**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA**

**IMUNOLOCALIZAÇÃO DE SUPRESSORES (FOXO3A E PTEN) E ATIVADORES (AKT
E PHOSPHO-AKT) DA TRANSIÇÃO DE FOLÍCULOS PRIMORDIAIS E PRIMÁRIOS
EM TECIDO OVARIANO HUMANO**

THAIS TIEMI HIGA

**RIBEIRÃO PRETO
2017**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA

**IMUNOLOCALIZAÇÃO DE SUPRESSORES (FOXO3A E PTEN) E ATIVADORES (AKT
E PHOSPHO-AKT) DA TRANSIÇÃO DE FOLÍCULOS PRIMORDIAIS E PRIMÁRIOS
EM TECIDO OVARIANO HUMANO**

THAIS TIEMI HIGA

Orientadora: Profa. Dra. Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva

Dissertação apresentada ao programa de pós graduação em Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em cumprimento dos requisitos para o grau de Mestre em Ciências Médicas.

Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia
Opção: Biologia da Reprodução

RIBEIRÃO PRETO

2017

Dedicatória

Ao meu querido avô **Seisuke Akamine** (*in memoriam*),
uma pessoa admirável e de um coração enorme.

Agradecimentos

Agradeço imensamente à minha orientadora, Profª Drª Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva, por toda a liberdade, confiança, abertura a novas ideias, apoio e incentivo durante a minha vida acadêmica.

Aos meus queridos pais, Irene e Pedro, que me ensinaram a sempre batalhar pelos meus objetivos, e que com tanto amor, incentivo e compreensão fizeram com que eu concluísse mais essa etapa em minha vida, amo muito vocês! Gostaria de agradecer principalmente à minha mãe, por ser minha inspiração de vida, sou o resultado de sua força e confiança.

À minha irmã, Nathalia, pela paciência e companheirismo. A toda minha família, meus amados avós, tios, tias, primos e primas que sempre me ajudaram e incentivaram a ir mais longe, obrigada pelos ensinamentos, conselhos e pelas visitas a Ribeirão Preto.

Às minhas queridas amigas de infância, Soraya, Karina, Mônica e Flávia, que são como irmãs e companheiras de vida. Obrigada por todos esses anos de amizade, pelas risadas, conversas, aventuras e por sempre me incentivarem nas minhas decisões.

Às minhas amigas de ensino médio, Cintia, Joyce, Raquel, Luísa e Adriana, vocês são muito especiais para mim, mesmo não passando tanto tempo juntas. Obrigada pelos momentos divertidos, conversas, reflexões sobre a vida e apoio sempre.

Às minhas amigas de faculdade, Lina, Larissa (Lecê), Bárbara (Wendy), Marina (Babalu), Camila (Trolha) e Luísa (Épica). Tive tanta sorte em conhecer vocês, são presentes que a vida me deu. Obrigada por ainda serem tão presentes, mesmo morando longe, pelo incentivo e companheirismo.

Às minhas amigas do laboratório, Luciene, Carol Pitanguí, Iara, Maria Aparecida (Cidinha), Lisandra, Jacira e Daia Bulgarelli por toda a ajuda na realização desse projeto. Agradeço pela amizade, por todos ensinamentos e apoio constante. Agradeço em especial a Cidinha por realizar todas as leituras das lâminas comigo, pela paciência e incentivo.

À todos os amigos da pós-graduação Aline, Bruna, Caroline Mantovani, Catiele, Cris Libardi, Cris Padovan, Daia Pedroso, Daniel, Fernanda, Gislaine,

Juliana Meola, Liliane, Marina, Michele, Thalita, Valéria, Vanessa e Viviane. Obrigada pelos momentos de descontração, pelas risadas no corredor e por proporcionarem um ambiente de trabalho tão leve e divertido.

À Prof^a Leandra Náira Zambelli Ramalho pela ajuda e colaboração na realização desse trabalho e o pessoal do Laboratório de Patologia Celular e Molecular do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP. Em especial ao doutorando Renan Pereira pela grande ajuda no início desse trabalho. Agradeço pela sua disponibilidade, paciência e por ter sido tão querido comigo. Agradeço também a técnica Deisy Silva pela ajuda na confecção das lâminas de imunohistoquímica.

Ao pessoal do Laboratório de Marcadores e Sinalização Celular no Câncer do Departamento de Análises Clínicas, Toxicologia e Ciência dos Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP e a Profa Andréia Machado Leopoldino por abrir as portas de seu laboratório. Em especial a doutoranda Tálita Pollyanna pela disponibilidade e auxílio nos testes de imunohistoquímica e imunofluorescência.

À todos que compõem o Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP (docentes, médicos contratados, pesquisadores, técnicos e secretários), pela contribuição na minha formação profissional.

E à todos que trabalham no Setor de Reprodução Humana, os funcionários (embriologistas, enfermeiras e técnicas), agradeço os ensinamentos e a boa convivência. Em especial a amiga Marilda pelas conversas e momentos de descontração.

Às pacientes que proporcionaram material para esse estudo, que mesmo sem saber, ajudaram imensamente.

À CAPES e FAEPA pelo apoio financeiro imprescindível na realização desse trabalho.

À banca examinadora, Prof^a Leandra Náira Zambelli Ramalho e Prof^a Kele Amaral Alves pela disponibilidade em participar desse momento importante do meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Epígrafe

“Foi o tempo que dedicastes à tua rosa que a fez tão importante.”

Antoine de Saint-Exupéry

Resumo

Mulheres com risco de falência ovariana prematura, assim como aquelas diagnosticadas com câncer que desejam preservar sua fertilidade, têm como opção a criopreservação do tecido ovariano. Esse tecido seria destinado, dependendo do caso, ao reimplante posterior ou para o cultivo *in vitro* de folículos ovarianos isolados do tecido criopreservado. Nesse contexto, os folículos primordiais são uma população importante tanto por serem mais resistentes ao processo de criopreservação, como por representarem cerca de 90% da população total folicular. Porém o uso destes folículos para procedimentos de Reprodução Assistida ainda é bastante limitado, pois os mecanismos responsáveis pelo seu processo de ativação ainda não são completamente conhecidos. A via de sinalização fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) foi recentemente identificada como determinante para o controle da ativação dos folículos primordiais. Portanto o objetivo deste estudo foi identificar e localizar os fatores componentes da via: supressores (FOXO3a e PTEN) e ativadores (Akt e Phospho-Akt). O que ofereceria uma valiosa ferramenta para elucidar os mecanismos envolvidos na ativação do pool de reserva folicular e permitiria o desenvolvimento de sistemas de cultivo folicular que atuassem diretamente nestes mecanismos. Sendo assim, foi realizado um estudo transversal com amostras de tecido ovariano humano, que foram submetidas à reação imunohistoquímica dos fatores previamente citados. Foram incluídas na casuística 40 pacientes, com idade média de 27,7 anos $\pm$ 7,26. Foi realizada uma análise comparativa da expressão dessas proteínas entre os folículos primordiais e primários. Foi encontrada diferença significativa para a proteína Akt, ($p < 0,05$) em que os folículos primordiais (oócito e células da granulosa) manifestaram mais expressão da proteína Akt em comparação aos folículos primários. Também foi encontrada diferença significativa para a proteína phospho-Akt, porém apenas nas células da granulosa, em que houve maior expressão em folículos primordiais comparados aos primários. Enquanto ambos os estágios tiveram marcação negativa para o PTEN e FOXO3a na maioria dos folículos analisados. Sendo assim, neste estudo não foi possível identificar dentre as proteínas escolhidas uma que tivesse expressão claramente característica de uma ou de outra fase folicular, não sendo possível inferir que a atividade de qualquer uma das proteínas fosse estritamente ligada à ativação dos folículo primordiais.

Abstract

Women at risk of premature ovarian failure, as well as those diagnosed with cancer who wish to preserve their fertility, have, as option, the ovarian tissue cryopreservation. This tissue would be destined, depending on the case, to posterior reimplantation, or for the *in vitro* culture of ovarian follicles isolated from the cryopreserved tissue. In this context, primordial follicles are an important population of cells. As they are more resistant to the cryopreservation process and they represent about 90% of the whole follicular population. However, the use of these follicles for Assisted Reproduction procedures is still quite limited, since the mechanisms responsible for its activation process are not fully understood. The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) signaling pathway has recently been identified as determinant for the control of primordial follicle activation. Therefore, the aim of this study was to identify and localize the components of this pathway: suppressors (FOXO3a and PTEN) and activators (Akt and phospho-Akt). This would offer a valuable tool to elucidate the mechanisms involved in the activation of the follicular reserve pool and would allow the development of *in vitro* culture protocols that would act directly in these mechanisms. Thus, a cross-sectional study with samples of human ovarian tissue was performed. These samples were submitted to the immunohistochemical reaction of the previously mentioned factors. Forty patients were included in the study, with a mean age of 27.7 ± 7.26 . A comparative analysis of the expression of these proteins was performed between primordial and primary follicles. A significant difference was found for the Akt protein ($p < 0.05$) in which the primordial follicles (oocyte and granulosa cells) showed more Akt expression than primary follicles. Another significant difference was found for the phosphor-Akt protein, but only for the granulosa cells, where there was a greater expression in primordial follicles compared to the primary ones. While both stages were negatively stained for PTEN and FOXO3a in most of the follicles analyzed. Thus, in this study it was not possible to identify among the selected proteins one that had clearly characteristic expression of one or the other follicular phase, and it was not possible to infer that the activity of any of the proteins was strictly linked to the activation of the primordial follicles.

Lista de Abreviaturas

Akt – Proteína quinase B
BMP – Proteína morfogenética do osso
CEP – Comitê de Ética em Pesquisa
DAB – Diaminobenzidina
DGO – Departamento de Ginecologia e Obstetrícia
FMRP – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FOXO1 – Fator de transcrição forkhead box 1
FOXO3a – Fator de transcrição forkhead box O3a
FOXO4 – Fator de transcrição forkhead box 4
FSH – Hormônio folículo-estimulante
GDF-9 – Fator de diferenciação e crescimento-9
H&E – Hematoxilina e eosina
HCFMRP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
IHQ – imunohistoquímica
Kit ligand – Kit ligante
LIF – Fator inibidor de leucemia
mTORC1 – Alvo da rapamicina em mamíferos complexo 1
mTORC2 – Alvo da rapamicina em mamíferos complexo 2
PDK1 – Proteína quinase dependente de 3-fosfatidilinositol
Phospho-Akt – Proteína Akt fosforilada
PI3K – Fosfatidilinositol 3-quinase
PIP2 – Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PIP3 – Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PTEN – Homólogo da fosfatase e da tensina deletado no cromossomo 10
rpS6 – Proteína ribossomal S6
RPTK – Receptor tirosina-quinase
S6K1 – Proteína ribossomal p70 S6 quinase 1
SERPAT – Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Tsc1 – Complexo de esclerose tuberosa 1 ou hamartina
Tsc2 – Complexo de esclerose tuberosa 2 ou tuberina

Lista de Figuras

Figura 1. Foliculogênese ovariana e fatores envolvidos na inibição, estimulação e manutenção do pool de reserva folicular

Figura 2. Ilustração da via de sinalização PI3K (fosfatidilinositol 3-quinase)

Figura 3. Regulação da ativação de folículos primordiais

Figura 4. Fluxograma de triagem das amostras

Figura 5. Folículos ovarianos corados em H&E

Figura 6. Fotomicrografias dos controles positivos

Figura 7. Expressão das proteínas Akt, phospho-Akt, PTEN e FOXO3a nos folículos ovarianos

Figura 8. Expressão das proteínas Akt, phospho-Akt, PTEN e FOXO3a nos compartimentos foliculares (oócito e células da granulosa)

Lista de Tabelas

Tabela 1. Análise de imunomarcção dos oócitos inclusos em folículos primordiais e primários em relação às proteínas Akt, phospho-Akt, PTEN e FOXO3a

Tabela 2. Análise de imunomarcção das células da granulosa de folículos primordiais e primários em relação às proteínas Akt, phospho-Akt, PTEN e FOXO3a

Tabela 3. Análise de imunomarcção da proteína Akt

Tabela 4. Análise de imunomarcção da proteína phospho-Akt

Tabela 5. Análise de imunomarcção da proteína PTEN

Tabela 6. Análise de imunomarcção da proteína FOXO3a

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1. O câncer e a qualidade de vida	21
1.2. Preservação da fertilidade feminina	22
1.3. Ativação dos folículos primordiais	25
2. JUSTIFICATIVA	30
3. OBJETIVOS	32
3.1. Objetivo geral	33
3.2. Objetivos específicos	33
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS	34
4.1. Desenho do estudo	35
4.2. Triagem das amostras	36
4.3. Avaliação da classificação folicular	37
4.4. Reação imunohistoquímica	39
4.5. Análise das lâminas por microscopia óptica	41
4.6. Análise estatística	41
5. ASPECTOS ÉTICOS	42
6. RESULTADOS	44
7. DISCUSSÃO	50
8. CONCLUSÕES	57
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
10. ANEXOS	71
10.1. Anexo I	72
10.2. Anexo II	74
10.3. Anexo III	76
10.4. Anexo IV	78
10.5. Artigo científico	81

1.Introdução

1.1. O câncer e os efeitos na qualidade de vida

O câncer é reconhecido mundialmente como um dos maiores problemas de saúde pública. Em 2012 aproximadamente 14 milhões de pessoas foram diagnosticadas com câncer em todo o mundo (World Health Organisation, 2015). Apesar de muitas vezes ser considerada uma doença relacionada ao envelhecimento, sua incidência tem aumentado entre crianças e adolescentes (Woodruff, 2015; Siegel; Miller; Jemal, 2016).

Felizmente durante as últimas três décadas é notável o aumento da taxa de cura e da expectativa de vida dos pacientes devido ao aperfeiçoamento no diagnóstico e à eficácia de novas terapias (Siegel; Miller; Jemal, 2016; Bénard et al., 2016; Jensen et al., 2017). Chegando a 75% das crianças e adolescentes apropriadamente tratados que se tornarão sobreviventes em longo prazo (Armenian et al., 2013).

No entanto, o tratamento que consiste em quimioterapia e/ou radioterapia pode comprometer a função do sistema reprodutivo e levar à infertilidade (Kim; Jeon, 2012; Sonigo et al. 2015). Esses agentes causam depleção dos folículos ovarianos, fibrose estromal e/ou lesão vascular, conduzindo à insuficiência e/ou falência ovariana prematura (Morgan et al., 2012; Roness; Kalich-Philosoph; Meirow, 2014).

Sendo assim, os efeitos a longo prazo na qualidade de vida devem ser discutidos antes do tratamento e as opções disponíveis para aquelas que desejam preservar a sua fertilidade devem ser apresentadas (Dittrich et al., 2015; Ataman et al., 2015). Atualmente, 6% das mulheres em idade reprodutiva são sobreviventes do câncer (Silber, 2016).

Porém é grande a proporção de pacientes jovens que não são adequadamente orientadas, e menos ainda as que são encaminhadas a preservação de fertilidade. Além do mais, falta de uniformidade em relação ao aconselhamento e falta de padrões de referência levam a variabilidade na incorporação desses procedimentos (De Vos; Smits; Woodruff, 2014; Terenziani et al., 2014; Font-Gonzalez et al., 2016).

1.2. Preservação da fertilidade feminina

Nesse contexto, várias estratégias têm sido desenvolvidas nos últimos anos para permitir que estas pacientes possam ter filhos usando os seus próprios gametas. Atualmente a criopreservação de oócitos maduros e embriões após estimulação hormonal ovariana seguida de Fertilização *in vitro* são os procedimentos mais bem estabelecidos e os únicos endossados pela American Society for Reproductive Medicine (The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2013; Donnez; Dolmans, 2015a). Porém nenhuma dessas opções é possível para mulheres com tumores hormônio sensíveis ou para meninas pré púberes (Woodruff, 2015).

Para estas pacientes, a criopreservação de tecido ovariano é uma opção, embora seja atualmente indicada para aquelas que têm um elevado risco de falência ovariana prematura após o tratamento do câncer (Woodruff, 2015; Zapardiel et al., 2016). Algumas das vantagens dessa estratégia são: não requerer atraso do início do tratamento e/ou estimulação ovariana, possibilitar o armazenamento de um grande número de folículos primordiais resistentes ao processo de congelamento, restaurar a função endócrina ovariana após o descongelamento e autotransplante e assim fornecer a possibilidade de concepção natural (Rodríguez-Iglesias et al., 2015; Oktay et al., 2016; Wallace; Kelsey; Anderson, 2016).

O procedimento consiste na remoção cirúrgica de tecido ovariano previamente ao tratamento gonadotóxico através de uma videolaparoscopia, e realização de seu congelamento. Assim, após o tratamento contra o câncer e liberação do oncologista para a gravidez, esse tecido é então descongelado e autotransplantado, ortotopicamente ou heterotopicamente (Kim; Jeon, 2012; Donnez; Dolmans; 2014). No transplante ortotópico, fragmentos corticais ovarianos são transplantados de volta para locais na cavidade pélvica, como o ovário remanescente, fossa ovariana ou ligamento largo do útero. Enquanto no transplante heterotópico, esses fragmentos são transplantados subcutaneamente em vários sítios, tais como o antebraço e parede abdominal (Salama; Woodruff, 2015).

