

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**EFEITOS DA RADIAÇÃO IONIZANTE NA
MATURAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS: BUSCA POR
MODELOS DE ESTUDO EM RADIOBIOLOGIA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Bruno Tomazele Rovani

**Santa Maria, RS, Brasil
2015**

**EFEITOS DA RADIAÇÃO IONIZANTE NA MATURAÇÃO DE
OÓCITOS BOVINOS: BUSCA POR MODELOS DE ESTUDO
EM RADIOBIOLOGIA**

Bruno Tomazele Rovani

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Liliane de Freitas Bauermann
Coorientador: Prof. Dr. Paulo Bayard Dias Gonçalves

Santa Maria, RS, Brasil
2015

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Tomazele Rovani, Bruno
Efeitos da radiação ionizante na maturação de oócitos
bovinos: busca por modelos de estudo em radiobiologia /
Bruno Tomazele Rovani.-2015.
49 p.; 30cm

Orientadora: Liliane de Freitas Bauermann
Coorientador: Paulo Bayard Dias Gonçalves
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2015

1. Radiação ionizante 2. Infertilidade 3. Modelo
bovino 4. Reparo do DNA 5. qRT-PCR I. de Freitas
Bauermann, Liliane II. Bayard Dias Gonçalves, Paulo III.
Título.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado**

**EFEITOS DA RADIAÇÃO IONIZANTE NA MATURAÇÃO DE
OÓCITOS BOVINOS: BUSCA POR MODELOS DE ESTUDO EM
RADIOBIOLOGIA**

Elaborada por
Bruno Tomazele Rovani

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA

Liliane de Freitas Bauermann, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Dr^a. (UFSM)

Gilberti Helena Hubscher Lopes, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, 21 de agosto de 2015.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família por me proporcionar um lar com muito carinho, aos meu pais pelo amor, educação e apoio incondicional, especialmente nos momentos de dificuldades e incertezas, e às minhas irmãs pela amizade, confiança, companheirismo, cumplicidade e pelas boas risadas.

Aos meus amigos, os quais considero como minha família, pelos ensinamentos de vida, parceria, confiança, cumplicidade e pelos bons momentos de descontração.

À professora Liliane, que me acolheu como um filho em seu laboratório e foi minha guia durante a carreira acadêmica, pelos ensinamentos transmitidos, pela ótima convivência, paciência, carinho, amizade e confiança.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia Experimental (LaFEx) pela amizade, companheirismo e por proporcionarem um ótimo ambiente de convívio durante minha vida acadêmica.

Ao professor Paulo Bayard, sempre atencioso, pela parceria e por ceder prontamente a estrutura do Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal (BioRep) para realização dos experimentos.

Aos integrantes do BioRep pelo suporte e auxílio nos experimentos, especialmente a Monique e ao Vitor, os quais sempre estiveram dispostos a ajudar e que foram cruciais para o desenvolvimento deste trabalho, agradeço por toda a ajuda, atenção e paciência.

Ao Serviço de Radioterapia do Hospital Universitário de Santa Maria por permitir a realização dos procedimentos de irradiação das amostras biológicas, em especial ao físico Tadeu Baumhardt pelo auxílio técnico nos experimentos e pela atenção.

À Universidade Federal de Santa Maria que desde o início da minha carreira acadêmica me recebeu e acolheu muito bem, e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade e pelo apoio durante o desenvolvimentos deste trabalho.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigado!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

EFEITOS DA RADIAÇÃO IONIZANTE NA MATURAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS: BUSCA POR MODELOS DE ESTUDO EM RADIOBIOLOGIA

AUTOR: BRUNO TOMAZELE ROVANI
ORIENTADORA: LILIANE DE FREITAS BAUERMANN
COORIENTADOR: PAULO BAYARD DIAS GONÇALVES
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 21 de agosto de 2015.

