reprod.* 1996;11(10):2217-2222.
11. Keefe DL, Niven-Fairchild T, Powell S, Buradagunta S. Mitochondrial deoxyribonucleic acid deletions in oocytes and reproductive aging in women. *Fertil Steril.* 1995;64(3):577-583.
12. Polani PE, Crolla JA. A test of the production line hypothesis of mammalian oogenesis. *Hum Genet.* 1991;88(1):64-70.

13. Liu L, Keefe DL. Nuclear origin of aging-associated meiotic defects in senescence-accelerated mice. *Biol Reprod.* 2004;71(5):1724-1729.
14. Scheffer JB, Scheffer BB, de Carvalho RF, Rodrigues J, Grynberg M, Mendez Lozano DH. Age as A Predictor of Embryo Quality Regardless of The Quantitative Ovarian Response. *Int J Fertil Steril.* 2017;11(1):40-46.
15. Shewmaker F, McGlinchey RP, Wickner RB. Structural insights into functional and pathological amyloid. *J Biol Chem.* 2011;286(19):16533-16540.
16. Riek R, Eisenberg DS. The activities of amyloids from a structural perspective. *Nature.* 2016;539(7628):227-235.
17. Li J, McQuade T, Siemer AB, et al. The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis. *Cell.* 2012;150(2):339-350.
18. Loo DT, Copani A, Pike CJ, Whittemore ER, Walencewicz AJ, Cotman CW. Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(17):7951-7955.
19. Thomas T, Thomas G, McLendon C, Sutton T, Mullan M. beta-Amyloid-mediated vasoactivity and vascular endothelial damage. *Nature.* 1996;380(6570):168-171.
20. Akiyama H, Barger S, Barnum S, et al. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2000;21(3):383-421.
21. Pinzer BR, Cacquevel M, Modregger P, et al. Imaging brain amyloid deposition using grating-based differential phase contrast tomography. *Neuroimage.* 2012;61(4):1336-1346.
22. Knowles TP, Vendruscolo M, Dobson CM. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(6):384-396.
23. Fowler DM, Koulov AV, Balch WE, Kelly JW. Functional amyloid--from bacteria to humans. *Trends Biochem Sci.* 2007;32(5):217-224.
24. Chapman MR, Robinson LS, Pinkner JS, et al. Role of Escherichia coli curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science.* 2002;295(5556):851-855.

25. Kwan AH, Winefield RD, Sunde M, et al. Structural basis for rodlet assembly in fungal hydrophobins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(10):3621-3626.
26. Fowler DM, Koulov AV, Alory-Jost C, Marks MS, Balch WE, Kelly JW. Functional amyloid formation within mammalian tissue. *PLoS Biol*. 2006;4(1):e6.
27. Maji SK, Perrin MH, Sawaya MR, et al. Functional amyloids as natural storage of peptide hormones in pituitary secretory granules. *Science*. 2009;325(5938):328-332.
28. Whelly S, Johnson S, Powell J, Borchardt C, Hastert MC, Cornwall GA. Nonpathological extracellular amyloid is present during normal epididymal sperm maturation. *PLoS One*. 2012;7(5):e36394.
29. Guyonnet B, Egge N, Cornwall GA. Functional amyloids in the mouse sperm acrosome. *Mol Cell Biol*. 2014;34(14):2624-2634.
30. Parodi J, Ochoa-de la Paz L, Miledi R, Martinez-Torres A. Functional and structural effects of amyloid-beta aggregate on *Xenopus laevis* oocytes. *Mol Cells*. 2012;34(4):349-355.
31. Egge N, Muthusubramanian A, Cornwall GA. Amyloid properties of the mouse egg zona pellucida. *PLoS One*. 2015;10(6):e0129907.
32. Berchowitz LE, Kabachinski G, Walker MR, et al. Regulated Formation of an Amyloid-like Translational Repressor Governs Gametogenesis. *Cell*. 2015;163(2):406-418.
33. Yurttas P, Morency E, Coonrod SA. Use of proteomics to identify highly abundant maternal factors that drive the egg-to-embryo transition. *Reproduction*. 2010;139(5):809-823.
34. Nothias JY, Miranda M, DePamphilis ML. Uncoupling of transcription and translation during zygotic gene activation in the mouse. *Embo j*. 1996;15(20):5715-5725.
35. Schultz RM. The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. *Hum Reprod Update*. 2002;8(4):323-331.
36. Yu J, Hecht NB, Schultz RM. Expression of MSY2 in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Biol Reprod*. 2001;65(4):1260-1270.

37. Latham KE, Garrels JI, Chang C, Solter D. Quantitative analysis of protein synthesis in mouse embryos. I. Extensive reprogramming at the one- and two-cell stages. *Development*. 1991;112(4):921-932.
38. Aoki F, Worrall DM, Schultz RM. Regulation of transcriptional activity during the first and second cell cycles in the preimplantation mouse embryo. *Dev Biol*. 1997;181(2):296-307.
39. Schultz RM. Regulation of zygotic gene activation in the mouse. *Bioessays*. 1993;15(8):531-538.
40. Ma J, Svoboda P, Schultz RM, Stein P. Regulation of zygotic gene activation in the preimplantation mouse embryo: global activation and repression of gene expression. *Biol Reprod*. 2001;64(6):1713-1721.
41. Sutovsky P, Schatten G. Paternal contributions to the mammalian zygote: fertilization after sperm-egg fusion. *Int Rev Cytol*. 2000;195:1-65.
42. Tang F, Kaneda M, O'Carroll D, et al. Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development. *Genes Dev*. 2007;21(6):644-648.
43. Li L, Zheng P, Dean J. Maternal control of early mouse development. *Development*. 2010;137(6):859-870.
44. Tsukamoto S, Kuma A, Murakami M, Kishi C, Yamamoto A, Mizushima N. Autophagy is essential for preimplantation development of mouse embryos. *Science*. 2008;321(5885):117-120.
45. Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Ferriani RA, Navarro PA. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I reversibly arrests meiosis without increasing meiotic abnormalities after in vitro maturation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2009;145(1):76-80.
46. Coticchio G, Dal Canto M, Mignini Renzini M, et al. Oocyte maturation: gamete-somatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization. *Hum Reprod Update*. 2015;21(4):427-454.

47. Duan FH, Chen SL, Chen X, et al. Follicular fluid Abeta40 concentrations may be associated with ongoing pregnancy following in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet.* 2014;31(12):1611-1620.
48. Urieli-Shoval S, Finci-Yeheskel Z, Eldar I, et al. Serum amyloid A: expression throughout human ovarian folliculogenesis and levels in follicular fluid of women undergoing controlled ovarian stimulation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(12):4970-4978.