Embora a criopreservação de tecido ovariano ainda seja considerada experimental, até a presente data aproximadamente 86 nascidos vivos já foram reportados e 9 gestações estão em curso a partir dessa técnica (Jensen et al., 2016). A grande maioria foi resultante de congelamento lento, e decorreu de transplante ortotópico, que oferece um ambiente mais natural ao tecido (Donnez; Dolmans, 2015b; Harada; Osuga, 2016). Assim, de acordo com a opinião de diversos especialistas na área, há evidências suficientes para a técnica não ser mais considerada como experimental (Donnez et al., 2013; Donnez; Dolmans, 2015b; Oktay et al., 2016; Meirow et al., 2016).

Porém uma grande limitação da criopreservação de tecido ovariano para reimplante posterior é a possibilidade da presença de células tumorais no tecido criopreservado, como micro metástases não identificáveis e que podem ser reimplantadas na paciente levando à recidiva da doença (The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2014; Chambon et al., 2016). Enquanto muitos tipos de tumores nunca metastisam para o ovário, há outros que apresentam risco elevado, como é o caso da leucemia. Portanto, mesmo que o risco seja muito baixo se realizado em mulheres em remissão completa da doença e não terem sido reportados casos do tipo na literatura, recomenda-se que o autotransplante de ovário seja desencorajado nesses casos (Vanacker et al., 2012; Dolmans et al., 2013; Jensen et al., 2016).

Diante dessa situação, o cultivo *in vitro* de folículos ovarianos isolados desse tecido criopreservado tem como objetivo recuperar gametas para fins reprodutivos, sem esse risco (Smitz et al., 2010; Telfer; Zelinski, 2013; Harada; Osuga, 2016). O isolamento e cultivo de folículos teoricamente poderiam utilizar desde folículos primordiais (Laronda et al., 2014; Sadeghnia et al., 2016) até pré antrais (Amorim et al., 2009; Xiao et al., 2015; Yin et al., 2016), com consequente maturação dos oócitos para posterior fertilização *in vitro*. Por isso há a necessidade de se desenvolver sistemas de cultivo de folículos que possam utilizar de forma eficiente todas as classes de folículos ovarianos (Telfer; Zelinski, 2013).

As técnicas atualmente descritas para cultivo de folículos bastante imaturos trazem resultados promissores para os folículos secundários (Shea; Woodruff;

Shikanov, 2014), inclusive com nascimento de prole fértil em ratos (Xu et al., 2006). E recentemente utilizando uma estratégia de cultivo *in vitro* em duas fases, folículos secundários humanos puderam se desenvolver para o estágio antral, e pela primeira vez, produziram oócitos em metáfase II meioticamente competentes (Xiao et al., 2015). Entretanto, é reduzido o número de folículos secundários que são recuperados do tecido criopreservado, o que limita a eficiência dessa tecnologia na prática clínica, reduzindo a capacidade de aproveitamento do tecido criopreservado (Telfer, McLaughlin, 2012).

Nesse contexto, os folículos primordiais são uma população importante, por serem mais resistentes ao processo de criopreservação, devido ao seu menor tamanho e baixa taxa metabólica (Jin et al., 2010; Salama; Woodruff, 2015). Além de representarem a classe folicular mais abundante, cerca de 90%, constituindo o chamado pool de reserva folicular (Hornick et al., 2012; Camboni et al., 2013), o qual é mantido sob um estado de latência. Os folículos primordiais são ciclicamente ativados e deixam a reserva ovariana, dando início ao processo de desenvolvimento (Gougeon, 2011; Kim, 2012).

No entanto, folículos primordiais isolados do tecido ovariano não sobrevivem em cultivo. Para que a integridade da unidade folicular primordial seja mantida, eles devem ser cultivados *in situ*, ou seja, em fragmentos de tecido cortical ovariano. Recentemente foi constatado que esse tipo de cultivo proporciona a sobrevivência e crescimento de folículos primordiais e primários, com aparente diferenciação em folículos secundários após 6 semanas. Porém, apesar dos achados de que o córtex ovariano oferece suporte para a foliculogênese *in vitro*, foi observada degeneração folicular durante o tempo de cultivo. O que sugere a necessidade de condições de cultivo que otimizem a ativação folicular e assim diminua o tempo de cultivo (Laronda et al., 2014).

Além disso, devido à abundância dos folículos primordiais no tecido cortical ovariano, a primeira consideração de um sistema de crescimento *in vitro* deve ser aprimorar o cultivo e ativação desses folículos, favorecendo o desenvolvimento folicular precoce, para subsequente obtenção de oócitos maduros (Telfer; Zelinski, 2013; Shea; Woodruff; Shikanov, 2014).

1.3. Ativação dos folículos primordiais

Os mecanismos responsáveis pelo processo de ativação dos folículos primordiais, também denominado recrutamento folicular inicial, ainda não são completamente conhecidos (Gougeon, 2011; Shea, Woodruff, Shikanov, 2014). Porém, sabe-se que esse processo exige uma combinação de fatores de inibição, estimulação, e de manutenção (Nelson; Telfer; Anderson, 2013) (Figura 1). Por enquanto, o crescimento *in vitro* completo desde o estágio folicular primordial até o nascimento da prole só foi alcançado em ratos (O'Brien; Pendola; Eppig, 2003; Mochida, 2013).

Figura 1. Foliculogênese ovariana e fatores envolvidos na inibição, estimulação e manutenção do pool de reserva folicular.

Fonte: Oktem O, Urman B. Understanding follicle growth in vivo. Hum Reprod, 2010.

Legenda: BMP (proteína morfogenética do osso); FOXO3a, fator de transcrição; GDF-9 (fator de diferenciação e crescimento-9); Kit ligand (Kit ligante); LIF (fator inibidor de leucemia); mTORC1 (alvo da rapamicina em mamíferos complexo 1) PTEN, gene supressor tumoral, (homólogo da fosfatase e da tensina deletado no cromossomo 10); Tsc1(complexo de esclerose tuberosa 1 ou hamartina).

Recentemente, a via de sinalização fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) (Figura 2) foi identificada como mecanismo chave no processo de manutenção e ativação dos folículos primordiais (Reddy et al., 2008; Kim, 2012; Zhang; Liu, 2015). É relatada como uma via clássica de sinalização, constituída por quinases, fosfatases e

fatores de transcrição. Essas moléculas estabelecem cascatas de sinalização intracelulares fundamentais para vários processos fisiológicos como regulação de proliferação, sobrevivência, migração e metabolismo celular. Porém a sua hiperativação ou desregulação contribui para processos patológicos, como no câncer e diabetes (Cantley, 2002; Liu et al., 2006).

A interação entre as células somáticas e germinativas no ovário serve como o evento molecular inicial que desencadeia a ativação da via PI3K (Figura 3) e consequentemente, dos folículos primordiais (Zhang et al., 2014; Monniaux, 2016). Muitos fatores de crescimento ativam essa via nos oócitos, porém o mais importante e estudado é o Kit ligante (KL) e seu receptor tirosina-quinase (RPTK) c-kit (Liu et al., 2006; Hsueh et al., 2015). O KL é uma citocina produzida e secretada pelas células da granulosa dos folículos, e exerce sinais parácrinos via estimulação do seu receptor c-kit, que se encontra expresso na superfície dos oócitos (em repouso e em crescimento) (Gougeon, 2011; Tuck et al., 2015). Nos estágios iniciais dos folículos, em que receptores de FSH (hormônio folículo estimulante) ainda não são expressos, o crescimento folicular é dependente da sinalização do KL com o c-kit (Albertini; Barrett, 2003; Thomas; Vanderhyden, 2006; Liu et al., 2006).

Portanto, a ligação de KL ao seu receptor c-kit ativa a via de sinalização PI3K, presente nos oócitos e conduz à ativação dos folículos em repouso (Liu et al., 2006; Gougeon, 2011; Kawamura; Kawamura; Hsueh, 2016). Em seguida, PI3K é recrutado para a membrana plasmática e fosforila a posição 3'-OH do anel inositol do fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2) para produzir fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) na membrana intracelular. O PIP3 age como um mensageiro secundário ao recrutar e ativar proteínas tais como as serina/treonina quinases: PDK1 (proteína quinase dependente de 3-fosfatidilinositol) e Akt, também chamada de proteína quinase B. Akt é a mais relevante das proteínas recrutadas e o maior efetor da via PI3K (Cantley, 2002; Liu et al., 2006; Klemperer; Myers; Cantley, 2013).

Enquanto isso, o PTEN (homólogo da fosfatase e da tensina deletado no cromossomo 10), desfosforila e converte PIP3 de volta para PIP2, regulando negativamente a função de PI3K, e consequentemente de Akt (Carracedo; Pandolfi, 2008; Hsueh et al., 2015). Para ser ativada, a proteína Akt é fosforilada (phospho-

Akt) em dois locais diferentes pelas proteínas PDK1 e mTORC2 (alvo da rapamicina em mamíferos complexo 2) (Cecconi et al., 2012).

Figura 2. Ilustração da via de sinalização PI3K (fosfatidilinositol 3-quinase)

Fonte: Kim JY. Control of ovarian primordial follicle activation. Clin Exp Reprod Med, 2012.

Legenda: Moléculas que mantêm a latência dos folículos primordiais são PTEN, FOXO3a, p27 e TSC1/TSC2. Moléculas que mantêm a sobrevivência dos folículos primordiais incluem PI3K, PDK1, mTORC1, S6K1 e rpS6. RPTK (receptor de tirosina quinase); PTEN (homólogo da fosfatase e da tensina deletado no cromossomo 10); PIP2 (fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato); PIP3, (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato); PI3K, fosfatidilinositol 3-quinase; PDK1 (proteína quinase dependente de 3-fosfatidilinositol); Akt (proteína quinase B); FOXO3a (forkhead box O3a); mTORC1, C2 (alvo da rapamicina em mamíferos complexo 1,2); TSC1 / 2, (complexo de esclerose tuberosa 1,2; ou hamartina e tuberina respectivamente); S6K1 (proteína ribossomal p70 S6 quinase 1); rpS6, (proteína ribossomal S6).

Como uma molécula-chave da via PI3K, Akt em sua forma ativa promove sobrevivência, proliferação e crescimento celular, fosforilando e inativando uma série de alvos *downstream* “negativos” (Reddy; Zheng; Liu, 2010). Nesse contexto estão

os fatores de transcrição FOXO, pertencentes à família *forkhead box* que incluem FOXO1, FOXO3a e FOXO4. Estas moléculas são caracterizadas pela presença de sítios altamente conservados para a fosforilação por Akt. Logo, Akt ao fosforilar os fatores FOXO, promove a extrusão desses fatores do núcleo para o citoplasma, reprimindo suas funções de transcrição (Adhikari; Liu, 2009).

Mais especificamente, como o fator de transcrição FOXO3a nuclear nos oócitos é essencial para a manutenção da dormência dos folículos primordiais, a sua exportação nuclear leva à ativação desses folículos (Kim et al., 2015). Além disso, FOXO3a está principalmente expresso no núcleo de oócitos incluídos em folículos primordiais e primários iniciais, enquanto sua expressão é *down*-regulada dramaticamente em oócitos de folículos primários e em crescimento (Liu et al., 2007).

Figura 3. Regulação da ativação de folículos primordiais

Fonte: Williams CJ, Erickson GF. Morphology and Physiology of the Ovary. Female Reproductive Endocrinology, 2012.

Legenda: A ativação de folículos primordiais é impulsionada pelas ações coletivas dos próprios folículos primordiais e de células mesenquimais ao redor, folículos circundantes e fatores endócrinos.

Em síntese, na presença de fatores de crescimento, o receptor tirosina quinase (RPTK) ativa a via PI3K, seguida pela fosforilação de Akt, que se torna ativa e fosforila FOXO3a, promovendo sua extrusão nuclear, que reprime sua função de transcrição, o que desencadeia a ativação dos folículos primordiais (Cecconi et al., 2012; Kim, 2012; McLaughlin et al., 2014). Assim, uma vez ativada, a via PI3K é submetida à ação moduladora de inibidores, como o PTEN, que podem evitar a exaustão prematura da reserva ovariana em resposta a uma estimulação prolongada ou muito forte (Gougeon, 2011; Hsueh et al., 2015). Apesar dessas descobertas recentes, a maioria derivada de estudos em animais, os mecanismos exatos de como um número limitado de folículos primordiais são ativados dentre um grande número de folículos dormentes ainda são desconhecidos (Kawamura; Kawamura; Hsueh, 2016).

2. Justificativa

Considerando a necessidade de se aprimorar o cultivo de folículos primordiais e que o sucesso desta tecnologia depende da capacidade de ativação destes folículos; a identificação e localização de fatores supressores e ativadores da transição de folículos primordiais para primários em tecido ovariano humano oferecem uma valiosa ferramenta para elucidar os mecanismos envolvidos na ativação do pool de folículos primordiais. Com a finalidade de futuramente utilizarmos esses fatores no desenvolvimento de protocolos de ativação folicular *in situ*, seguido do cultivo de folículos isolados já ativados (secundários). Todo este esforço visa o aprimoramento das técnicas de cultivo de folículo em geral, com aplicação prática direta nas técnicas de reprodução assistida convencionais e nos programas de preservação de fertilidade feminina.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Este projeto se propôs a identificar e localizar fatores supressores e ativadores da transição de folículos primordiais para primários em tecido ovariano humano.

3.2. Objetivos Específicos

Foram objetivos específicos deste estudo:

a) Identificação e localização de substâncias supressoras da transição de folículos primordiais para primários: FOXO3a e PTEN em tecido ovariano humano através de marcação imunohistoquímica.

b) Identificação e localização de substâncias ativadoras da transição de folículos primordiais para primários: Akt, phospho-Akt em tecido ovariano humano através de marcação imunohistoquímica.

4. Casuística e Métodos

4.1. Desenho do Estudo

Foi realizado um estudo transversal com amostras de tecido ovariano humano para identificação de fatores relacionados à transição do pool de folículos primordiais em primários. Para isso a marcação imunohistoquímica de fatores pré selecionados por levantamento bibliográfico de estudos em outras espécies animais (supressores e ativadores da transição primordial-primário supra citados) foi analisada comparativamente entre folículos primordiais e primários. Aqueles marcados diferencialmente em um dos estágios foliculares foram considerados como fatores provavelmente envolvidos neste processo e serão testados em estudos futuros.

Um levantamento de amostras de tecido ovariano humano emblocadas em parafina foi realizado no banco de amostras do Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP (SERPAT). Estas amostras são provenientes de pacientes submetidas à cirurgias com indicação clínica de ooforectomia total ou parcial. Foram selecionadas todas as amostras recebidas entre o período de 01/01/2005 até 14/05/2015. Foram excluídas amostras de pacientes com menos de 15 anos (considerando que a idade máxima para o desencadeamento da puberdade fisiológica é de 14 anos) e mais de 40 anos (devido à baixa densidade folicular esperada a partir dessa idade), e fragmentos pequenos que inviabilizariam a contagem dos folículos ovarianos. Além disso, foram incluídas apenas amostras que continham no mínimo um folículo primordial e um folículo primário na análise previa feita em lâmina corada pela hematoxilina e eosina (H&E). Foi, portanto, uma amostra de conveniência, definindo-se o N amostral de acordo com o total de amostras colhidas no determinado período dentro dos critérios estabelecidos acima.

A pesquisa de banco de dados, identificação dos blocos de parafina, análise das lâminas coradas em H&E e a confecção das lâminas para a análise imunohistoquímica foram realizadas no Laboratório de Patologia Celular e Molecular do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Já a leitura das lâminas imunocoradas foi realizada no laboratório de Ginecologia e Obstetrícia, setor de Reprodução Humana do

Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

4.2. Triagem das amostras

Inicialmente foi gerada uma lista com 355 biópsias de pacientes entre 15 e 40 anos em que o material encaminhado para o SERPAT continha o termo “ovário”. A partir dessa lista foram consultados todos os laudos anatomopatológicos completos para identificar as biópsias que podiam conter tecido ovariano passível de análise. Ao final dessa triagem, restaram 77 amostras, já emblocadas em parafina. Para cada uma dessas amostras o SERPAT também tinha estocado a lâmina corada em H&E equivalente. Solicitamos essas lâminas e as analisamos através do microscópio óptico, aonde foram selecionadas somente as amostras que contivessem ao menos um folículo primordial e um folículo primário (critério de inclusão).

Dessas 77 amostras, 35 foram descartadas por não preencherem os critérios mínimos de inclusão, restando 42 que foram então submetidas ao protocolo de marcação por imunohistoquímica. Ao final da análise das lâminas imunocoradas, 2 amostras foram excluídas por estarem com material prejudicado (o material se desprende da lâmina ou dobrou), que inviabilizou a análise imunohistoquímica. Portanto o N amostral final foi de 40 pacientes. A seguir está apresentado um fluxograma de como foi realizada a triagem das amostras (Figura 4).