A aplicação médica da radiação ionizante (RI) na radioterapia tem sido crucial no tratamento de diversos tipos de câncer devido a sua ação lesiva as células tumorais, decorrente da interação direta com as moléculas de DNA ou indireta com as moléculas de H₂O (radiólise, produzindo Espécies Reativas do Oxigênio). Ambas as interações podem induzir mutações gênicas e quebras na estrutura física do DNA, induzindo a morte celular. Entretanto, em decorrência do tratamento radioterápico, também podem ocorrer danos as células saudáveis. Mulheres tratadas com irradiação abdominal, pélvica ou irradiação total do corpo, podem apresentar danos permanentes ao ovário e perda dos folículos primordiais, resultando em disfunção uterina, menopausa precoce, abortos espontâneos e infertilidade. Visando investigar os possíveis danos as células saudáveis gerados no tratamento radioterápico e suas consequências, neste estudo foram irradiados ovários bovinos, os quais constituem um bom modelo de estudo para eventos reprodutivos na mulher. Em um primeiro experimento, após a irradiação dos ovários (doses de 0,9 Gy, 1,8 Gy, 3,6 Gy e 18,6 Gy), oócitos foram selecionados e cultivados por 24h, momento no qual foi efetuada análise da maturação nuclear. Em um segundo experimento, após a irradiação dos ovários (1,8 Gy e 18,6 Gy), oócitos foram selecionados e cultivados por 1h, momento no qual avaliou-se a frequência de danos no DNA por meio da detecção de imunofluorescência da histona H2AX fosforilada (γ H2AX). No mesmo momento (1h), células do cumulus foram separadas para análise da expressão de genes envolvidos nos mecanismos de reparo do DNA (53BP1, RAD52, ATM, Ku70 e Ku80), apoptose (BAX) e controle do ciclo celular (CCND2) através das técnicas de extração de RNA e qRT-PCR. Os resultados mostraram que as doses de radiação testadas não afetam a taxa de maturação nuclear dos oócitos, sendo que não foi possível detectar danos ao DNA pela presença da histona γ H2AX. Todos os genes avaliados foram expressos, porém a RI provocou uma alteração na abundância de mRNA em apenas três: RAD52, BAX e CCND2. Concluímos que as doses de radiação avaliadas não afetaram a evolução do processo de maturação em oócitos bovinos obtidos de folículos antrais. Entretanto, os efeitos da RI em folículos pré-antrais permanece desconhecido.

Palavras-chave: Radiação ionizante. Infertilidade. Modelo bovino. Reparo do DNA. qRT-PCR.

ABSTRACT

Master Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

EFFECT OF IONIZING RADIATION ON BOVINE OOCYTE MATURATION: SEARCHING FOR RADIOBIOLOGY MODELS OF STUDY

AUTHOR: BRUNO TOMAZELE ROVANI
ADVISOR: LILIANE DE FREITAS BAUERMAN
CO-ADVISOR: PAULO BAYARD DIAS GONÇALVES
Date and place of the defense: Santa Maria, August 21, 2015.

The medical application of ionizing radiation in radiotherapy has been crucial in the treatment of cancer due to its harmful action tumor cells, by direct interaction with DNA molecules or indirectly with the H₂O molecules (radiolysis, producing Free Radicals and Reactive Oxygen Species). Both interactions may cause genetic mutations in DNA breakage and physical structure, inducing cell death. However, as a result of radiotherapy, damage to the healthy cells can occur. Women treated with irradiation abdominal, pelvic or total body irradiation, may present permanent damage and loss of ovarian primordial follicles, resulting in uterine dysfunction, premature menopause, miscarriage and infertility. In order to investigate the possible damage and consequences to the healthy cells generated by radiotherapy, in this study bovine ovaries were irradiated, which are considered a good model to study reproductive events in women. In a first experiment, after irradiation of the ovaries (dose 0,9Gy, 1,8Gy, and 3,6Gy 18,6Gy), oocytes were selected and grown for 24 hours at which time analysis of nuclear maturation were conducted. In a second experiment, after irradiation of the ovaries (1,8Gy and 18,6Gy), oocytes were selected and cultivated for 1h, at which time we assessed the frequency of DNA damage by Immunofluorescence detection of phosphorylated histone H2AX (γ H2AX). At the same time (1h) cumulus cells were separated for expression analysis of genes involved in DNA repair mechanisms (53BP1, RAD52, ATM, Ku70 and Ku80), apoptosis (BAX) and cell cycle control (CCND2) through RNA extraction and qRT-PCR. Results showed that radiation doses tested did not affect the nuclear maturation rate and it was not possible to detect DNA damage by the presence histone γ H2AX. All analyzed genes were expressed but IR only altered the mRNA abundance of: RAD52, BAX and CCND2. We conclude that the assessed radiation doses did not affect the evolution of the maturation process in oocytes obtained from antral follicles. However, the effects of IR in preantral follicles remains unknown.

Keywords: Ionizing radiation. Infertility. Bovine model. DNA repair. qRT-PCR.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO

Figure 1	36
Figure 2	36
Figure 3	37
Figure 4	38
Figure 5	39
Figure 6	39
Figure 7	40

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Table 1	35
---------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