Figura 4. Fluxograma de triagem das amostras

Legenda: H&E - hematoxilina e eosina; IHQ - imunohistoquímica; SERPAT - Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

4.3. Avaliação da classificação folicular

Como já foi citado, ao final da triagem dos laudos anatomopatológicos, restaram 77 amostras de tecido ovariano humano inclusas em parafina, sendo que para cada uma dessas amostras o SERPAT também tinha disponível a lâmina corada em H&E equivalente. Essas lâminas foram analisadas em microscópio óptico com aumento de 100 ou 200 vezes para avaliação da classificação folicular. Selecionamos somente as amostras que apresentaram ao menos um folículo primordial e um folículo primário.

A classificação folicular tanto para as lâminas coradas em H&E, quanto para as lâminas imunocoradas foi realizada baseada na histologia clássica, de acordo com a definição de Gougeon (1996):

- a. Folículos primordiais: uma única camada de células da granulosa planas
- b. Folículos primários: uma única camada de células da granulosa cuboides

Porém folículos em fase de transição, que apresentavam ao menos duas células da granulosa cuboides (Nilsson et al., 2010) foram classificados como folículos primários (Figura 5).

Figura 5. Folículos ovarianos corados em H&E.

Legenda: Em A e B: folículos primordiais. Em C: folículo em transição (classificado como folículo primário). E em D: folículo primário. Os oócitos estão indicados com um asterisco (*) e as células da granulosa estão indicadas com as setas. Aumentos de 1000x.

Após a análise das lâminas, 35 amostras foram descartadas por não atingirem os critérios de inclusão (ou seja, não continham ao menos um folículo primordial e um folículo primário) restando 42 amostras que foram submetidas ao protocolo de imunohistoquímica.

4.4. Reação Imunohistoquímica

As 42 amostras de tecido ovariano incluídas em parafina foram submetidas à cortes de três micrômetros e montadas em lâminas silanizadas. Para a detecção dos marcadores foram utilizados os anticorpos primários da *Cell Signaling Technology* (Danvers, MA, USA): Akt (pan) (40D4), Phospho-Akt (Ser473) (D9E) XP®, PTEN (138G6) e FoxO3a (D19A7), todos produzidos em coelho, exceto o Akt, produzido em rato. Todos os anticorpos são monoclonais e foram utilizados na concentração de 1:200. O kit de revelação utilizado foi o *REVEAL Polyvalent HRP-DAB Detection System*, da *Spring Bioscience* (Pleasanton, CA, USA). Como controles positivos foram utilizadas amostras de carcinoma de mama para todos os marcadores.

As reações de imunohistoquímica iniciaram-se com a desparafinização das lâminas em dois banhos de xilol por 5 minutos cada. A seguir, os cortes foram reidratados em uma série descendente de álcool (um banho em cada concentração de álcool: 95%, 90%, 75% e 70%) e imersos em água corrente. Após essa etapa, foi realizada a recuperação antigênica, em que as lâminas foram incubadas em tampão citrato (pH 6,0), pré aquecido de 95 a 99°C, por 40 minutos em panela a vapor. Logo após, as lâminas foram resfriadas por 15 minutos em temperatura ambiente e lavadas em água destilada e tampão PBS (pH 7,0).

A partir dessa etapa, todos os procedimentos foram realizados em câmara úmida e foram utilizados os reagentes do kit *REVEAL Polyvalent HRP-DAB Detection System*. Primeiramente foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com a aplicação do *Hydrogen Peroxide Block* sobre os cortes e incubação por 15 minutos, com posterior lavagem em tampão PBS por 5 minutos. O bloqueio de proteínas foi realizado em seguida com a incubação do *Protein Block* sobre os cortes por 10 minutos. Após a retirada do excesso da solução de bloqueio, sem realizar a lavagem, o anticorpo primário (três foram produzidos em coelho e um foi produzido em rato) foi colocado sobre os cortes e incubado por uma hora. Após a incubação, os cortes foram lavados com o tampão de lavagem PBS.

O sistema de revelação foi realizado em duas partes, primeiro os cortes foram incubados com o *Complement* (anticorpo secundário de coelho anti-rato) por 10 minutos e logo em seguida com o *HRP Conjugate* (anticorpo secundário de cabra

anti-coelho conjugado ao HRP) por 15 minutos, logo após os cortes foram lavados com o mesmo tampão de lavagem citado anteriormente. Em seguida os cortes foram cobertos com diaminobenzidina (DAB) (20ul de *DAB Chromogen* diluído em 1mL de *DAB Substrate*) por 5 minutos. Após a revelação, os cortes foram lavados em água corrente, contra corados com Hematoxilina e lavados em água amoniacal. Por fim, foram desidratados em uma série de concentrações de álcool e xilol. E as lâminas foram montadas, cobertas por lamínula com auxílio de *Permount* (Fisher Scientific; Pittsburgh, PA, USA). Na figura a seguir estão as fotomicrografias das lâminas de controle positivo para cada proteína, expressas em tecido de carcinoma de mama.

Figura 6. Fotomicrografias dos controles positivos

Legenda: Em A verifica-se o controle positivo para o marcador AKT. Em B para o marcador phospho-AKT. Em C para o marcador PTEN. E em D para o marcador FOXO3a. Todos realizados em tecido de carcinoma de mama. Aumentos de 100x.

4.5. Análise das lâminas por microscopia óptica

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico *Axio Scope A1* acoplado à câmera digital *AxioCam MRc*, que possibilitou a captura de imagens através de um computador equipado com o *software AxioVision 4.8* (Carl Zeiss; Oberkochen, Germany). Foram examinados todos os campos do tecido e assim identificados os folículos primordiais e primários. Todos os folículos com o oócito e as células da granulosa íntegros foram contados e cada compartimento (oócito e granulosa) foi analisado separadamente. A imunomarcação foi classificada como negativa ou positiva, considerando como positiva todas as intensidades de marcação.

Ao final da análise das lâminas, 2 amostras foram excluídas por apresentarem material prejudicado. Portanto o N amostral final foi de 40 pacientes. Todas as análises (leituras) da marcação imunohistoquímica foram realizadas por dois pesquisadores, sendo Higa TT (pesquisador principal) e Vasconcelos MAC (Maria Aparecida Carneiro Vasconcelos, colaboradora técnica).

4.6. Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada comparando-se a marcação imunohistoquímica para as diferentes proteínas (Akt, phospho-Akt, PTEN e FOXO3a) entre os folículos primordiais e primários, utilizando o teste de Qui-quadrado. Cada compartimento folicular (oócito e células da granulosa) foi analisado separadamente. Para esta análise foram somados todos os folículos de todas as pacientes para a composição dos grupos “primordial” e “primário”. O teste de Qui-quadrado foi utilizado para testar a hipótese H_0 de que não existe diferença entre a intensidade de marcação e os grupos (folículo primordial e primário).

Os dados foram analisados no programa SAS versão 9.3. O nível crítico foi fixado em 5% ($p < 0,05$) para se admitir uma diferença de valores estatisticamente significativa.

5. Aspectos éticos

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Pesquisa do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (DGO – FMRP – USP) (Projeto nº 547/2016). E, subsequentemente, também aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP (CEP – HCFMRP – USP) (Ofício nº 1917/2016). Além disso, enviamos ao CEP uma carta para solicitação de dispensa da aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, que também foi aprovada (Processo HCRP nº7201/2016). Visto que utilizaríamos casos do banco de amostras do Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP (SERPAT), os quais contém amostras de tecido produto de biopsias ou cirurgias advindas de procedimentos assistenciais e não obtidos exclusivamente para fins de pesquisa. Evidentemente, o sigilo quanto à identificação das pacientes foi preservado.

6. *Resultados*

Foram incluídas na casuística 40 pacientes, com idade média de 27,7 anos $\pm$ 7,26 (mínima: 15 anos e máxima: 40 anos). Para cada uma das pacientes foi realizada a análise de imunomarcção das 4 proteínas Akt, phospho-Akt, PTEN e FOXO3 nos compartimentos foliculares (oócitos e células da granulosa) dos folículos primordiais e primários (Figura 7). As tabelas finais completas da análise de imunomarcção por paciente são: Tabela 3 (Akt), Tabela 4 (phospho-Akt), Tabela 5 (PTEN) e Tabela 6 (FOXO3a), disponíveis nos anexos.

Foram contados no total 6023 folículos primordiais e 999 folículos primários em 160 lâminas, levando em consideração que de cada amostra de paciente foram feitos 4 cortes consecutivos, um para cada proteína. No entanto vale ressaltar que a maioria dos folículos considerados como primários estavam em fase de transição, de acordo com a definição de Nilsson et al. (2010).

Figura 7. Expressão das proteínas Akt, phospho-Akt, PTEN e FOXO3a nos folículos ovarianos

Legenda: Em A, B, C e D estão os folículos primordiais organizados ascendentemente em gradação de intensidade; em A = marcação negativa (-) e em B, C e D = marcação positiva (+). E em A', B', C' e D' estão os folículos primários também organizados ascendentemente em gradação de intensidade; em A' = marcação negativa (-) e em B', C' e D' = marcação positiva (+). Em A está uma fotomicrografia de uma lâmina do marcador phospho-AKT. Em B do marcador FOXO3a. Em A' e B' do marcador PTEN. E em C, D, C' e D' do marcador AKT. Os oócitos estão indicados com um asterisco (*) e as células da granulosa estão indicadas com as setas. Aumentos de 1000x.

Nas tabelas a seguir notamos o resultado da análise de imunomarcção dos oócitos (Tabela 1) e células da granulosa (Tabela 2) entre os grupos (folículo primordial e folículo primário) em relação às 4 proteínas (Akt, phospho-Akt, PTEN e FOXO3a), somando-se todos os folículos ovarianos das 40 pacientes.

Tabela 1. Análise de imunomarcção dos oócitos incluídos em folículos primordiais e primários em relação às proteínas Akt, phospho-Akt, PTEN e FOXO3a

Proteína	Estágio Folicular (n)	Marcação dos Oócitos n / %		P valor
		NEGATIVA	POSITIVA	
Akt	Primordial (1629)	590 36,22	1039 63,78 ^A	0,0012
	Primário (259)	121 46,72	138 53,28 ^A	
p-Akt	Primordial (1363)	1213 88,99	150 11,01	0,3475
	Primário (265)	241 90,94	24 9,06	
PTEN	Primordial (1538)	1291 83,94	247 16,06	0,9445
	Primário (234)	196 83,76	38 16,24	
FOXO3a	Primordial (1493)	1378 92,30	115 7,70	0,0659
	Primário (241)	214 88,80	27 11,20	

Legenda: Akt (proteína quinase B); p-AKT (phospho-Akt: proteína quinase B fosforilada); PTEN (homólogo da fosfatase e da tensina deletado no cromossomo 10) e FOXO3a (forkhead box O3a). Letras iguais representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Observamos que apenas houve diferença estatisticamente significativa de imunomarcção em relação ao marcador Akt ($p=0,0012$). Em que os oócitos de

folículos primordiais mostraram-se mais marcados positivamente comparados aos oócitos de folículos primários.

Tabela 2. Análise de imunomarcacão das células da granulosa de folículos primordiais e primários em relação às proteínas Akt, phospho-Akt, PTEN e FOXO3a

Proteína	Estágio Folicular (n)	Marcação das céls. da granulosa n / %		P valor
		NEGATIVA	POSITIVA	
Akt	Primordial (1629)	591 36,28	1038 63,72 ^B	0,0005
	Primário (259)	123 47,49	136 52,51 ^B	
p-Akt	Primordial (1363)	1214 89,07	149 10,93 ^C	0,0421
	Primário (265)	247 93,21	18 6,79 ^C	
PTEN	Primordial (1538)	1291 83,94	247 16,06	0,2705
	Primário (234)	203 86,75	31 13,25	
FOXO3a	Primordial (1493)	1377 92,23	116 7,77	0,1128
	Primário (241)	215 89,21	26 10,79	

Legenda: Akt (proteína quinase B); p-AKT (phospho-Akt: proteína quinase B fosforilada); PTEN (homólogo da fosfatase e da tensina deletado no cromossomo 10) e FOXO3a (forkhead box O3a). Letras iguais representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Dentre a maioria dos folículos observados o padrão de marcação dos oócitos se mostrou muito similar à marcação das células da granulosa adjacentes. Assim, como podemos observar na Tabela 2, em relação às células da granulosa também houve diferença na marcação de Akt ($p = 0,0005$), em que houve maior expressão nos folículos primordiais comparados aos folículos primários. Mas também houve uma

diferença na marcação de phospho-Akt ($p=0,0421$), onde houve maior expressão da proteína nas células da granulosa de folículos primordiais. Na figura 8 a seguir estão apresentados os gráficos dos resultados.

Figura 8. Expressão das proteínas Akt, phospho-Akt, PTEN e FOXO3a nos compartimentos foliculares (oócito e células da granulosa)

Legenda: os valores indicados se referem à porcentagem de expressão das proteínas, conforme indicadas na Tabela 1 e 2. Letras iguais representam diferenças estatísticas ($p<0,05$); Letra A: $p=0,0012$; Letra B: $p=0,0005$; Letra C: $p=0,0421$.

7. Discussão

A imunolocalização de fatores relacionados à transição de folículos primordiais para primários vem sendo estudada por outros pesquisadores em ovinos (Froment et al., 2005), suínos (Meng et al., 2007; Ding et al., 2010), murinos (Tarnawa et al., 2013) e em humanos (Goto et al., 2007). Além disso, alguns desses fatores já foram testados em sistemas de cultivo *in vitro*, na tentativa de desencadear a ativação dos folículos primordiais (Li et al., 2010; Kawamura et al. 2013) a partir da estimulação ou inibição dos fatores envolvidos.

No presente estudo verificamos a expressão de proteínas componentes da via de sinalização PI3K, que foi recentemente identificada como determinante para o controle da ativação dos folículos primordiais (Reddy et al., 2008, Zhang; Liu, 2015), dentre elas estão: Akt, Akt fosforilado (phospho-Akt), PTEN e FOXO3a. Foi realizada uma análise comparativa da expressão dessas proteínas entre os folículos primordiais e os folículos primários de 40 pacientes. Encontramos diferença estatisticamente significativa para a proteína Akt, em que os folículos primordiais (oócito/ $p=0,0012$ e células da granulosa/ $p=0,0005$) manifestaram maior expressão desta proteína em comparação aos folículos primários. Também foi encontrada diferença significativa na marcação de phospho-Akt ($p=0,0421$), porém apenas nas células da granulosa, em que houve maior expressão em folículos primordiais comparados aos primários. Enquanto não houve diferença no padrão de expressão para os outros fatores nessa transição folicular específica, ambos os estágios tiveram marcação negativa para o PTEN e FOXO3a na maioria dos folículos analisados.

A maior marcação de Akt verificada neste estudo nos oócitos e células da granulosa de folículos primordiais em comparação aos folículos primários diferiu daquela descrita por Goto et al. também em humanos, aonde houve expressão constante de Akt nos oócitos e células da granulosa em folículos primordiais e folículos em cada fase de desenvolvimento. No trabalho do grupo de Goto, em relação aos oócitos, a expressão de Akt foi moderada em todas as fases foliculares. Já em relação as células da granulosa, a intensidade de marcação foi moderada nos folículos primordiais e primários, e se tornou forte em folículos secundários/antrais e pré ovulatórios (Goto et al., 2007). A presença de Akt em folículos em estágio avançado de desenvolvimento provavelmente está relacionada com outras funções

desta proteína ao longo da foliculogênese. Em nosso estudo, apesar da maior expressão de Akt ser observada nos primordiais, esta proteína esteve presente em mais de 50% dos folículos primários, reforçando um provável papel em estágios mais tardios do desenvolvimento folicular. Com relação ao Akt nos estágios iniciais do crescimento folicular o estudo de Goto et al. é descritivo, e não propõe uma comparação na marcação desta proteína nos diferentes estágios foliculares, não permitindo inferir a maior ou menor expressão de Akt em um dos estágios estudados.

A phospho-Akt é a forma ativa da proteína Akt. A primeira hipótese deste estudo era de que folículos em processo de ativação apresentassem maior expressão desta proteína ativada, entretanto, este não foi o achado deste estudo. Apesar de termos encontrado maior expressão de Akt nos folículos primordiais comparados aos folículos primários, não foi encontrada a relação inversa para a proteína phospho-Akt, como era esperado. Uma vez que a proteína phospho-Akt representaria sinal de atividade folicular, esperaríamos que fosse mais expressa nos folículos primários. Surpreendentemente as células da granulosa de folículos primordiais apresentaram maior expressão, ainda que baixa, da proteína Akt fosforilada em comparação aos folículos primários. Vale ressaltar que na classificação dos folículos primários, a presença de duas células da granulosa em formato cubóide já era considerado critério para classificar o folículo como primário, embora saibamos que este estágio é hoje considerado como de transição. Neste sentido, a grande maioria dos folículos considerados primários analisados foi composta por folículos de transição, o que poderia justificar não termos encontrado marcação mais evidente da phospho-Akt nestes folículos, em princípio, ativados.