γ H2AX – Phosphorylated H2A histone family, member X

53BP1 – p53 binding protein 1

ATM – Ataxia telangiectasia mutated

BAX – BCL2-associated X protein

CCND2 – Cyclin D2

DNA - Deoxyribonucleic acid

DSB – DNA double-stranded break

H2AX - H2A histone family, member X

HR – Homologous recombination

IR – Ionizing radiation

Ku70 – 70 kDa subunit of Ku antigen

Ku80 – 80 kDa subunit of Ku antigen

mRNA - Messenger Ribonucleic Acid

NHEJ – Non-homologous end-joining

RAD50 – RAD50 homolog, DNA repair protein

RAD51 – RAD51 homolog, DNA repair protein

RAD52 – RAD52 homolog, DNA repair protein

ROS - Reactive oxygen species

SSB – DNA single-stranded break

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	11
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1.	Radiações ionizantes e suas interações com sistemas biológicos	13
2.2.	Resposta celular e mecanismos de reparo	14
2.3.	Ciclo celular e radiosensibilidade	14
2.4.	Radioterapia, sobrevida de pacientes e futuro reprodutivo	15
2.5.	Foliculogênese e oogênese em mamíferos	16
2.6.	Modelos de estudo em radiobiologia: modelo bovino	17
3.	OBJETIVOS	19
3.1.	Objetivo geral	19
3.2.	Objetivos específicos	19
4.	ARTIGO	20
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
6.	CONCLUSÃO	44
7.	REFERÊNCIAS	45

1. INTRODUÇÃO

A aplicação médica da radiação ionizante (RI) tem sido crucial no tratamento de diversos tipos de câncer, devido a sua capacidade de destruir as células cancerígenas. Estima-se que mais de 50% dos pacientes diagnosticados com câncer são tratados através da radioterapia (por si só ou em combinação com a quimioterapia ou cirurgia) (DING et al., 2013), o que tem gerado um aumento significativo nas taxas de sobrevivência, especialmente em crianças e adolescentes (CHEMAITILLY et al., 2006).

O principal alvo da radioterapia é o DNA das células cancerígenas, que são sensíveis aos efeitos deletérios da RI por possuírem deficiências no sistema de reparo (BARBERA, 2003; HOSSEINIMEHR, 2015), o que pode produzir lesões direta ou indiretamente. No efeito direto a RI interage diretamente com a molécula de DNA atingindo as bases nitrogenadas que o compõem, enquanto no efeito indireto há a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) através da radiólise da água, as quais irão interagir com o DNA provocando danos (NIKITAKI et al., 2015). O efeito direto resulta em quebras de fita simples (SSBs - *single-strand breaks*) e / ou quebras de fita dupla (DSBs - *double-strand breaks*) que induzem mutações e rearranjo estrutural generalizada do genoma, potencialmente causando a morte celular (LORD; ASHWORTH, 2012). É por meio destes mecanismos que a radioterapia causa destruição das células tumorais, mas também representa uma ameaça à integridade e sobrevivência das células normais circunvizinhas (AHMED et al., 2014).

Logo, também podem haver danos nas células saudáveis em decorrência do tratamento radioterápico, sendo os ovários órgãos alvo para tratamentos antiproliferativos (LO PRESTI et al., 2004). Mulheres tratadas com irradiação abdominal, pélvica ou irradiação total do corpo, podem apresentar danos permanentes para o ovário e perda dos folículos primordiais, resultando em infertilidade e menopausa precoce (WALLACE et al., 2003). Alguns indicadores de prognóstico importantes para o desenvolvimento de falência ovariana são a idade no momento da exposição à radioterapia, forma de irradiação (por exemplo, irradiação pélvica, abdominal) e o fracionamento (SONMEZER; OKTAY, 2004).

Estudos demonstraram que, enquanto uma dose esterilizante eficaz ao nascer é de 20,3 Gy, aos 10 anos é de 18,4 Gy, aos 20 anos 16,5 Gy, e aos 30 anos 14,3 Gy (WALLACE et al., 2005). Em outro estudo, Wallace et al., utilizaram um modelo matemático para demonstrar que uma dose menor que 2 Gy é suficiente para destruir a metade da população de oócitos humanos (DL₅₀) e mais do que 6 Gy geralmente provoca a falha ovariana irreversível

(WALLACE et al., 2003). Além disso, a insuficiência ovariana foi relatada em 90% dos pacientes que foram acompanhados a longo prazo após irradiação de corpo inteiro (10-15 Gy, ~2 Gy por fração) e em 97% das mulheres tratadas com irradiação abdominal fracionada (20-30 Gy, 1-2 Gy por fração) durante a infância (WALLACE et al., 1989). Pacientes jovens tratadas com quimioterapia ou radioterapia atualmente podem esperar uma vida normal devido a eficácia desses tratamentos, entretanto também podem estar sofrendo danos significativos aos ovários (LO PRESTI et al., 2004). Consequentemente, os efeitos imediatos e tardios no tratamento estão ganhando maior importância para os sobreviventes e suas famílias (YURUT-CALOGLU et al., 2015).