Goto et al., também verificaram que, em relação à expressão de PTEN, houve marcação fraca/ocasional em todos os estágios foliculares, porém a marcação moderada somente esteve presente nos oócitos de folículos primordiais. Por outro lado no que se refere as células da granulosa, não foi encontrada marcação em folículos primordiais e houve marcação fraca/ocasional em folículos primários e secundários/antrais. Enquanto que as células da granulosa de folículos pré ovulatórios expressaram níveis mais elevados (marcação moderada). A análise também mostrou uma relação inversa entre a marcação de PTEN e phospho-Akt nas

células da granulosa. Na medida em que os folículos cresceram, a marcação de PTEN se tornou mais forte, enquanto a marcação de phospho-Akt, que era moderada/forte nos estágios iniciais, se tornou mais fraca (Goto et al., 2007). Essa mesma relação também foi encontrada por Froment et al. (2005) em células da granulosa de ovinos.

Os dados de Goto et al. corroboram a marcação negativa e fraca de PTEN que encontramos tanto nos oócitos, como nas células da granulosa de folículos primordiais e primários. Uma limitação do estudo foi não termos avaliado os folículos em estágio de desenvolvimento avançado, o que ocorreu por questões restritivas da amostra, o número de folículos secundários e antrais foi insuficiente para permitir a análise estatística dos dados. Poderíamos especular que a relação inversa encontrada tanto por eles, quanto pelo grupo de Froment et al. de que a medida que os folículos se desenvolvem, a expressão de PTEN nas células da granulosa se torna mais forte, enquanto a expressão de phospho-Akt se torna mais fraca indica que esses folículos que já estão em fase de desenvolvimento vão controlando a ativação dos folículos primordiais adjacentes. Não sendo, portanto, um processo individualizado, em que o folículo primordial que está dormente produza o próprio fator modulador PTEN que autorregula sua ativação.

Quanto à expressão de FOXO3a, em estudo realizado por Ding et al. em folículos ovarianos de suínos, a análise imunohistoquímica revelou expressão da proteína em oócitos e células da granulosa de folículos primordiais, primários e secundários com marcação fraca nas células da granulosa e forte nos oócitos. Além disso, foi observado um aumento gradativo da marcação de FOXO3a nas células da granulosa a medida em que os folículos se desenvolviam (Ding et al, 2010). Nesse contexto, um estudo conduzido por Tarnawa et al. analisou a expressão de FOXO1 e FOXO3a em diversas espécies de mamíferos, dentre elas roedores, caninos, felinos, bovinos, suínos, símios e humanos, e surpreendentemente FOXO3a não foi detectado nos oócitos de folículos primordiais de nenhuma espécie, exceto de roedores. Não foi encontrada marcação nuclear nos oócitos de folículos primordiais, nem translocação núcleo-citoplasmática nos folículos primários. Enquanto a expressão de FOXO1 nas células da granulosa manteve-se conservada em todas as

espécies. E o que os autores sugerem é que FOXO3a não é unicamente requerido para a manutenção do estado de latência dos folículos primordiais em espécies não-roedoras, e que outros FOXOs, particularmente FOXO1 pode contribuir para a manutenção da dormência dos oócitos primordiais de uma maneira funcionalmente redundante (Tarnawa et al. 2013). Este achado poderia explicar o porquê de não termos encontrado praticamente nenhuma marcação de FOXO3a nos oócitos e células da granulosa dos folículos primordiais.

A ideia inicial do presente estudo era encontrar um dos marcadores com uma diferença de expressão mais veemente entre os folículos primordiais e primários, de maneira que pudéssemos propor a estimulação ou silenciamento do mesmo em um sistema de cultivo *in vitro*, com o objetivo de aumentar a ativação de folículos primordiais em amostras criopreservadas de tecido ovariano. Entretanto, não foi o que verificamos, uma vez que praticamente não houve diferença entre eles e alguns nem mesmo marcaram. Sugerimos que a não marcação não significa necessariamente ausência de função, podendo haver vias alternativas envolvidas. Tanto que estes marcadores foram estudados e suas funções foram comprovadas por outros autores (Castrillon et al., 2003; John et al., 2007; Reddy et al, 2008), além de já terem sido testados através do uso de seus inibidores ou ativadores em sistemas de cultivo *in vitro* (Li et al., 2010; Kawamura et al., 2013).

Estudos mostram que camundongos deficientes em FOXO3a sofrem uma ativação global espontânea de todos os seus folículos primordiais em poucos dias de vida, levando à perda prematura de todos os folículos e consequente falência ovariana em 15 semanas (Castrillon et al., 2003; John et al., 2007). Além disso, fenótipo similar foi detectado em ratos com deleção oócito específica do PTEN. Foi observada ativação de todo o pool de folículos primordiais na puberdade, o que resultou em depleção folicular prematura (Reddy et al., 2008).

No que se refere aos trabalhos que testaram alguns desses fatores, sejam eles inibidores ou ativadores dos mesmos, em sistemas de cultivo *in vitro* na tentativa de desencadear a ativação dos folículos primordiais, alguns obtiveram relativo sucesso. Um estudo demonstrou cultivo em curto prazo de ovários murinos com um inibidor de PTEN e um fosfopeptídeo estimulador de PI3K, para aumentar a extrusão

nuclear de FOXO3a em oócitos primordiais, através do aumento da atividade de Akt. Após alotransplante dos ovários (ativados) sob cápsula renal de ratas hospedeiras ovariectomizadas, folículos primordiais se desenvolveram para a fase pré ovulatória. Oócitos maduros puderam ser recuperados para realização de fertilização *in vitro* e transferência de embriões, seguido pelo nascimento de prole saudável com fertilidade comprovada (Li et al., 2010).

Já o grupo de Kawamura et al. (2013) recentemente combinou as técnicas de cultivo com ativadores de PI3K com fragmentação de ovário para estimular tanto a ativação dos folículos primordiais, como o crescimento dos folículos secundários de ovários de pacientes com falência ovariana prematura. Os ovários foram removidos em cirurgia laparoscópica e logo vitrificados. Depois de descongelados, esse tecido foi fragmentado e submetido a cultivo *in vitro* com ativadores de PI3K por dois dias. Após o cultivo, foi realizado um transplante autólogo abaixo da serosa das tubas uterinas. O crescimento folicular foi monitorado semanalmente e foi observado em 50% das pacientes com folículos residuais. Em alguns casos, folículos pré ovulatórios foram detectados dentro de algumas semanas ou alguns meses após o transplante, sugerindo o crescimento de folículos secundários residuais em resposta à fragmentação do tecido ovariano. Em contraste, alguns folículos pré ovulatórios foram detectados após 6 meses ou mais, provavelmente devido à ativação de folículos primordiais. Após a fertilização *in vitro* e transferência de embriões, três gestações foram obtidas. Apesar de um aborto, dois bebês saudáveis nasceram através dessa técnica. Porém nesse último estudo não há como comprovar que o protocolo de ativação folicular *in vitro* foi exclusivamente responsável pelas gravidezes, como os próprios autores reconhecem (Kawamura et al., 2013).

Neste sentido, não podemos deixar de citar as limitações do estudo. Sugerimos que a técnica de imunohistoquímica possa não ser ideal para analisar um processo dinâmico que é a sinalização celular em meio à ativação dos folículos primordiais. Porém o tecido ovariano humano é de difícil obtenção e a alternativa foi utilizar as amostras de tecido emblocadas em parafina provenientes do banco de amostras do SERPAT. Sendo assim não foi possível realizar outras análises como imunofluorescência ou *Western blotting* em razão de ser um tecido parafinado.

Tentamos realizar marcação imunofluorescente, porém não obtivemos sucesso na desparafinização dos cortes, o que inviabilizou a utilização da técnica. Outra limitação seria o número reduzido de folículos em estágios tardios, o que nos impossibilitou fazer uma análise completa da atuação das proteínas no processo de foliculogênese.

8. Conclusões

1. Ambos os estágios foliculares (primordial e primário) apresentam expressão da proteína Akt em mais de 50% dos folículos analisados em relação aos oócitos e células da granulosa.
2. Quando comparados quanto à marcação de Akt, os oócitos e células da granulosa de folículos primordiais apresentam mais expressão desta proteína do que os de folículos primários.
3. Em relação à expressão de phospho-Akt, ambos os estágios foliculares apresentam predominância de ausência de marcação (aproximadamente 90%) nos folículos analisados, tanto nos oócitos, quanto nas células da granulosa.
4. Quanto à marcação de phospho-Akt, as células da granulosa de folículos primordiais apresentam mais expressão, ainda que limitada, desta proteína quando comparadas às de folículos primários.
5. Não houve diferença de expressão de PTEN e FOXO3a entre as populações foliculares. Ambas apresentaram marcação negativa na maioria dos folículos analisados.
6. Neste estudo não foi possível identificar, dentre as proteínas escolhidas, uma que tivesse expressão claramente característica de uma ou de outra fase folicular, não sendo possível inferir que a atividade de qualquer uma das proteínas fosse estritamente ligada à ativação do folículo primordial.

9. *Referências Bibliográficas*

Adhikari D, Liu K. Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Endocr Rev.* 2009 Aug;30(5):438-64.

Albertini DF, Barrett SL. Oocyte-somatic cell communication. *Reprod Suppl.* 2003;61:49-54.

Amorim CA, Van Langendonckt A, David A, Dolmans MM, Donnez J. Survival of human pre-antral follicles after cryopreservation of ovarian tissue, follicular isolation and in vitro culture in a calcium alginate matrix. *Hum Reprod.* 2009 Jan;24(1):92-9.

Armenian SH, Landier W, Hudson MM, Robison LL, Bhatia S; COG Survivorship and Outcomes Committee. Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: survivorship and outcomes. *Pediatr Blood Cancer.* 2013 Jun;60(6):1063-8.

Ataman LM, Rodrigues JK, Marinho RM, Caetano JP, Chehin MB, Alves da Motta EL, Serafini P, Suzuki N, Furui T, Takae S, Sugishita Y, Morishige KI, Almeida-Santos T, Melo C, Buzaglo K, Irwin K, Wallace WH, Anderson RA, Mitchell RT, Telfer EE, Adiga SK, Anazodo A, Stern C, Sullivan E, Jayasinghe Y, Orme L, Cohn R, McLachlan R, Deans R, Agresta F, Gerstl B, Ledger WL, Robker RL, de Meneses E Silva JM, Silva LH, Lunardi FO, Lee JR, Suh CS, De Vos M, Van Moer E, Stoop D, Vloeberghs V, Smits J, Tournaye H, Wildt L, Winkler-Crepaz K, Andersen CY, Smith BM, Smith K, Woodruff TK. Creating a Global Community of Practice for Oncofertility. *J Glob Oncol.* 2016 Apr;2(2):83-96.

Bénard J, Duros S, El Hachem H, Sonigo C, Sifer C, Grynberg M. Freezing oocytes or embryos after controlled ovarian hyperstimulation in cancer patients: the state of the art. *Future Oncol.* 2016 Jul;12(14):1731-41.

Camboni A, Van Langendonckt A, Donnez J, Vanacker J, Dolmans MM, Amorim CA. Alginate beads as a tool to handle, cryopreserve and culture isolated human primordial/primary follicles. *Cryobiology.* 2013 Aug;67(1):64-9.

Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*. 2002 May 31; 296(5573):1655-7.

Carracedo A, Pandolfi PP. The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene*. 2008 Sep 18;27(41):5527-41.

Castrillon DH, Miao L, Kollipara R, Horner JW, DePinho RA. Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science*. 2003 Jul 11;301(5630):215-8.

Cecconi S, Mauro A, Cellini V, Patacchiola F. The role of Akt signalling in the mammalian ovary. *Int J Dev Biol*. 2012;56(10-12):809-17.

Chambon F, Brugnon F, Grèze V, Grémeau AS, Pereira B, Déchelotte P, Kanold J. Cryopreservation of ovarian tissue in pediatric patients undergoing sterilizing chemotherapy. *Hum Fertil (Camb)*. 2016 Apr;19(1):23-31.

De Vos M, Smits J, Woodruff TK. Fertility preservation in women with cancer. *Lancet*. 2014 Oct 4;384(9950):1302-10.

Ding W, Wang W, Zhou B, Zhang W, Huang P, Shi F, Taya K.J Formation of primordial follicles and immunolocalization of PTEN, PKB and FOXO3A proteins in the ovaries of fetal and neonatal pigs. *Reprod Dev*. 2010 Feb;56(1):162-8. Epub 2009 Dec 9.

Dittrich , Hackl J, Lotz L, Hoffmann I, Beckmann MW. Pregnancies and live births after 20 transplantations of cryopreserved ovarian tissue in a single center. *Fertil Steril*. 2015 Feb;103(2):462-8.

Dolmans MM, Luyckx V, Donnez J, Andersen CY, Greve T. Risk of transferring malignant cells with transplanted frozen-thawed ovarian tissue. *Fertil Steril*. 2013 May;99(6):1514-22.

Donnez J, Dolmans MM, Pellicer A, Diaz-Garcia C, Sanchez Serrano M, Schmidt KT, Ernst E, Luyckx V, Andersen CY. Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: a review of 60 cases of reimplantation. *Fertil Steril*. 2013 May;99(6):1503-13.

Donnez J, Dolmans MM. Ovarian cortex transplantation: 60 reported live births brings the success and worldwide expansion of the technique towards routine clinical practice. *J Assist Reprod Genet*. 2015b Aug;32(8):1167-70.

Donnez J, Dolmans MM. Ovarian tissue freezing: current status. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2015a Jun;27(3):222-30.

Donnez J, Dolmans MM. Transplantation of ovarian tissue. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2014 Nov;28(8):1188-97.

Font-Gonzalez A, Mulder RL, Loeffen EA, Byrne J, van Dulmen-den Broeder E, van den Heuvel-Eibrink MM, Hudson MM, Kenney LB, Levine JM, Tissing WJ, van de Wetering MD, Kremer LC; PanCareLIFE Consortium. Fertility preservation in children, adolescents, and young adults with cancer: Quality of clinical practice guidelines and variations in recommendations. *Cancer*. 2016 May 13.

Froment P, Bontoux M, Pisselet C, Monget P, Dupont J. PTEN expression in ovine granulosa cells increases during terminal follicular growth. *FEBS Lett*. 2005 Apr 25;579(11):2376-82.

Goto M, Iwase A, Ando H, Kurotsuchi S, Harata T, Kikkawa F. PTEN and Akt expression during growth of human ovarian follicles. *J Assist Reprod Genet.* 2007 Nov;24(11):541-6.

Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 1996;17:121–55.

Gougeon A. Regulation of resting follicle activation. *Gynecol Obstet Fertil.* 2011 Sep;39(9):511-3.

Harada M, Osuga Y. Where are oncofertility and fertility preservation treatments heading in 2016? *Future Oncol.* 2016 Jun 22.

Hornick JE, Duncan FE, Shea LD, Woodruff TK. Isolated primordial follicles require a rigid physical environment to survive and grow in vitro. *Hum Reprod.* 2012 Jun;27(6):1801-10.

Hsueh AJ, Kawamura K, Cheng Y, Fauser BC. Intraovarian control of early folliculogenesis. *Endocr Rev.* 2015 Feb;36(1):1-24.

Jensen AK, Macklon KT, Fedder J, Ernst E, Humaidan P, Andersen CY. 86 successful births and 9 ongoing pregnancies worldwide in women transplanted with frozen-thawed ovarian tissue: focus on birth and perinatal outcome in 40 of these children. *J Assist Reprod Genet.* 2017 Mar;34(3):325-336.

Jensen AK, Rechnitzer C, Macklon KT, Ifversen MR, Birkebæk N, Clausen N, Sørensen K, Fedder J, Ernst E, Andersen CY. Cryopreservation of ovarian tissue for fertility preservation in a large cohort of young girls: focus on pubertal development. *Hum Reprod.* 2017 Jan;32(1):154-164. Epub 2016 Nov 5.

Jin S, Lei L, Shea LD, Zelinski MB, Stouffer RL, Woodruff TK. Markers of growth and development in primate primordial follicles are preserved after slow cryopreservation. *Fertil Steril*. 2010 May 15;93(8):2627-32.

John GB, Shirley LJ, Gallardo TD, Castrillon DH. Specificity of the requirement for Foxo3 in primordial follicle activation. *Reproduction*. 2007 May;133(5):855-63.

Kawamura K, Cheng Y, Suzuki N, Deguchi M, Sato Y, Takae S, Ho CH, Kawamura N, Tamura M, Hashimoto S, Sugishita Y, Morimoto Y, Hosoi Y, Yoshioka N, Ishizuka B, Hsueh. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *AJ.Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Oct 22;110(43):17474-9.

Kawamura K, Kawamura N, Hsueh AJ. . Activation of dormant follicles: a new treatment for premature ovarian failure? *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2016 Jun;28(3):217-22.