Diante deste contexto, tornam-se imprescindíveis maiores investigações sobre os mecanismos envolvidos na interação da RI com o sistema reprodutivo, a fim de evitar ou reduzir potenciais danos e desenvolver novas alternativas para a preservação da fertilidade. Assim, para se obter uma melhor compreensão de como a função ovariana pode ser afetada pela radiação ionizante, estudos em modelos animais têm sido desenvolvidos a fim de verificar seus efeitos sobre o gameta feminino (PESTY et al., 2010). Bovinos tem se estabelecido como um bom modelo para o estudo da foliculogênese ovariana humana devido às semelhanças na dinâmica do desenvolvimento folicular (BAERWALD, 2009), controle endócrino (MALHI et al., 2005), ovulação (monovulatórios), bem como conteúdo lipídico de oócitos e metabolismo embrionário (LANGBEEN et al., 2015). Vale destacar que a busca por modelos que se assimilem ou simulem condições fisiológicas aos seres humanos tem sido um grande desafio para a comunidade científica, especialmente modelos *in vitro*.

Portanto, este estudo buscou avaliar os possíveis efeitos da dose de RI terapêutica fracionada padrão para o tratamento do câncer de ovário em humanos (1,8 Gy), metade e o dobro desta dose (0,9 Gy e 3,6 Gy, respectivamente) e a dose biológica equivalente ao tratamento total (18,6 Gy) na maturação de oócitos, utilizando um modelo bovino *in vitro*. Para tanto, foram efetuadas: (a) avaliação da taxa de maturação nuclear oocitária; (b) análise de danos ao DNA por detecção de imunofluorescência da histona H2AX fosforilada (γ H2AX); e (c) expressão de genes envolvidos nas vias de reparo do DNA (53BP1, RAD52, ATM, Ku70 e Ku80), apoptose (BAX) e ciclo celular (CCND2) em células do cumulus, através da extração de RNA e qRT-PCR.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Radiações ionizantes e suas interações com sistemas biológicos

Conceitualmente, radiação ionizante é a radiação eletromagnética ou partícula de alta energia que, ao interagir com o meio absorvedor, tem a propriedade de transferir, integral ou parcialmente, energia para os átomos e moléculas deste meio, resultando no fenômeno conhecido como ionização (KAPLAN, 1978). Assim, se a radiação tiver energia suficiente para ejetar um ou mais elétrons de seus orbitais nos átomos ou moléculas, ela é dita ionizante (HALL, 2012) Devido a essas características, sua interação com sistemas biológicos pode ocorrer basicamente de forma direta ou indireta, as quais dependem de fatores como energia e tipo de radiação incidente (TAUHATA, L., 2003).

Raios gama e X, por exemplo, são radiações que interagem de modo indireto com as células, provocando a quebra de moléculas de água (radiólise) e consequente formação de Radicais Livres (entidades químicas altamente reativas em decorrência da presença de elétrons desemparelhados na última camada) e Espécies Reativas do Oxigênio (moléculas geradas pela redução incompleta do oxigênio e altamente reativas), as quais irão atingir o DNA causando danos. Já partículas pesadas como as partículas alfa e nêutrons interagem de forma direta, ou seja, atingem preferencialmente as bases nitrogenadas que compõem a estrutura do DNA, provocando danos através do depósito de energia pela radiação ionizante (HALL, 2012).

O DNA é onde estão armazenadas as informações genéticas, as quais são responsáveis pelo funcionamento celular, hereditariedade e codificação da estrutura molecular de todas as enzimas das células, sendo a molécula chave no processo de estabelecimento de danos biológicos (CNEN, 2005). Devido à exposição à radiação ionizante (VAN ATTIKUM; GASSER, 2005), e espécies reativas do oxigênio (BILSLAND; DOWNS, 2005), as moléculas de DNA podem apresentar basicamente dois tipos de danos: mutações gênicas (alterações de pares de bases) e quebras (perda da integridade física do material genético). Logo, podem ocorrer quebras de fita simples e quebras de fita dupla do DNA, danos nas bases nitrogenadas, entre outros (SAPORA et al., 1991; LEHNERT, 2008). A quebra da fita dupla de DNA está entre os mais perigosos indutores de danos genotóxicos e de morte celular (RICH, 2000).

2.2. Resposta celular e mecanismos de reparo

Uma das primeiras respostas celulares as quebras de fita dupla do DNA causadas pela radiação ionizante é a fosforilação da histona H2AX. Em células de mamíferos a H2AX corresponde a cerca de 10% do total de histonas H2A, variando entre as diferentes linhagens celulares (MACPHAIL et al., 2003). A H2AX fosforilada, conhecido como γ H2AX, forma "focos" de fosforilação nas DSB induzidas por radiação ionizante (ROGAKOU et al., 1998, 1999). Estes focos podem ser detectáveis e desempenham um papel importante na identificação de danos ao DNA (SUDHAKARAN et al., 2014).