Kim CH, Jeon GH. Fertility preservation in female cancer patients. *ISRN Obstet Gynecol*. 2012; 2012:807302.

Kim SY, Ebbert K, Cordeiro MH, Romero M, Zhu J, Serna VA, Whelan KA, Woodruff TK, Kurita T. Cell autonomous phosphoinositide 3-kinase activation in oocytes disrupts normal ovarian function through promoting survival and overgrowth of ovarian follicles. *Endocrinology*. 2015 Apr;156(4):1464-76.

Kim JY. Control of ovarian primordial follicle activation. *Clin Exp Reprod Med*. 2012 Mar;39(1):10-4.

Klempner SJ, Myers AP, Cantley LC. What a tangled web we weave: emerging resistance mechanisms to inhibition of the phosphoinositide 3-kinase pathway. *Cancer Discov*. 2013 Dec;3(12):1345-54.

Laronda MM, Duncan FE, Hornick JE, Xu M, Pahnke JE, Whelan KA, Shea LD, Woodruff TK. Alginate encapsulation supports the growth and differentiation of human primordial follicles within ovarian cortical tissue. *J Assist Reprod Genet.* 2014 Aug;31(8):1013-28.

Li J, Kawamura K, Cheng Y, Liu S, Klein C, Liu S, Duan EK, Hsueh AJ. Activation of dormant ovarian follicles to generate mature eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Jun 1;107(22):10280-4.

Liu K, Rajareddy S, Liu L, Jagarlamudi K, Boman K, Selstam G, Reddy P. Control of mammalian oocyte growth and early follicular development by the oocyte PI3 kinase pathway: new roles for an old timer. *Dev Biol.* 2006 Nov 1; 299(1):1-11.

Liu L, Rajareddy S, Reddy P, Du C, Jagarlamudi K, Shen Y, Gunnarsson D, Selstam G, Boman K, Liu K. Infertility caused by retardation of follicular development in mice with oocyte-specific expression of Foxo3a. *Development.* 2007 Jan;134(1):199-209.

McLaughlin M, Kinnell HL, Anderson RA, Telfer EE Inhibition of phosphatase and tensin homologue (PTEN) in human ovary in vitro results in increased activation of primordial follicles but compromises development of growing follicles..*Mol Hum Reprod.* 2014 Aug;20(8):736-44.

Meirow D, Ra'anani H, Shapira M, Brenghausen M, Derech Chaim S, Aviel-Ronen S, Amariglio N, Schiff E, Orvieto R, Dor J. Transplantations of frozen thawed ovarian tissue demonstrate high reproductive performance and the need to revise restrictive criteria. *Fertil Steril.* 2016 May 12. pii: S0015-0282(16)61128-7.

Meng C, Shi F, Zhou Z, Huang R, Liu G, Watanabe G, Taya K.J Cellular Localization of Inhibin alpha-subunit, PKB/Akt and FoxO3a proteins in the ovaries of minipigs. *Reprod Dev.* 2007 Apr;53(2):229-36. Epub 2006 Nov 29.

Mochida N, Akatani-Hasegawa A, Saka K, Ogino M, Hosoda Y, Wada R, Sawai H, Shibahara H Live births from isolated primary/early secondary follicles following a multistep culture without organ culture in mice. *Reproduction*. 2013 Jun 14;146(1):37-47.

Monniaux D. Driving folliculogenesis by the oocyte-somatic cell dialog: Lessons from genetic models. *Theriogenology*. 2016 Jul 1;86(1):41-53.

Morgan S, Anderson RA, Gourley C, Wallace WH, Spears N. How do chemotherapeutic agents damage the ovary? *Hum Reprod Update*. 2012 Sep-Oct;18(5):525-35.

Nelson SM, Telfer EE, Anderson RA. The ageing ovary and uterus: new biological insights. *Hum Reprod Update*. 2013 Jan-Feb;19(1):67-83.

Nilsson EE, Savenkova MI, Schindler R, Zhang B, Schadt EE, Skinner MK. Gene bionetwork analysis of ovarian primordial follicle development. *PLoS One*. 2010 Jul 16;5(7):e11637.

O'Brien MJ, Pendola JK, Eppig JJ. A revised protocol for in vitro development of mouse from primordial follicles dramatically improves their developmental competence. *Biol Reprod*. 2003 May;68(5):1682-6.

Oktay K, Bedoschi G, Pacheco F, Turan V, Emirdar V. First pregnancies, live birth, and in vitro fertilization outcomes after transplantation of frozen-banked ovarian tissue with a human extracellular matrix scaffold using robot-assisted minimally invasive surgery. *Am J Obstet Gynecol*. 2016 Jan;214(1):94.e1-9.

Oktem O, Urman B. Understanding follicle growth in vivo. *Hum Reprod*. 2010 Dec;25(12):2944-54.

Reddy P, Liu L, Adhikari D, Jagarlamudi K, Rajareddy S, Shen Y, Du C, Tang W, Hämäläinen T, Peng SL, Lan ZJ, Cooney AJ, Huhtaniemi I, Liu K. Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. *Science*. 2008 Feb 1;319(5863):611-3.

Reddy P, Zheng W, Liu K. Mechanisms maintaining the dormancy and survival of mammalian primordial follicles. *Trends Endocrinol Metab*. 2010 Feb;21(2):96-103.

Rodríguez-Iglesias B, Novella-Maestre E, Herraiz S, Díaz-García C, Pellicer N, Pellicer A. New methods to improve the safety assessment of cryopreserved ovarian tissue for fertility preservation in breast cancer patients. *Fertil Steril*. 2015 Dec;104(6):1493-502.e1-2.

Roness H, Kalich-Philosoph L, Meirow D. Prevention of chemotherapy-induced ovarian damage: possible roles for hormonal and non-hormonal attenuating agents. *Hum Reprod Update*. 2014 Sep-Oct;20(5):759-74.

Sadeghnia S, Akhondi MM, Hossein G, Mobini S, Hosseini L, Naderi MM, Boroujeni SB, Sarvari A, Behzadi B, Shirazi A. Development of sheep primordial follicles encapsulated in alginate or in ovarian tissue in fresh and vitrified samples. *Cryobiology*. 2016 Apr;72(2):100-5.

Salama M, Woodruff TK. New advances in ovarian autotransplantation to restore fertility in cancer patients. *Cancer Metastasis Rev*. 2015 Dec;34(4):807-22.

Shea LD, Woodruff TK, Shikanov A. Bioengineering the ovarian follicle microenvironment. *Annu Rev Biomed Eng*. 2014 Jul 11;16:29-52.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin*. 2016 Jan - Feb;66(1):7-30.

Silber S. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: scientific implications. *J Assist Reprod Genet.* 2016 Dec;33(12):1595-1603. Epub 2016 Oct 8.

Smits J, Dolmans MM, Donnez J, Fortune JE, Hovatta O, Jewgenow K, Picton HM, Plancha C, Shea LD, Stouffer RL, Telfer EE, Woodruff TK, Zelinski MB. Current achievements and future research directions in ovarian tissue culture, in vitro follicle development and transplantation: implications for fertility preservation. *Hum Reprod Update.* 2010 Jul-Aug;16(4):395-414.

Sonigo C, Sermondade N, Benard J, Benoit A, Shore J, Sifer C, Grynberg M. The past, present and future of fertility preservation in cancer patients. *Future Oncol.* 2015 Sep 11.

Tarnawa ED, Baker MD, Aloisio GM, Carr BR, Castrillon DH. Gonadal expression of Foxo1, but not Foxo3, is conserved in diverse Mammalian species. *Biol Reprod.* 2013 Apr 25;88(4):103.

Telfer EE, McLaughlin M. Strategies to support human oocyte development in vitro. *Int J Dev Biol.* 2012;56(10-12):901-7.

Telfer EE, Zelinski MB. Ovarian follicle culture: advances and challenges for human and nonhuman primates. *Fertil Steril.* 2013 May;99(6):1523-33.

Terenziani M, Spinelli M, Jankovic M, Bardi E, Hjorth L, Haupt R, Michel G, Byrne J; PanCare Network. Practices of pediatric oncology and hematology providers regarding fertility issues: a European survey. *Pediatr Blood Cancer.* 2014 Nov;61(11):2054-8.

The Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Fertility preservation in patients undergoing gonadotoxic therapy or gonadectomy: a committee opinion. *Fertil Steril.* 2013 Nov;100(5):1214-23.

The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Ovarian tissue cryopreservation: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2014 Mar 28. pii: S0015-0282(14)00205-2.

Thomas FH, Vanderhyden BC. Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth. *Reprod Biol Endocrinol*. 2006 Apr 12;4:19.

Tuck AR, Robker RL, Norman RJ, Tilley WD, Hickey TE. Expression and localisation of c-kit and KITL in the adult human ovary. *J Ovarian Res*. 2015 May 26;8:31.

Vanacker J, Luyckx V, Dolmans MM, Des Rieux A, Jaeger J, Van Langendonck A, Donnez J, Amorim CA. Transplantation of an alginate-matrigel matrix containing isolated ovarian cells: first step in developing a biodegradable scaffold to transplant isolated preantral follicles and ovarian cells. *Biomaterials*. 2012 Sep;33(26):6079-85.

Wallace WH, Kelsey TW, Anderson RA. Fertility preservation in pre-pubertal girls with cancer: the role of ovarian tissue cryopreservation. *Fertil Steril*. 2016 Jan;105(1):6-12.

Williams CJ, Erickson GF. *Morphology and Physiology of the Ovary*. Female Reproductive Endocrinology, 2012

Woodruff TK. Oncofertility: a grand collaboration between reproductive medicine and oncology. *Reproduction*. 2015 Sep;150(3):S1-10.

World Health Organisation 2015, Cancer, Fact Sheet N°297, updated February 2015. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 20 de maio de 2016.

Xiao S, Zhang J, Romero MM, Smith KN, Shea LD, Woodruff TK. In vitro follicle growth supports human oocyte meiotic maturation. *Sci Rep*. 2015 Nov 27;5:17323.

Xu M, Kreeger PK, Shea LD, Woodruff TK. Tissue-engineered follicles produce live, fertile offspring. *Tissue Eng.* 2006; 12(10):2739-46.

Yin H, Kristensen SG, Jiang H, Rasmussen A, Andersen CY. Survival and growth of isolated pre-antral follicles from human ovarian medulla tissue during long-term 3D culture. *Hum Reprod.* 2016 Jul;31(7):1531-9.

Zapardiel I, Cruz M, Diestro MD, Requena A, Garcia-Velasco JA. Assisted reproductive techniques after fertility-sparing treatments in gynaecological cancers. *Hum Reprod Update.* 2016 Apr;22(3). pii: dmV066.

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 Nov-Dec;21(6):779-86.

Zhang H, Risal S, Gorre N, Busayavalasa K, Li X, Shen Y, Bosbach B, Brännström M, Liu K. Somatic cells initiate primordial follicle activation and govern the development of dormant oocytes in mice. *Curr Biol.* 2014 Nov 3;24(21):2501-8.

10.   *Anexos*

10.1. Anexo I

Tabela 3. Análise de imunomarcção da proteína Akt

Análise de Imunomarcção Akt					
Paciente	Intensidade	Folículo Primordial		Folículo Primário	
		Oócito	Granulosa	Oócito	Granulosa
1	-	11	11	0	0
	+	26	26	2	2
2	-	7	8	5	6
	+	14	13	11	10
3	-	7	7	4	4
	+	4	4	1	1
4	-	51	51	2	2
	+	119	119	15	15
5	-	1	1	0	0
	+	4	4	3	3
6	-	4	4	5	5
	+	5	5	10	10
7	-	17	17	3	3
	+	99	99	21	21
8	-	47	47	7	7
	+	12	12	2	2
9	-	13	13	4	4
	+	6	6	6	6
10	-	10	10	0	0
	+	9	9	2	2
12	-	26	26	4	4
	+	1	1	0	0
15	-	36	36	1	1
	+	343	343	4	4
16	-	1	1	5	4
	+	4	4	3	4
17	-	2	2	0	0
	+	7	7	1	1
18	-	2	2	2	2
	+	0	0	1	1
19	-	1	1	2	2
	+	0	0	2	2
20	-	1	1	0	0

	+	1	1	1	1
21	-	17	17	7	7
	+	2	2	3	3
22	-	1	1	3	3
	+	1	1	2	2
23	-	3	3	0	0
	+	2	2	2	2
24	-	0	0	0	0
	+	8	8	1	1
25	-	4	4	0	0
	+	31	31	2	2
26	-	27	27	12	12
	+	3	3	1	1
28	-	2	2	1	1
	+	1	1	0	0
29	-	5	5	1	1
	+	5	5	2	2
30	-	18	18	6	7
	+	2	2	2	1
31	-	66	66	26	26
	+	0	0	0	0
32	-	40	40	4	4
	+	105	105	6	6
35	-	16	16	0	0
	+	64	64	8	8
36	-	4	4	0	0
	+	5	5	1	1
37	-	49	49	6	6
	+	44	44	17	17
39	-	12	12	2	3
	+	2	2	2	1
40	-	0	0	0	0
	+	15	15	1	1
41	-	16	16	1	1
	+	37	37	1	1
43	-	43	43	1	1
	+	8	8	0	0
44	-	2	2	2	2
	+	8	8	1	1
45	-	13	13	1	1

	+	1	1	0	0
48	-	12	12	2	2
	+	11	11	0	0
50	-	3	3	2	2
	+	30	30	1	1

10.2. Anexo II

Tabela 4. Análise de imunomarcção da proteína phospho-Akt

Análise de Imunomarcção phospho-Akt					
Paciente	Intensidade	Folículo Primordial		Folículo Primário	
		Oócito	Granulosa	Oócito	Granulosa
1	-	18	18	1	1
	+	3	3	0	0
2	-	17	18	18	21
	+	5	4	7	4
3	-	4	4	1	1
	+	0	0	0	0
4	-	217	217	17	17
	+	7	7	0	0
5	-	4	4	1	1
	+	0	0	0	0
6	-	9	9	12	12
	+	0	0	0	0
7	-	146	146	13	14
	+	0	0	1	0
8	-	45	45	15	15
	+	0	0	0	0
9	-	13	13	6	6
	+	0	0	0	0
10	-	22	22	3	3
	+	0	0	0	0
12	-	28	28	3	3
	+	0	0	0	0
15	-	46	46	8	8
	+	66	66	4	4
16	-	3	3	7	7

	+	0	0	0	0
17	-	9	9	2	2
	+	0	0	0	0
18	-	2	2	2	2
	+	0	0	0	0
19	-	1	1	1	1
	+	2	2	2	2
20	-	2	2	1	1
	+	0	0	0	0
21	-	5	5	5	5
	+	0	0	0	0
22	-	4	4	3	3
	+	0	0	0	0
23	-	2	2	6	6
	+	0	0	1	1
25	-	27	27	1	1
	+	1	1	0	0
26	-	22	22	17	17
	+	0	0	0	0
28	-	2	2	1	1
	+	1	1	0	0
29	-	13	13	2	2
	+	2	2	0	0
30	-	19	19	7	7
	+	0	0	0	0
31	-	69	69	27	27
	+	0	0	0	0
32	-	150	150	11	11
	+	0	0	0	0
35	-	65	65	5	6
	+	20	20	7	6
36	-	2	2	1	1
	+	0	0	0	0
37	-	103	103	24	24
	+	0	0	0	0
38	-	1	1	1	1
	+	0	0	0	0
39	-	15	15	5	5
	+	0	0	0	0
40	-	10	10	1	1

	+	0	0	0	0
41	-	46	46	4	4
	+	0	0	0	0
43	-	21	21	0	0
	+	30	30	1	1
44	-	9	9	2	2
	+	0	0	0	0
45	-	15	15	1	1
	+	0	0	0	0
47	-	7	7	2	2
	+	0	0	0	0
48	-	10	10	2	3
	+	10	10	1	0
50	-	10	10	2	2
	+	3	3	0	0

10.3. Anexo III

Tabela 5. Análise de imunomarcção da proteína PTEN

Análise de Imunomarcção PTEN					
Paciente	Intensidade	Folículo Primordial		Folículo Primário	
		Oócito	Granulosa	Oócito	Granulosa
1	-	23	23	3	3
	+	12	12	4	4
2	-	22	22	3	4
	+	4	4	8	7
3	-	4	4	1	1
	+	2	2	1	1
4	-	127	127	13	13
	+	29	29	2	2
5	-	7	7	1	1
	+	0	0	0	0
6	-	13	13	8	9
	+	0	0	3	2
7	-	85	85	17	17
	+	20	20	4	4
8	-	59	59	13	14

	+	4	4	2	1
9	-	9	9	8	8
	+	2	2	1	1
10	-	21	21	4	4
	+	0	0	0	0
12	-	25	25	3	3
	+	0	0	0	0
15	-	328	328	11	11
	+	84	84	0	0
16	-	4	4	7	7
	+	0	0	0	0
17	-	8	8	0	0
	+	1	1	1	1
19	-	2	2	1	1
	+	2	2	0	0
21	-	16	16	18	18
	+	1	1	2	2
22	-	3	3	4	4
	+	0	0	0	0
23	-	4	4	2	2
	+	0	0	0	0
24	-	5	5	1	1
	+	0	0	0	0
25	-	24	24	3	3
	+	1	1	0	0
26	-	3	3	2	3
	+	12	12	4	3
28	-	2	2	0	1
	+	1	1	1	0
29	-	9	9	1	1
	+	2	2	0	0
30	-	24	24	4	4
	+	0	0	0	0
31	-	65	65	19	19
	+	0	0	0	0
32	-	89	89	4	5
	+	44	44	2	1
35	-	81	81	13	13
	+	0	0	0	0
36	-	2	2	2	3

	+	0	0	1	0
37	-	101	101	17	17
	+	0	0	0	0
38	-	1	1	2	2
	+	0	0	0	0
39	-	18	18	3	3
	+	0	0	0	0
40	-	4	4	0	0
	+	3	3	1	1
41	-	29	29	2	2
	+	12	12	0	0
43	-	21	21	1	1
	+	4	4	0	0
44	-	7	7	1	1
	+	0	0	0	0
45	-	11	11	1	1
	+	0	0	0	0
47	-	6	6	1	1
	+	0	0	0	0
48	-	7	7	1	1
	+	7	7	1	1
50	-	22	22	1	1
	+	0	0	0	0

10.4. Anexo IV

Tabela 6. Análise de imunomarcção da proteína FOXO3a

Análise de Imunomarcção FOXO3a					
Paciente	Intensidade	Folículo Primordial		Folículo Primário	
		Oócito	Granulosa	Oócito	Granulosa
1	-	27	27	1	1
	+	2	2	0	0
2	-	27	27	8	9
	+	2	2	3	2
3	-	8	8	1	1
	+	0	0	0	0
4	-	145	145	9	9

	+	7	7	0	0
6	-	9	9	10	10
	+	0	0	1	1
7	-	96	96	16	16
	+	24	24	6	6
8	-	51	51	10	10
	+	0	0	1	1
9	-	14	14	9	9
	+	2	2	0	0
10	-	1	1	2	2
	+	0	0	0	0
12	-	24	24	4	4
	+	6	6	0	0
15	-	376	376	19	19
	+	0	0	0	0
16	-	4	4	4	4
	+	0	0	0	0
17	-	7	7	2	2
	+	0	0	1	1
18	-	1	1	1	1
	+	0	0	0	0
19	-	2	2	8	8
	+	0	0	0	0
20	-	2	2	1	1
	+	0	0	0	0
21	-	24	24	15	15
	+	0	0	1	1
22	-	2	2	4	4
	+	0	0	0	0
23	-	3	3	2	2
	+	1	1	1	1
24	-	2	2	1	1
	+	0	0	0	0
25	-	21	21	1	1
	+	0	0	0	0
26	-	20	20	8	8
	+	0	0	0	0
29	-	13	13	2	2
	+	0	0	1	1
30	-	21	21	7	7

	+	0	0	0	0
31	-	60	60	26	26
	+	0	0	0	0
32	-	129	129	5	5
	+	0	0	0	0
35	-	51	50	3	2
	+	20	21	7	8
36	-	3	3	1	1
	+	0	0	0	0
37	-	88	88	18	18
	+	6	6	1	1
38	-	1	1	3	3
	+	0	0	0	0
39	-	18	18	3	4
	+	0	0	1	0
40	-	12	12	1	1
	+	3	3	0	0
41	-	28	28	1	1
	+	12	12	0	0
43	-	41	41	1	1
	+	3	3	0	0
44	-	2	2	1	1
	+	3	3	1	1
45	-	16	16	1	1
	+	0	0	0	0
47	-	4	4	3	3
	+	0	0	0	0
48	-	11	11	2	2
	+	8	8	1	1
50	-	14	14	0	0
	+	16	16	1	1

10.5.   *Artigo Científico*

Expressão das proteínas Akt, phospho-Akt, PTEN e FOXO3a em tecido ovariano humano

Thais Tiemi Higa¹, Maria Aparecida Carneiro Vasconcelos¹, Renan Augusto Pereira², Luciene Aparecida Batista¹, Leandra Naira Zambelli Ramalho², Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva¹.

¹Setor de Reprodução Humana, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, Brasil.

²Laboratório de Patologia Celular e Molecular, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, Brasil.

Autor correspondente

Dra. Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva

Avenida Bandeirantes, 3900 – Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Email: anasars@fmrp.usp.br / thais.higa@usp.br

Resumo

Mulheres diagnosticadas com câncer que desejam preservar sua fertilidade têm como opção a criopreservação do tecido ovariano. Esse tecido seria destinado, dependendo do caso, ao reimplante posterior ou para o cultivo *in vitro* de folículos ovarianos isolados do tecido criopreservado. Nesse contexto, os folículos primordiais são uma população importante tanto por serem mais resistentes ao processo de criopreservação, como por representarem cerca de 90% da população total folicular. Porém o uso destes ainda é bastante limitado, pois os mecanismos responsáveis pelo seu processo de ativação ainda não são completamente conhecidos. A via de sinalização fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) foi recentemente identificada como determinante para o controle da ativação dos folículos primordiais. Portanto o objetivo deste estudo foi identificar e localizar os fatores componentes da via: supressores (FOXO3a e PTEN) e ativadores (Akt e Phospho-Akt) da transição de folículos primordiais para primários em tecido ovariano humano. O que ofereceria uma valiosa ferramenta para elucidar os mecanismos envolvidos na ativação do pool de reserva folicular e permitiria o desenvolvimento de sistemas de cultivo folicular. Sendo assim, foi realizado um estudo transversal com amostras de tecido ovariano humano, que foram submetidas à reação imunohistoquímica dos fatores previamente citados. Foram incluídas na casuística 40 pacientes, com idade média de 27,7 anos $\pm$ 7,26. Foi realizada uma análise comparativa da expressão dessas proteínas entre os folículos primordiais e primários. Foi encontrada diferença significativa para a proteína Akt, ($p < 0,05$) em que os folículos primordiais (oócito e células da granulosa) manifestaram mais expressão da proteína Akt em comparação aos folículos primários. Também foi encontrada diferença significativa para a proteína phospho-Akt, porém apenas nas células da granulosa, em que houve maior expressão em folículos primordiais comparados aos primários. Enquanto ambos os estágios tiveram marcação negativa para o PTEN e FOXO3a na maioria dos folículos analisados. Sendo assim, neste estudo não foi possível identificar dentre as proteínas escolhidas uma que tivesse expressão claramente característica de uma ou de outra fase folicular, não sendo possível inferir que a atividade de qualquer uma das proteínas fosse estritamente ligada à ativação dos folículo primordiais.

Introdução

O câncer é reconhecido mundialmente como um dos maiores problemas de saúde pública. E sua incidência tem aumentado entre crianças e adolescentes (Woodruff, 2015; Siegel; Miller; Jemal, 2016). Felizmente, durante as últimas três décadas é notável o aumento da taxa de cura e da expectativa de vida dos pacientes devido ao aperfeiçoamento no diagnóstico e à eficácia de novas terapias (Siegel; Miller; Jemal, 2016; Bénard et al., 2016; Jensen et al., 2017).

No entanto, o tratamento que consiste em quimioterapia e/ou radioterapia pode comprometer a função do sistema reprodutivo e levar à infertilidade (Kim; Jeon, 2012; Sonigo et al. 2015). Sendo assim, os efeitos a longo prazo na qualidade de vida devem ser discutidos antes do tratamento e as opções disponíveis para aquelas que desejam preservar a sua fertilidade devem ser apresentadas (Dittrich et al., 2015; Ataman et al., 2015). Atualmente, 6% das mulheres em idade reprodutiva são sobreviventes do câncer (Silber, 2016).

Assim, mulheres ou meninas pré-púberes diagnosticadas com câncer que desejam preservar sua fertilidade, porém não podem se submeter ao tratamento imediato de estimulação ovariana, tem como opção a criopreservação do tecido ovariano (Woodruff, 2015; Zapardiel et al., 2016). Porém, uma grande limitação dessa técnica é o risco de reimplante de células tumorais presentes no tecido criopreservado (The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2014; Chambon et al., 2016).

Diante dessa situação, o cultivo de folículos ovarianos isolados do tecido criopreservado tem como objetivo recuperar gametas para fins reprodutivos, sem esse risco (Smitz et al., 2010; Telfer; Zelinski, 2013; Harada; Osuga, 2016). As técnicas atualmente descritas para cultivo de folículos bastante imaturos trazem resultados promissores para os folículos secundários (Shea; Woodruff; Shikanov, 2014). Entretanto, o número de folículos ativos recuperados é reduzido no tecido criopreservado, o que limita a eficiência dessa tecnologia na prática clínica.

Nesse contexto, os folículos primordiais são uma população importante tanto por serem mais resistentes ao processo de criopreservação, como por representarem cerca de 90% da população total de folículos, constituindo o chamado

pool de reserva folicular (Jin et al., 2010; Hornick et al., 2012; Camboni et al., 2013; Salama; Woodruff, 2015). Porém o uso destes folículos para procedimentos de Reprodução Assistida ainda é bastante limitado, pois os mecanismos responsáveis pelo processo de ativação dos folículos primordiais ainda não são completamente conhecidos (Gougeon, 2011; Shea, Woodruff, Shikanov, 2014).

Recentemente, a via de sinalização fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) (Figura 1) foi identificada como mecanismo chave no processo de manutenção e ativação dos folículos primordiais (Reddy et al., 2008; Zhang; Liu, 2015). É relatada como uma via clássica de sinalização, constituída por quinases, fosfatases e fatores de transcrição. Essas moléculas estabelecem cascatas de sinalização intracelulares fundamentais para vários processos fisiológicos como regulação de proliferação, sobrevivência, migração e metabolismo celular (Cantley, 2002; Liu et al., 2006).

A interação entre as células somáticas e germinativas no ovário serve como o evento molecular inicial que desencadeia a ativação da via PI3K e consequentemente, dos folículos primordiais (Zhang et al., 2014; Monniaux, 2016). Muitos fatores de crescimento ativam essa via nos oócitos, porém o mais importante e estudado é o Kit ligante (KL) e seu receptor tirosina-quinase (RPTK) c-kit (Liu et al., 2006; Hsueh et al., 2015). O KL é uma citocina produzida e secretada pelas células da granulosa dos folículos, e exerce sinais parácrinos via estimulação do seu receptor c-kit, que se encontra expresso na superfície dos oócitos (em repouso e em crescimento) (Gougeon, 2011; Tuck et al., 2015). Nos estágios iniciais dos folículos, em que receptores de FSH (hormônio folículo estimulante) ainda não são expressos, o crescimento folicular é dependente da sinalização do KL com o c-kit (Albertini; Barrett, 2003; Thomas; Vanderhyden, 2006; Liu et al., 2006).

Portanto, a ligação de KL ao seu receptor c-kit ativa a via de sinalização PI3K, presente nos oócitos e conduz à ativação dos folículos em repouso (Liu et al., 2006; Gougeon, 2011; Kawamura; Kawamura; Hsueh, 2016). Em seguida, PI3K é recrutado para a membrana plasmática e fosforila a posição 3'-OH do anel inositol do fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) para produzir fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) na membrana intracelular. O PIP3 age como um mensageiro secundário ao recrutar e ativar proteínas tais como as serina/treonina quinases: PDK1 (proteína

quinase dependente de 3-fosfatidilinositol) e Akt, também chamada de proteína quinase B. Akt é a mais relevante das proteínas recrutadas e o maior efetor da via PI3K (Cantley, 2002; Liu et al., 2006; Klempner; Myers; Cantley, 2013).

Figura 1. Ilustração da via de sinalização PI3K (fosfatidilinositol 3-quinase)

Fonte: Kim JY. Control of ovarian primordial follicle activation. Clin Exp Reprod Med, 2012.

Legenda: Moléculas que mantêm a latência dos folículos primordiais são PTEN, FOXO3a, p27 e TSC1/TSC2. Moléculas que mantêm a sobrevivência dos folículos primordiais incluem PI3K, PDK1, mTORC1, S6K1 e rpS6. RPTK (receptor de tirocína quinase); PTEN (homólogo da fosfatase e da tensina deletado no cromossomo 10); PIP2 (fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato); PIP3, (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato); PI3K, fosfatidilinositol 3-quinase; PDK1 (proteína quinase dependente de 3-fosfatidilinositol); Akt (proteína quinase B); FOXO3a (forkhead box O3a); mTORC1, C2 (alvo da rapamicina em mamíferos complexo 1,2); TSC1 / 2, (complexo de esclerose tuberosa 1,2; ou hamartina e tuberina respectivamente); S6K1 (proteína ribossomal p70 S6 quinase 1); rpS6, (proteína ribossomal S6).

Enquanto isso, o PTEN (homólogo da fosfatase e da tensina deletado no cromossomo 10), desfosforila e converte PIP3 de volta para PIP2, regulando negativamente a função de PI3K, e consequentemente de Akt (Carracedo; Pandolfi, 2008; Hsueh et al., 2015). Para ser ativada, a proteína Akt é fosforilada (phospho-Akt) em dois locais diferentes pelas proteínas PDK1 e mTORC2 (alvo da rapamicina em mamíferos complexo 2) (Cecconi et al., 2012).

Como uma molécula-chave da via PI3K, Akt em sua forma ativa promove sobrevivência, proliferação e crescimento celular, fosforilando e inativando uma série de alvos *downstream* “negativos” (Reddy; Zheng; Liu, 2010). Nesse contexto estão os fatores de transcrição FOXO, pertencentes à família forkhead box que incluem FOXO1, FOXO3a e FOXO4. Estas moléculas são caracterizadas pela presença de sítios altamente conservados para a fosforilação por Akt. Logo, Akt ao fosforilar os fatores FOXO, promove a extrusão desses fatores do núcleo para o citoplasma, reprimindo suas funções de transcrição (Adhikari; Liu, 2009).

Mais especificamente, como o fator de transcrição FOXO3a nuclear nos oócitos é essencial para a manutenção da dormência dos folículos primordiais, a sua exportação nuclear leva à ativação desses folículos (Kim et al., 2015). Além disso, FOXO3a está principalmente expresso no núcleo de oócitos inclusos em folículos primordiais e primários iniciais, enquanto sua expressão é down-regulada dramaticamente em oócitos de folículos primários e em crescimento (Liu et al., 2007).

Em síntese, a ativação da via PI3K promove a fosforilação de Akt, que se torna ativa e fosforila FOXO3a, promovendo sua extrusão nuclear, que reprime sua função de transcrição, o que desencadeia a ativação dos folículos primordiais (Cecconi et al., 2012; Kim, 2012; McLaughlin et al., 2014). Assim, uma vez ativada, a via PI3K é submetida à ação moduladora de inibidores, como o PTEN, que podem evitar a exaustão prematura da reserva ovariana em resposta a uma estimulação prolongada ou muito forte (Gougeon, 2011; Hsueh et al., 2015). Apesar dessas descobertas recentes, a maioria derivada de estudos em animais, os mecanismos exatos de como um número limitado de folículos primordiais são ativados dentre um grande número de folículos dormentes ainda são desconhecidos (Kawamura; Kawamura; Hsueh, 2016).

Neste sentido, o objetivo deste estudo foi identificar e localizar os fatores supressores (FOXO3a e PTEN) e ativadores (Akt e Phospho-Akt) da transição de folículos primordiais para primários em tecido ovariano humano. O que ofereceria uma valiosa ferramenta para elucidar os mecanismos envolvidos na ativação do pool de reserva folicular e permitiria o desenvolvimento de protocolos de cultivo de folículos que atuassem diretamente nestes mecanismos.

Casuística e Métodos

Aspectos éticos

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Pesquisa do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (DGO – FMRP – USP) (Projeto nº 547/2016). E subsequentemente também aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP (CEP – HCFMRP – USP) (Ofício nº 1917/2016). Além disso, enviamos ao CEP uma solicitação de dispensa da aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, que também foi aprovada (Processo HCRP nº7201/2016). Visto que utilizaríamos casos do banco de amostras do Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP (SERPAT).

Desenho do estudo

Foi realizado um estudo transversal com amostras de tecido ovariano humano para identificação de fatores relacionados à transição do pool de folículos primordiais em primários. Para isso a expressão das proteínas Akt, phospho-Akt, PTEN e FOXO3a foi analisada comparativamente entre as duas populações foliculares. Aqueles marcados diferencialmente em um dos estágios foliculares foram considerados como fatores provavelmente envolvidos neste processo e serão testados em estudos futuros.