Em relação ao processo de reparo dessas DSBs, basicamente duas vias estão envolvidas: a via de recombinação homóloga (HR) e a de união terminal não homóloga (NHEJ). Ambas são controladas por um grupo bem orquestrados de genes que parecem estar presentes em praticamente todos os organismos (BRENDDEL et al., 1997). A via HR é livre de erros e está ativa durante as fases S e na transição G2-M do ciclo celular onde uma cromátide irmã atua como molde para o reparo (JOHNSON; JASIN, 2000). Na via NHEJ as porções finais da fita dupla de DNA quebrada são ligadas independentemente de pertencerem ao mesmo cromossomo e, por isso, essa via é sujeita a erros que podem ocasionar mutações ou perda de funções em partes específicas do DNA (BRANZEI; FOIANI, 2008). Nas células de mamíferos, a via NHEJ está predominantemente ativa durante a transição das fases G0 para G1 (LIEBER, 2010).

Algumas das proteínas especificamente envolvidas na recombinação homóloga são a RAD51, RAD52, ATM, 53BP1, e as envolvidas na união terminal não homóloga incluem o heterodímero Ku70/Ku80 (RISTIC et al., 2003). Várias investigações ainda tentam elucidar como a célula determina se o reparo ocorrerá via HR ou NHEJ. Existe uma hipótese de que a via de reparo escolhida pela célula depende de uma competição entre proteínas da família Ku ou RAD. Nesse modelo se as proteínas Ku70 e Ku80 forem as primeiras a se ligar na região danificada do DNA a reparação ocorreria pela via NHEJ. Em contrapartida, se as proteínas pertencentes a família RAD (principalmente RAD51 e 52) forem as primeiras a se ligar ao DNA a reparação aconteceria pela via HR (HIOM, 1999). Entretanto, ainda não existe um consenso sobre o mecanismo que a célula utiliza para determinar se o reparo ocorrerá pela via HR ou NHEJ (LIEBER, 2010).

2.3. Ciclo celular e radiosensibilidade

Uma importante característica da interação da radiação ionizante com a célula é que a resposta biológica depende da fase do ciclo celular no qual se encontra a célula alvo (HALL, 2012). Assim, a radiosensibilidade celular é intrinsecamente relacionada com a fase em que se encontra o ciclo, sendo que quanto mais proliferativa mais radiosensível. Uma maior radiosensibilidade celular é encontrada nas fases M e G2, havendo uma maior resistência na fase S. Como citado anteriormente, a fase M é extremamente sensível à radiação e acredita-se que este fato ocorra devido à compactação do DNA, aumentando a probabilidade de interação (DE ANDRADE; BAUERMANN, 2010). Além disso, sabe-se que células imaturas, indiferenciadas e que apresentam divisão mitótica ativa são mais radiosensíveis, já que uma lesão no DNA pode fazer com que a célula tenha dificuldade em dividir o material genético entre as células filhas, as quais podem morrer após uma ou duas divisões subsequentes ou gerar indivíduos com aberrações genéticas. As células do epitélio intestinal, células germinativas epiteliais e ósseas, oogônias e espermatogônias se enquadram entre células altamente vulneráveis à ação das radiações ionizantes. Sendo assim, caso mutações ocorram na linhagem de células geradoras de gametas, existe a possibilidade de transferência dessas mutações do indivíduo irradiado para sua descendência (CNEN, 2005). Mutações na célula-ovo podem inviabilizar seu desenvolvimento e na fase embrionária, podem resultar em má formação de tecidos, órgãos e membros. Por outro lado, células maduras, diferenciadas e que não apresentam divisão mitótica ativa (ou pouco ativa) são mais radioresistentes, como por exemplo, as células musculares e as células nervosas (CNEN, 2005).

2.4. Radioterapia, sobrevida de pacientes e futuro reprodutivo

A radiação ionizante vem sendo muito utilizada como alternativa no tratamento de diversos tipos de câncer, justamente por sua capacidade de destruição das células tumorais, as quais são deficientes quanto aos mecanismos de reparo (LOMAX, 2013). Estima-se que mais de 50% dos pacientes diagnosticados com câncer recebem tratamento radioterápico (por si só ou em combinação com a quimioterapia ou a cirurgia) (DING et al., 2013). A maioria dos tratamentos de radioterapia são atualmente realizados através de feixes externos de fótons e elétrons produzidos por aceleradores lineares (PÁSSARO, 2011). Estes últimos são equipamentos que usam ondas eletromagnéticas de alta frequência para acelerar partículas carregadas através de um tubo linear. O feixe de elétrons de energia alta pode ser usado para tratar tumores superficiais, ou podem colidir num alvo para produção de raios X, para

tratamento de tumores mais profundos (KHAN, 2003). Estes tratamentos têm gerado uma alta sobrevida aos pacientes, especialmente jovem-adultos (CHEMAITILLY et al., 2006).

Entretanto, na radioterapia também podem ocorrer danos as células saudáveis, sendo o ovário um órgão-alvo para tratamentos antiproliferativos (MEIROW, 2001; LO PRESTI et al., 2004). Mulheres tratadas com irradiação abdominal, pélvica ou de corpo inteiro, podem apresentar danos permanente aos ovários e perda de folículos primordiais, resultando em redução da fertilidade e uma menopausa precoce (WALLACE, 2003; GREEN et al., 2009; MEIROW et al., 2010; TEH et al., 2014). Essa exposição pode causar dano direto ao DNA das células foliculares ovarianas, levando a atresia e diminuição da reserva folicular ovariana. Isso pode acelerar o declínio natural dos números de folículos, levando a diminuição da produção hormonal e disfunção uterina (WO; VISWANATHAN, 2009).

Alguns indicadores de prognóstico importantes para o desenvolvimento de falência ovariana são a idade no momento da exposição à radioterapia e fracionamento (SONMEZER; OKTAY, 2004). Enquanto uma dose esterilizante eficaz ao nascer é de 20,3 Grays (Gy = unidade de dose de radiação absorvida), aos 10 anos de idade ela passa a ser de 18,4 Gy; já aos 20 anos de idade, 16,5 Gy; e aos 30 anos de idade, 14,3 Gy (WALLACE et al., 2005). Além disso, estimou-se através de um modelo matemático que uma dose menor que 2 Gy é suficiente para destruir a metade da população de oócitos humanos (LD₅₀), e mais do que 6 Gy geralmente provocam falha irreversível do ovário (WALLACE, 2003). Em um estudo realizado por este mesmo autor, a insuficiência ovariana foi relatada em 90% de pacientes que foram acompanhadas a longo prazo após o irradiação de corpo inteiro fracionada (10-15 Gy; 2 Gy por fração), e em 97% de mulheres tratadas com irradiação abdominal fracionada (20-30 Gy; 1- 2 Gy por fração), durante a infância (WALLACE, 1989). Logo, os efeitos imediatos e tardios do tratamento radioterápico sobre a fertilidade estão ganhando maior importância para o crescente número de sobreviventes de câncer, especialmente pediátricos e jovens.

2.5. Foliculogênese e oogênese em mamíferos

Nos mamíferos, o início da foliculogênese (formação e crescimento dos folículos ovarianos) ocorre na fase fetal. As células germinativas primordiais originam-se no saco vitelínico e migram para a gônada em formação. Em seguida, as células germinativas multiplicam-se por mitose e originam grupos de oogônias. Em uma primeira etapa de diferenciação, são constituídas as células da pré-granulosa. Por sua vez, as oogônias

diferenciam-se em oócitos, que associados as células da granulosa, constituem os folículos primordiais. Os oócitos iniciam o processo de divisão meiótica, o qual se interrompe na prófase da meiose I, no estágio de diplóteno. Esta quiescência persiste até o recrutamento folicular, seja este no início da puberdade ou nos últimos dias da fase reprodutiva da fêmea (SOTO-SUAZO, 2005; VAN DEN HURK, 2005). Coincidindo com o início da meiose, os folículos primordiais individualizam-se, caracterizando-se por uma camada de células granulosas pavimentosas circundando o oócito. Nesta etapa da foliculogênese, há degeneração de um expressivo número de folículos primordiais, sendo a parcela remanescente denominada como população de reserva de folículos ou *pool* folicular. Uma vez constituída esta população folicular, alguns folículos primordiais são regularmente recrutados. Desta forma, o processo de recrutamento folicular ocorre até o término da vida reprodutiva da fêmea (VAN DEN HURK, 2005).

Do ponto de vista evolutivo, os folículos ovarianos podem ser classificados em dois grupos: folículos pré-antrais (não cavitários) e antrais (cavitários). Os folículos pré-antrais representam cerca de 90 a 95% de toda a população folicular, armazenando assim, a maioria dos oócitos presentes em ovários de mamíferos. A população folicular no ovário ao nascimento foi estimada em 2.000.000 folículos em mulheres e 235.000 em vacas (GONÇALVES; DE FIGUEIREDO; FREITAS, 2008). Entretanto, *in vivo*, apesar da existência de milhares de oócitos, a grande maioria será eliminada por meio de um processo fisiológico conhecido por atresia folicular (degeneração dos folículos). As ações de toxinas, agentes virais e da radiação ionizante podem ocasionar uma aceleração nesse processo de atresia folicular, levando a falência ovariana prematura (FOP). A FOP é uma condição que acarreta amenorréia, infertilidade, hipogonadismo e níveis elevados de gonadotrofinas em mulheres com menos de 40 anos (GOSWAMI; CONWAY, 2005).