Um levantamento de amostras de tecido ovariano humano emblocadas em parafina foi realizado no banco de amostras do SERPAT. Estas amostras são provenientes de pacientes submetidas a cirurgias com indicação clínica de ooforectomia total ou parcial. Foram selecionadas todas as amostras recebidas entre o período de 01/01/2005 até 14/05/2015, destas foram excluídas amostras de pacientes com menos de 15 anos e mais de 40 anos, e fragmentos pequenos que inviabilizariam a contagem dos folículos ovarianos. Além disso, foram incluídas apenas amostras que continham no mínimo um folículo primordial e um folículo primário na análise previa feita em lâmina corada pela hematoxilina e eosina (H&E) (Figura 2). A classificação folicular tanto para as lâminas coradas em H&E, quanto

para as lâminas imunocoradas foi realizada baseada na histologia clássica, de acordo com a definição de Gougeon (1996): Folículos primordiais: uma única camada de células da granulosa planas; Folículos primários: uma única camada de células da granulosa cuboide. Porém folículos em fase de transição, que apresentavam ao menos duas células da granulosa cuboide (Nilsson et al., 2010) foram classificados como folículos primários (Figura 2). Ao final da triagem geral das amostras, 40 foram selecionadas e submetidas a reação imunohistoquímica.

Figura 2. Folículos primordiais e primários corados em H&E.

Legenda: Em A e B: folículos primordiais. Em C: folículo em transição (classificado como folículo primário). E em D: folículo primário. Os oócitos estão indicados com um asterisco (*) e as células da granulosa estão indicadas com as setas. Aumentos de 1000x.

Reação Imunohistoquímica

As amostras de tecido ovariano incluídas em parafina foram submetidas a cortes de três micrômetros e montadas em lâminas silanizadas. Para a detecção dos marcadores foram utilizados os anticorpos primários da *Cell Signaling Technology*

(Danvers, MA, USA): Akt (pan) (40D4), Phospho-Akt (Ser473) (D9E) XP®, PTEN (138G6) e FoxO3a (D19A7). Todos os anticorpos foram utilizados na concentração de 1:200. O kit de revelação utilizado foi o *REVEAL Polyvalent HRP-DAB Detection System*, da *Spring Bioscience* (Pleasanton, CA, USA). Como controles positivos foram utilizadas amostras de carcinoma de mama para todos os marcadores.

As reações de imunohistoquímica iniciaram-se com a desparafinização das lâminas em dois banhos de xilol por 5 minutos cada. A seguir, os cortes foram reidratados em uma série descendente de álcool (um banho em cada concentração de álcool: 95%, 90%, 75% e 70%) e imersos em água corrente. Após essa etapa, foi realizada a recuperação antigênica, em que as lâminas foram incubadas em tampão citrato (pH 6,0), pré aquecido de 95 a 99°C, por 40 minutos em panela a vapor. Logo após, as lâminas foram resfriadas por 15 minutos em temperatura ambiente e lavadas em água destilada e tampão PBS (pH 7,0).

A partir dessa etapa, todos os procedimentos foram realizados em câmara úmida e foram utilizados os reagentes do kit *REVEAL Polyvalent HRP-DAB Detection System* de acordo com as recomendações do fabricante. Após a revelação, os cortes foram lavados em água corrente, contra corados com Hematoxilina e lavados em água amoniacal. Por fim, foram desidratados em uma série de concentrações de álcool e xilol. E as lâminas foram montadas, cobertas por lamínula com auxílio de *Permount* (Fisher Scientific; Pittsburgh, PA, USA).

Análise das lâminas por microscopia óptica

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico *Axio Scope A1* acoplado à câmera digital *AxioCam MRc*, que possibilitou a captura de imagens através de um computador equipado com o *software AxioVision 4.8* (Carl Zeiss; Oberkochen, Germany). Foram examinados todos os campos do tecido e assim identificados os folículos primordiais e primários. Todos os folículos com o oócito e as células da granulosa íntegros foram contados e cada compartimento (oócito e granulosa) foi analisado separadamente. A imunomarcação foi classificada como negativa ou positiva. Todas as análises (leituras) da marcação imunohistoquímica foram

realizadas por dois pesquisadores, sendo Higa TT (pesquisador principal) e Vasconcelos MAC (Maria Aparecida Carneiro Vasconcelos, colaboradora técnica).

Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada comparando-se a marcação imunohistoquímica para as diferentes proteínas (Akt, phospho-Akt, PTEN e FOXO3a) entre os folículos primordiais e primários, utilizando o teste de Qui-quadrado. Cada compartimento folicular (oócito e células da granulosa) foi analisado separadamente. Para esta análise foram somados todos os folículos de todas as pacientes para a composição dos grupos “primordial” e “primário”.

Os dados foram analisados no programa SAS versão 9.3. O nível crítico foi fixado em 5% ($p < 0,05$) para se admitir uma diferença de valores estatisticamente significativa.

Resultados

Foram incluídas na casuística 40 pacientes, com idade média de 27,7 anos $\pm$ 7,26 (mínima: 15 anos e máxima: 40 anos). Para cada uma das pacientes foi realizada a análise de imunomarcacão das 4 proteínas Akt, phospho-Akt, PTEN e FOXO3 nos compartimentos foliculares (oócitos e células da granulosa) dos folículos primordiais e primários. A seguir, são apresentadas fotomicrografias das intensidades de marcação encontradas. A imunomarcacão foi classificada como negativa (-) ou positiva (+), considerando como positiva todas as intensidades de marcação (Figura 3).

Foram contados no total 6023 folículos primordiais e 999 folículos primários em 160 lâminas, levando em consideração que de cada amostra de paciente foram feitos 4 cortes consecutivos, um para cada proteína. No entanto vale ressaltar que a maioria dos folículos considerados como primários estavam em fase de transição, de acordo com a definição de Nilsson et al. (2010).

Figura 3. Expressão das proteínas Akt, phospho-Akt, PTEN e FOXO3a nos folículos ovarianos

Legenda: Em A, B, C e D estão os folículos primordiais organizados ascendentemente em gradação de intensidade; em A = marcação negativa (-) e em B, C e D = marcação positiva (+). E em A', B', C' e D' estão os folículos primários também organizados ascendentemente em gradação de intensidade; em A' = marcação negativa (-) e em B', C' e D' = marcação positiva (+). Em A está uma fotomicrografia de uma lâmina do marcador phospho-AKT. Em B do marcador FOXO3a. Em A' e B' do marcador PTEN. E em C, D, C' e D' do marcador AKT. Os oócitos estão indicados com um asterisco (*) e as células da granulosa estão indicadas com as setas. Aumentos de 1000x.

Nas tabelas a seguir notamos o resultado da análise de imunomarcção dos oócitos (Tabela 1) e células da granulosa (Tabela 2) entre os grupos (folículo primordial e folículo primário) em relação às 4 proteínas (Akt, phospho-Akt, PTEN e FOXO3a), somando-se todos os folículos ovarianos das 40 pacientes.

Tabela 1. Análise de imunomarcção dos oócitos inclusos em folículos primordiais e primários em relação às proteínas Akt, phospho-Akt, PTEN e FOXO3a

Proteína	Estágio Folicular (n)	Marcação dos Oócitos n / %		P valor
		NEGATIVA	POSITIVA	
Akt	Primordial (1629)	590 36,22	1039 63,78 ^A	0,0012
	Primário (259)	121 46,72	138 53,28 ^A	
p-Akt	Primordial (1363)	1213 88,99	150 11,01	0,3475
	Primário (265)	241 90,94	24 9,06	
PTEN	Primordial (1538)	1291 83,94	247 16,06	0,9445
	Primário (234)	196 83,76	38 16,24	
FOXO3a	Primordial (1493)	1378 92,30	115 7,70	0,0659
	Primário (241)	214 88,80	27 11,20	

Legenda: Akt (proteína quinase B); p-AKT (phospho-Akt: proteína quinase B fosforilada); PTEN (homólogo da fosfatase e da tensina deletado no cromossomo 10) e FOXO3a (forkhead box O3a). Letras iguais representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Observamos que apenas houve diferença estatisticamente significativa de imunomarcção em relação ao marcador Akt ($p=0,0012$). Em que os oócitos de

folículos primordiais mostraram-se mais marcados positivamente comparados aos oócitos de folículos primários.

Tabela 2. Análise de imunomarcacão das células da granulosa de folículos primordiais e primários em relação às proteínas Akt, phospho-Akt, PTEN e FOXO3a

Proteína	Estágio Folicular (n)	Marcação das céls. da granulosa n / %		P valor
		NEGATIVA	POSITIVA	
Akt	Primordial (1629)	591 36,28	1038 63,72 ^B	0,0005
	Primário (259)	123 47,49	136 52,51 ^B	
p-Akt	Primordial (1363)	1214 89,07	149 10,93 ^C	0,0421
	Primário (265)	247 93,21	18 6,79 ^C	
PTEN	Primordial (1538)	1291 83,94	247 16,06	0,2705
	Primário (234)	203 86,75	31 13,25	
FOXO3a	Primordial (1493)	1377 92,23	116 7,77	0,1128
	Primário (241)	215 89,21	26 10,79	

Legenda: Akt (proteína quinase B); p-AKT (phospho-Akt: proteína quinase B fosforilada); PTEN (homólogo da fosfatase e da tensina deletado no cromossomo 10) e FOXO3a (forkhead box O3a). Letras iguais representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Dentre a maioria dos folículos observados o padrão de marcação dos oócitos se mostrou muito similar à marcação das células da granulosa adjacentes. Assim, como podemos observar na Tabela 2, em relação às células da granulosa também houve diferença na marcação de Akt ($p = 0,0005$), em que houve maior expressão nos folículos primordiais comparados aos folículos primários. Mas também houve uma

diferença na marcação de phospho-Akt ($p=0,0421$), onde houve maior expressão da proteína nas células da granulosa de folículos primordiais. Na figura 4 a seguir estão apresentados os gráficos dos resultados.

Figura 4. Expressão das proteínas Akt, phospho-Akt, PTEN e FOXO3a nos compartimentos foliculares (oócito e células da granulosa)

Legenda: os valores indicados se referem à porcentagem de expressão das proteínas, conforme indicadas na Tabela 1 e 2. Letras iguais representam diferenças estatísticas ($p<0,05$); Letra A: $p=0,0012$; Letra B: $p=0,0005$; Letra C: $p=0,0421$.

Discussão

A imunolocalização de fatores relacionados à transição de folículos primordiais para primários vem sendo estudada por outros pesquisadores em ovinos (Froment et al., 2005), suínos (Meng et al., 2007; Ding et al., 2010), murinos (Tarnawa et al., 2013) e em humanos (Goto et al., 2007). Além disso, alguns desses fatores já foram testados em sistemas de cultivo *in vitro*, na tentativa de desencadear a ativação dos folículos primordiais (Li et al., 2010; Kawamura et al. 2013) a partir da estimulação ou inibição dos fatores envolvidos.

No presente estudo verificamos a expressão de proteínas componentes da via de sinalização PI3K, que foi recentemente identificada como determinante para o controle da ativação dos folículos primordiais (Reddy et al., 2008, Zhang; Liu, 2015), dentre elas estão: Akt, Akt fosforilado (phospho-Akt), PTEN e FOXO3a. Foi realizada uma análise comparativa da expressão dessas proteínas entre os folículos primordiais e os folículos primários de 40 pacientes. Encontramos diferença estatisticamente significativa para a proteína Akt, em que os folículos primordiais (oócito/ $p=0,0012$ e células da granulosa/ $p=0,0005$) manifestaram maior expressão desta proteína em comparação aos folículos primários. Também foi encontrada diferença significativa na marcação de phospho-Akt ($p=0,0421$), porém apenas nas células da granulosa, em que houve maior expressão em folículos primordiais comparados aos primários. Enquanto não houve diferença no padrão de expressão para os outros fatores nessa transição folicular específica, ambos os estágios tiveram marcação negativa para o PTEN e FOXO3a na maioria dos folículos analisados.

A maior marcação de Akt verificada neste estudo nos oócitos e células da granulosa de folículos primordiais em comparação aos folículos primários diferiu daquela descrita por Goto et al. também em humanos, aonde houve expressão constante de Akt nos oócitos e células da granulosa em folículos primordiais e folículos em cada fase de desenvolvimento. No trabalho do grupo de Goto, em relação aos oócitos, a expressão de Akt foi moderada em todas as fases foliculares. Já em relação as células da granulosa, a intensidade de marcação foi moderada nos folículos primordiais e primários, e se tornou forte em folículos secundários/antrais e pré ovulatórios (Goto et al., 2007). A presença de Akt em folículos em estágio

avançado de desenvolvimento provavelmente está relacionada com outras funções desta proteína ao longo da foliculogênese. Em nosso estudo, apesar da maior expressão de Akt ser observada nos primordiais, esta proteína esteve presente em mais de 50% dos folículos primários, reforçando um provável papel em estágios mais tardios do desenvolvimento folicular. Com relação ao Akt nos estágios iniciais do crescimento folicular o estudo de Goto et al. é descritivo, e não propõe uma comparação na marcação desta proteína nos diferentes estágios foliculares, não permitindo inferir a maior ou menor expressão de Akt em um dos estágios estudados.

A phospho-Akt é a forma ativa da proteína Akt. A primeira hipótese deste estudo era de que folículos em processo de ativação apresentassem maior expressão desta proteína ativada, entretanto, este não foi o achado deste estudo. Apesar de termos encontrado maior expressão de Akt nos folículos primordiais comparados aos folículos primários, não foi encontrada a relação inversa para a proteína phospho-Akt. Surpreendentemente as células da granulosa de folículos primordiais apresentaram maior expressão, ainda que baixa, da proteína fosforilada em comparação aos folículos primários. O que não era esperado, já que os folículos primordiais supostamente ainda estão em um estado de dormência esperando para serem ativados. Vale ressaltar que na classificação dos folículos primários, a presença de duas células da granulosa em formato cubóide já era considerado critério para classificar o folículo como primário, embora saibamos que este estágio é hoje considerado como de transição. Neste sentido, a grande maioria dos folículos considerados primários analisados foi composta por folículos de transição, o que poderia justificar não termos encontrado marcação mais evidente da phospho-Akt nestes folículos, em princípio, ativados.

Goto et al., também verificaram que em relação à expressão de PTEN houve marcação fraca/ocasional em todos os estágios foliculares, porém a marcação moderada somente esteve presente nos oócitos de folículos primordiais. Por outro lado no que se refere as células da granulosa, não foi encontrada marcação em folículos primordiais e houve marcação fraca/ocasional em folículos primários e secundários/antrais. Enquanto que as células da granulosa de folículos pré ovulatórios expressaram níveis mais elevados (marcação moderada). A análise

também mostrou uma relação inversa entre a marcação de PTEN e phospho-Akt nas células da granulosa. Na medida em que os folículos cresceram, a marcação de PTEN se tornou mais forte, enquanto a marcação de phospho-Akt, que era moderada/forte nos estágios iniciais, se tornou mais fraca (Goto et al., 2007). Essa mesma relação também foi encontrada por Froment et al. (2005) em células da granulosa de ovinos.

Os dados de Goto et al. corroboram a marcação negativa e fraca de PTEN que encontramos tanto nos oócitos, como nas células da granulosa de folículos primordiais e primários. Uma limitação do estudo foi não termos avaliado os folículos em estágio de desenvolvimento avançado, o que ocorreu por questões restritivas da amostra, o número de folículos secundários e antrais foi insuficiente para permitir a análise estatística dos dados. Poderíamos especular que a relação inversa encontrada tanto por eles, quanto pelo grupo de Froment et al. de que a medida que os folículos se desenvolvem, a expressão de PTEN nas células da granulosa se torna mais forte, enquanto a expressão de phospho-Akt se torna mais fraca indica que esses folículos que já estão em fase de desenvolvimento vão controlando a ativação dos folículos primordiais adjacentes. Não sendo, portanto, um processo individualizado, em que o folículo primordial que está dormente produza o próprio fator modulador PTEN que autorregula sua ativação.

Quanto à expressão de FOXO3a, em estudo realizado por Ding et al. em folículos ovarianos de suínos, a análise imunohistoquímica revelou expressão da proteína em oócitos e células da granulosa de folículos primordiais, primários e secundários com marcação fraca nas células da granulosa e forte nos oócitos. Além disso, foi observado um aumento gradativo da marcação de FOXO3a nas células da granulosa a medida em que os folículos se desenvolviam (Ding et al, 2010). Nesse contexto, um estudo conduzido por Tarnawa et al. analisou a expressão de FOXO1 e FOXO3a em diversas espécies de mamíferos, dentre elas roedores, caninos, felinos, bovinos, suínos, símios e humanos, e surpreendentemente FOXO3a não foi detectado nos oócitos de folículos primordiais de nenhuma espécie, exceto de roedores. Não foi encontrada marcação nuclear nos oócitos de folículos primordiais, nem translocação núcleo-citoplasmática nos folículos primários. Enquanto a

expressão de FOXO1 nas células da granulosa manteve-se conservada em todas as espécies. E o que os autores sugerem é que FOXO3a não é unicamente requerido para a manutenção do estado de latência dos folículos primordiais em espécies não-roedoras, e que outros FOXOs, particularmente FOXO1 pode contribuir para a manutenção da dormência dos oócitos primordiais de uma maneira funcionalmente redundante (Tarnawa et al. 2013). Este achado poderia explicar o porquê de não termos encontrado praticamente nenhuma marcação de FOXO3a nos oócitos e células da granulosa dos folículos primordiais.