2.6. Modelos de estudo em radiobiologia: modelo bovino

A fim de evitar ou reduzir potenciais danos e desenvolver novas alternativas para a preservação da fertilidade, torna-se crucial a busca por modelos de estudo que permitam maiores investigações sobre os mecanismos envolvidos na interação da RI com o sistema reprodutivo. Assim, estudos em modelos animais têm sido desenvolvidos a fim de verificar os efeitos da RI sobre o gameta feminino (PESTY et al., 2010). Bovinos tem se estabelecido como um bom modelo para o estudo da foliculogênese ovariana humana devido às

semelhanças na dinâmica do desenvolvimento folicular (BAERWALD, 2009), controle endócrino (MALHI, 2005), ovulação (monovulatórios), bem como conteúdo lipídico de oócitos e metabolismo embrionário (LANGBEEN et al., 2015). A utilização de uma espécie monovulatória no estudo da fisiologia reprodutiva permite uma maior aproximação ao que ocorre em humanos (ADAMS; 2012; GINTHER, 2012), sendo que a maior parte do conhecimento utilizado para manipulação da fisiologia e tratamento em mulheres foi gerado em roedores, tendo estes por característica ovulação de múltiplos folículos (JAISWAL et al., 2009). Por isso, surge a necessidade da disponibilidade de modelos de espécies que mais se aproximem da fisiologia humana para maior sucesso no tratamento de patologias bem como a manutenção da fertilidade. Vale destacar que a busca por modelos que se assimilem ou simulem condições fisiológicas aos seres humanos tem sido um grande desafio para a comunidade científica, especialmente modelos *in vitro*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar os possíveis efeitos da dose de RI terapêutica fracionada padrão para o tratamento do câncer de ovário em humanos (1,8 Gy), metade e o dobro desta dose (0,9 Gy e 3,6 Gy, respectivamente) e a dose biológica equivalente ao tratamento total (18,6 Gy) na maturação de oócitos, utilizando um modelo bovino *in vitro*.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a taxa de maturação nuclear oocitária;
- Analisar danos ao DNA por detecção de imunofluorescência da histona H2AX fosforilada (γ H2AX);
- Analisar a expressão de genes envolvidos nas vias de reparo do DNA (53BP1, RAD52, ATM, Ku70 e Ku80), apoptose (BAX) e ciclo celular (CCND2) em células do cumulus, através da extração de RNA e qRT-PCR.

4. ARTIGO

A metodologia deste trabalho bem como os resultados e a discussão, estão organizados na forma de um manuscrito científico submetido para a publicação na revista *Experimental Cell Research*.

TRABALHO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO:

Analysis of maturation, DNA damage and repair gene expression of bovine oocyte and cumulus cells submitted to ionizing radiation

**Bruno Tomazele Rovani, Vitor Braga Rissi, Monique Tomazele Rovani,
Tadeu Baumhardt, Paulo Bayard Dias Gonçalves, Liliane de Freitas
Bauermann**

EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, 2015

1 ***Experimental Cell Research***

2

3 *Research Article*

4 **Analysis of maturation, DNA damage and repair gene expression**
5 **of bovine oocyte and cumulus cells submitted to ionizing radiation**

6 **Bruno Tomazele Rovani ^{1,*}, Vitor Braga Rissi ², Monique Tomazele Rovani ², Tadeu**
7 **Baumhardt ³, Paulo Bayard Dias Gonçalves ² and Liliane de Freitas Bauermann ⁴**

8

9 ¹ Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria,
10 Santa Maria, RS, Brazil

11 ² Laboratory of Biotechnology and Animal Reproduction, Federal University of Santa
12 Maria, Santa Maria, RS, Brazil

13 ³ University Hospital of Santa Maria - Radiotherapy Service, Federal University of Santa
14 Maria, Santa Maria, RS, Brazil

15 ⁴ Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa
16 Maria, RS, Brazil

17

18

19 * Corresponding author: brunorovani@gmail.com;

20 Tel.: +55-55-3220-9380

21

22 **Abstract:** The medical application of ionizing radiation (IR) has been crucial in the treatment
23 of cancer due to its harmful action on tumor cells DNA. However, damage to healthy cells
24 can occur in radiotherapy, including ovarian cells of females treated for cancer with
25 abdominal, pelvic or total body irradiation. It may cause permanent damage to the ovary,
26 impaired fertility and premature menopause. The aim of this study was to investigate the
27 effects of IR on oocyte bovine *in vitro* model. For this purpose, we exposed bovine ovaries to
28 ionizing radiation (0.9 Gy, 1.8 Gy, 3.6 Gy and 18.6 Gy) and aspirated the cumulus oocyte
29 complexes to evaluate: (a) oocyte nuclear maturation rate; (b) detection of phosphorylated
30 histone H2AX (γ H2AX); (c) expression of genes involved in DNA repair pathways, apoptosis
31 and cell cycle in cumulus cells. Results showed that the radiation doses tested did not affect
32 the oocyte maturation rate and it was not possible to detect significant DNA damage by
33 γ H2AX immunofluorescence. All genes tested in this study were expressed. The IR changed
34 the mRNA abundance of RAD52, BAX and CCND2. We conclude that the IR doses applied
35 did not affect the evolution of the oocyte maturation. However, the IR effect on preantral
36 follicles remains unclear.