A ideia inicial do presente estudo era encontrar um dos marcadores com uma diferença de expressão mais veemente entre os folículos primordiais e primários, de maneira que pudéssemos propor a estimulação ou silenciamento do mesmo em um sistema de cultivo *in vitro*, com o objetivo de aumentar a ativação de folículos primordiais em amostras criopreservadas de tecido ovariano. Entretanto, não foi o que verificamos, uma vez que praticamente não houve diferença entre eles e alguns nem mesmo marcaram. Sugerimos que a não marcação não significa necessariamente ausência de função, podendo haver vias alternativas envolvidas. Tanto que estes marcadores foram estudados e suas funções foram comprovadas por outros autores (Castrillon et al., 2003; John et al., 2007; Reddy et al, 2008), além de já terem sido testados através do uso de seus inibidores ou ativadores em sistemas de cultivo *in vitro* (Li et al., 2010; Kawamura et al., 2013).

Estudos mostram que camundongos deficientes em FOXO3a sofrem uma ativação global espontânea de todos os seus folículos primordiais em poucos dias de vida, levando à perda prematura de todos os folículos e consequente falência ovariana em 15 semanas (Castrillon et al., 2003; John et al., 2007). Além disso, fenótipo similar foi detectado em ratos com deleção oócito específica do PTEN. Foi observada ativação de todo o pool de folículos primordiais na puberdade, o que resultou em depleção folicular prematura (Reddy et al., 2008).

No que se refere aos trabalhos que testaram alguns desses fatores, sejam eles inibidores ou ativadores dos mesmos, em sistemas de cultivo *in vitro* na tentativa de desencadear a ativação dos folículos primordiais, alguns obtiveram relativo sucesso. Um estudo demonstrou cultivo em curto prazo de ovários murinos com um

inibidor de PTEN e um fosfopeptídeo estimulador de PI3K, para aumentar a extrusão nuclear de FOXO3a em oócitos primordiais, através do aumento da atividade de Akt. Após alotransplante dos ovários (ativados) sob cápsula renal de ratas hospedeiras ovariectomizadas, folículos primordiais se desenvolveram para a fase pré ovulatória. Oócitos maduros puderam ser recuperados para realização de fertilização *in vitro* e transferência de embriões, seguido pelo nascimento de prole saudável com fertilidade comprovada (Li et al., 2010).

Já o grupo de Kawamura et al. (2013) recentemente combinou as técnicas de cultivo com ativadores de PI3K com fragmentação de ovário para estimular tanto a ativação dos folículos primordiais, como o crescimento dos folículos secundários de ovários de pacientes com falência ovariana prematura. Os ovários foram removidos em cirurgia laparoscópica e logo vitrificados. Depois de descongelados, esse tecido foi fragmentado e submetido a cultivo *in vitro* com ativadores de PI3K por dois dias. Após o cultivo, foi realizado um transplante autólogo abaixo da serosa das tubas uterinas. O crescimento folicular foi monitorado semanalmente e foi observado em 50% das pacientes com folículos residuais. Em alguns casos, folículos pré ovulatórios foram detectados dentro de algumas semanas ou alguns meses após o transplante, sugerindo o crescimento de folículos secundários residuais em resposta à fragmentação do tecido ovariano. Em contraste, alguns folículos pré ovulatórios foram detectados após 6 meses ou mais, provavelmente devido à ativação de folículos primordiais. Após a fertilização *in vitro* e transferência de embriões, três gestações foram obtidas. Apesar de um aborto, dois bebês saudáveis nasceram através dessa técnica. Porém nesse último estudo não há como comprovar que o protocolo de ativação folicular *in vitro* foi exclusivamente responsável pelas gravidezes, como os próprios autores reconhecem (Kawamura et al., 2013).

Neste sentido, não podemos deixar de citar as limitações do estudo. Sugerimos que a técnica de imunohistoquímica pode não ser ideal para analisar um processo dinâmico que é a sinalização celular em meio a ativação dos folículos primordiais. Porém o tecido ovariano humano é de difícil obtenção e a alternativa foi utilizar as amostras de tecido emblocadas em parafina provenientes do banco de amostras do SERPAT. Sendo assim não foi possível realizar outras análises como

imunofluorescência ou *Western blotting* em razão de ser um tecido parafinado. Tentamos realizar marcação imunofluorescente, porém não obtivemos sucesso na desparafinização dos cortes, o que inviabilizou a utilização da técnica. Outra limitação seria o número reduzido de folículos em estágios tardios, o que nos impossibilitou fazer uma análise completa da atuação das proteínas no processo de foliculogênese.

Conclusões

1. Ambos os estágios foliculares (primordial e primário) apresentam expressão da proteína Akt em mais de 50% dos folículos analisados em relação aos oócitos e células da granulosa.
2. Quando comparados quanto à marcação de Akt, os oócitos e células da granulosa de folículos primordiais apresentam mais expressão desta proteína do que os de folículos primários.
3. Em relação à expressão de phospho-Akt, ambos os estágios foliculares apresentam marcação negativa na maioria (aproximadamente 90%) dos folículos analisados, tanto nos oócitos, quanto nas células da granulosa.
4. Quando comparadas quanto à marcação de phospho-Akt, as células da granulosa de folículos primordiais apresentam mais expressão, ainda que limitada, desta proteína quando comparadas as de folículos primários.
5. Não houve diferença de expressão de PTEN e FOXO3a entre as populações foliculares. Ambas apresentaram marcação negativa na maioria dos folículos analisados.
6. Neste estudo não foi possível identificar dentre as proteínas escolhidas uma que tivesse expressão claramente característica de uma ou de outra fase folicular, não sendo possível inferir que a atividade de qualquer uma das proteínas fosse estritamente ligada à ativação do folículo primordial.

Referências

Adhikari D, Liu K. Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Endocr Rev.* 2009 Aug;30(5):438-64.

Albertini DF, Barrett SL. Oocyte-somatic cell communication. *Reprod Suppl.* 2003;61:49-54.

Ataman LM, Rodrigues JK, Marinho RM, Caetano JP, Chehin MB, Alves da Motta EL, Serafini P, Suzuki N, Furui T, Takae S, Sugishita Y, Morishige KI, Almeida-Santos T, Melo C, Buzaglo K, Irwin K, Wallace WH, Anderson RA, Mitchell RT, Telfer EE, Adiga SK, Anazodo A, Stern C, Sullivan E, Jayasinghe Y, Orme L, Cohn R, McLachlan R, Deans R, Agresta F, Gerstl B, Ledger WL, Robker RL, de Meneses E Silva JM, Silva LH, Lunardi FO, Lee JR, Suh CS, De Vos M, Van Moer E, Stoop D, Vloeberghs V, Smitz J, Tournaye H, Wildt L, Winkler-Crepaz K, Andersen CY, Smith BM, Smith K, Woodruff TK. Creating a Global Community of Practice for Oncofertility. *J Glob Oncol.* 2016 Apr;2(2):83-96.

Bénard J, Duros S, El Hachem H, Sonigo C, Sifer C, Grynberg M. Freezing oocytes or embryos after controlled ovarian hyperstimulation in cancer patients: the state of the art. *Future Oncol.* 2016 Jul;12(14):1731-41.

Camboni A, Van Langendonck A, Donnez J, Vanacker J, Dolmans MM, Amorim CA. Alginate beads as a tool to handle, cryopreserve and culture isolated human primordial/primary follicles. *Cryobiology.* 2013 Aug;67(1):64-9.

Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science.* 2002 May 31; 296(5573):1655-7.

Carracedo A, Pandolfi PP. The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene.* 2008 Sep 18;27(41):5527-41.

Castrillon DH, Miao L, Kollipara R, Horner JW, DePinho RA. Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science*. 2003 Jul 11;301(5630):215-8.

Cecconi S, Mauro A, Cellini V, Patacchiola F. The role of Akt signalling in the mammalian ovary. *Int J Dev Biol*. 2012;56(10-12):809-17.

Chambon F, Brugnon F, Grèze V, Grémeau AS, Pereira B, Déchelotte P, Kanold J. Cryopreservation of ovarian tissue in pediatric patients undergoing sterilizing chemotherapy. *Hum Fertil (Camb)*. 2016 Apr;19(1):23-31.

Ding W, Wang W, Zhou B, Zhang W, Huang P, Shi F, Taya K.J Formation of primordial follicles and immunolocalization of PTEN, PKB and FOXO3A proteins in the ovaries of fetal and neonatal pigs. *Reprod Dev*. 2010 Feb;56(1):162-8. Epub 2009 Dec 9.

Dittrich , Hackl J, Lotz L, Hoffmann I, Beckmann MW. Pregnancies and live births after 20 transplantations of cryopreserved ovarian tissue in a single center. *Fertil Steril*. 2015 Feb;103(2):462-8.

Froment P, Bontoux M, Pisselet C, Monget P, Dupont J. PTEN expression in ovine granulosa cells increases during terminal follicular growth. *FEBS Lett*. 2005 Apr 25;579(11):2376-82.

Goto M, Iwase A, Ando H, Kurotsuchi S, Harata T, Kikkawa F. PTEN and Akt expression during growth of human ovarian follicles. *J Assist Reprod Genet*. 2007 Nov;24(11):541-6.

Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 1996;17:121–55.

Gougeon A. Regulation of resting follicle activation. *Gynecol Obstet Fertil*. 2011 Sep;39(9):511-3.

Harada M, Osuga Y. Where are oncofertility and fertility preservation treatments heading in 2016? *Future Oncol*. 2016 Jun 22.

Hornick JE, Duncan FE, Shea LD, Woodruff TK. Isolated primordial follicles require a rigid physical environment to survive and grow in vitro. *Hum Reprod*. 2012 Jun;27(6):1801-10.

Hsueh AJ, Kawamura K, Cheng Y, Fauser BC. Intraovarian control of early folliculogenesis. *Endocr Rev*. 2015 Feb;36(1):1-24.

Jensen AK, Rechnitzer C, Macklon KT, Ifversen MR, Birkebæk N, Clausen N, Sørensen K, Fedder J, Ernst E, Andersen CY. Cryopreservation of ovarian tissue for fertility preservation in a large cohort of young girls: focus on pubertal development. *Hum Reprod*. 2017 Jan;32(1):154-164. Epub 2016 Nov 5.

Jin S, Lei L, Shea LD, Zelinski MB, Stouffer RL, Woodruff TK. Markers of growth and development in primate primordial follicles are preserved after slow cryopreservation. *Fertil Steril*. 2010 May 15;93(8):2627-32.

John GB, Shirley LJ, Gallardo TD, Castrillon DH. Specificity of the requirement for Foxo3 in primordial follicle activation. *Reproduction*. 2007 May;133(5):855-63.

Kawamura K, Cheng Y, Suzuki N, Deguchi M, Sato Y, Takae S, Ho CH, Kawamura N, Tamura M, Hashimoto S, Sugishita Y, Morimoto Y, Hosoi Y, Yoshioka N, Ishizuka B, Hsueh. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *AJ.Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Oct 22;110(43):17474-9.

Kawamura K, Kawamura N, Hsueh AJ. . Activation of dormant follicles: a new treatment for premature ovarian failure? *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2016 Jun;28(3):217-22.

Kim CH, Jeon GH. Fertility preservation in female cancer patients. *ISRN Obstet Gynecol*. 2012; 2012:807302.

Kim SY, Ebbert K, Cordeiro MH, Romero M, Zhu J, Serna VA, Whelan KA, Woodruff TK, Kurita T. Cell autonomous phosphoinositide 3-kinase activation in oocytes disrupts normal ovarian function through promoting survival and overgrowth of ovarian follicles. *Endocrinology*. 2015 Apr;156(4):1464-76.

Kim JY. Control of ovarian primordial follicle activation. *Clin Exp Reprod Med*. 2012 Mar;39(1):10-4.

Klempner SJ, Myers AP, Cantley LC. What a tangled web we weave: emerging resistance mechanisms to inhibition of the phosphoinositide 3-kinase pathway. *Cancer Discov*. 2013 Dec;3(12):1345-54.

Li J, Kawamura K, Cheng Y, Liu S, Klein C, Liu S, Duan EK, Hsueh AJ. Activation of dormant ovarian follicles to generate mature eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jun 1;107(22):10280-4.

Liu K, Rajareddy S, Liu L, Jagarlamudi K, Boman K, Selstam G, Reddy P. Control of mammalian oocyte growth and early follicular development by the oocyte PI3 kinase pathway: new roles for an old timer. *Dev Biol*. 2006 Nov 1; 299(1):1-11.

Liu L, Rajareddy S, Reddy P, Du C, Jagarlamudi K, Shen Y, Gunnarsson D, Selstam G, Boman K, Liu K. Infertility caused by retardation of follicular development in mice with oocyte-specific expression of Foxo3a. *Development*. 2007 Jan;134(1):199-209.

McLaughlin M, Kinnell HL, Anderson RA, Telfer EE Inhibition of phosphatase and tensin homologue (PTEN) in human ovary in vitro results in increased activation of primordial follicles but compromises development of growing follicles..Mol Hum Reprod. 2014 Aug;20(8):736-44.

Meng C, Shi F, Zhou Z, Huang R, Liu G, Watanabe G, Taya K.J Cellular Localization of Inhibin alpha-subunit, PKB/Akt and FoxO3a proteins in the ovaries of minipigs. Reprod Dev. 2007 Apr;53(2):229-36. Epub 2006 Nov 29.

Monniaux D. Driving folliculogenesis by the oocyte-somatic cell dialog: Lessons from genetic models. Theriogenology. 2016 Jul 1;86(1):41-53.

Nilsson EE, Savenkova MI, Schindler R, Zhang B, Schadt EE, Skinner MK. Gene bionetwork analysis of ovarian primordial follicle development. PLoS One. 2010 Jul 16;5(7):e11637.

Reddy P, Liu L, Adhikari D, Jagarlamudi K, Rajareddy S, Shen Y, Du C, Tang W, Hämäläinen T, Peng SL, Lan ZJ, Cooney AJ, Huhtaniemi I, Liu K. Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. Science. 2008 Feb 1;319(5863):611-3.

Reddy P, Zheng W, Liu K. Mechanisms maintaining the dormancy and survival of mammalian primordial follicles. Trends Endocrinol Metab. 2010 Feb;21(2):96-103.

Salama M, Woodruff TK. New advances in ovarian autotransplantation to restore fertility in cancer patients. Cancer Metastasis Rev. 2015 Dec;34(4):807-22.

Shea LD, Woodruff TK, Shikanov A. Bioengineering the ovarian follicle microenvironment. Annu Rev Biomed Eng. 2014 Jul 11;16:29-52.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin*. 2016 Jan - Feb;66(1):7-30.

Silber S. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: scientific implications. *J Assist Reprod Genet*. 2016 Dec;33(12):1595-1603. Epub 2016 Oct 8.

Smits J, Dolmans MM, Donnez J, Fortune JE, Hovatta O, Jewgenow K, Picton HM, Plancha C, Shea LD, Stouffer RL, Telfer EE, Woodruff TK, Zelinski MB. Current achievements and future research directions in ovarian tissue culture, in vitro follicle development and transplantation: implications for fertility preservation. *Hum Reprod Update*. 2010 Jul-Aug;16(4):395-414.

Sonigo C, Sermondade N, Benard J, Benoit A, Shore J, Sifer C, Grynberg M. The past, present and future of fertility preservation in cancer patients. *Future Oncol*. 2015 Sep 11.

Tarnawa ED, Baker MD, Aloisio GM, Carr BR, Castrillon DH. Gonadal expression of Foxo1, but not Foxo3, is conserved in diverse Mammalian species. *Biol Reprod*. 2013 Apr 25;88(4):103.

Telfer EE, Zelinski MB. Ovarian follicle culture: advances and challenges for human and nonhuman primates. *Fertil Steril*. 2013 May;99(6):1523-33.

The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Ovarian tissue cryopreservation: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2014 Mar 28. pii: S0015-0282(14)00205-2.

Thomas FH, Vanderhyden BC. Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth. *Reprod Biol Endocrinol*. 2006 Apr 12;4:19.

Tuck AR, Robker RL, Norman RJ, Tilley WD, Hickey TE. Expression and localisation of c-kit and KITL in the adult human ovary. *J Ovarian Res.* 2015 May 26;8:31.

Woodruff TK. Oncofertility: a grand collaboration between reproductive medicine and oncology. *Reproduction.* 2015 Sep;150(3):S1-10.

Zapardiel I, Cruz M, Diestro MD, Requena A, Garcia-Velasco JA. Assisted reproductive techniques after fertility-sparing treatments in gynaecological cancers. *Hum Reprod Update.* 2016 Apr;22(3). pii: dmV066.

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 Nov-Dec;21(6):779-86.

Zhang H, Risal S, Gorre N, Busayavalasa K, Li X, Shen Y, Bosbach B, Brännström M, Liu K. Somatic cells initiate primordial follicle activation and govern the development of dormant oocytes in mice. *Curr Biol.* 2014 Nov 3;24(21):2501-8.