37 **Keywords:** Ionizing radiation. Infertility. Bovine model. DNA repair gene. qRT-PCR.

38

39 **1. Introduction**

40 The medical application of ionizing radiation (IR) has been crucial in several cancer
41 treatment modalities due to its ability to destroy the carcinogenic cells. It is estimated that
42 more than 50% of diagnosed cancer patients receive radiation therapy (alone or in
43 combination with chemotherapy or surgery) [1]. This treatment has been responsible for
44 improvement in the survival rates, especially in children and adolescents [2]. The main target
45 of radiotherapy is the DNA of the carcinogenic cells, which is very sensitive to deleterious
46 effect of IR [3,4] and can produce lesions directly or indirectly. In the direct effect the RI
47 directly interacts with the DNA molecule reaching the nitrogenous, while the indirect effect
48 generates reactive oxygen species (ROS) through water radiolysis that can subsequently
49 damage DNA [5]. The direct effect results in single-strand breaks (SSB) and/or double-strand
50 breaks (DSB) that induce mutations and widespread structural rearrangement of the genome,
51 potentially causing cell death by apoptosis [6]. Through these mechanisms, radiotherapy
52 causes destruction of tumor cells, but also threatens the integrity and survival of surrounding
53 normal cells [7]. Thus, damage to healthy cells may also occur in radiation therapy, and the
54 ovary is a target organ for anti-proliferative treatments [8].

55 Females treated for cancer with abdominal, pelvic or total body irradiation (TBI) may
56 present permanent ovary damage and loss of primordial follicles, resulting in impaired
57 fertility and a premature menopause [9]. Some important prognostic indicators for
58 development of ovarian failure are age at the time of exposure to radiotherapy, extent and
59 type of radiation therapy (e.g., abdominal or pelvic external beam irradiation) and
60 fractionation schedule [10]. It has been showed that, whereas an effective sterilizing dose at
61 birth is 20.3 Grays (Gy = radiation absorbed dose unit), at 10 years old, it is 18.4 Gy; at 20
62 years old, 16.5 Gy; and at 30 years old, 14.3 Gy [11]. Besides, Wallace et al. used a
63 mathematical model to demonstrate that a dose of less than 2 Gy is enough to destroy half of
64 the human oocyte population (LD50), and more than 6 Gy usually causes irreversible ovarian
65 failure [9]. Ovarian failure has been reported in 90% of patients followed up long term after
66 TBI (10-15 Gy, ~2 Gy per fraction), and in 97% of the females treated with fractionated total
67 abdominal irradiation (20-30 Gy, 1-2 Gy per fraction) during childhood [12]. Young patients
68 treated with chemotherapy or radiotherapy, who can expect a normal life span, may suffer
69 significant damage to the ovary [8]. Consequently, early and late effects after treatment are
70 gaining greater importance for survivors, their families, and providers [13].

71 In this context, further studies on the mechanisms involved in the interaction of ionizing
72 radiation with the reproductive system become necessary in order to prevent or reduce
73 potential damage and develop new alternatives for fertility preservation. Thus, to give a better
74 insight on how the ovarian function can be disturbed by ionizing radiation, studies on animal

75 models have been developed to verify the effects upon the female gamete [14]. Bovine
76 animals have been established as a model for the study of human ovarian folliculogenesis due
77 to similarities in the dynamics of follicle development [15], endocrine control [16], single
78 ovulation, as well as oocyte lipid content and embryo metabolism [17]. It is noteworthy that
79 the search for models that closely reflect human biology is a major challenge, especially
80 related to *in vitro* models.

81 Therefore, this study was designed to evaluate the possible effects of the standard
82 fractional therapeutic dose of ionizing radiation for human ovarian cancer treatment (1.8 Gy),
83 half and double of that (0.9 Gy and 3.6 Gy, respectively) and the biological equivalent dose to
84 total treatment (18.6 Gy) on oocytes and cumulus cells, using an *in vitro* bovine model. It was
85 assessed by: (a) analyses of oocyte nuclear maturation rate; (b) histone γ H2AX detection; and
86 (c) expression of genes involved on DNA repair pathways (53BP1, RAD52, ATM, Ku70 and
87 Ku80), apoptosis (BAX) and cell cycle (CCND2).

88

89 **2. Material and Methods**

90 All chemicals were purchased from Sigma Chemicals Company (St. Louis, MO, USA),
91 unless otherwise indicated in the text.

92 **2.1. Collection and irradiation of the ovaries**

93 Cow ovaries were obtained from an abattoir (Silva abattoir, Santa Maria, RS, Brazil),
94 stored on isothermal vials with saline solution (0.9% NaCl at 30°C) containing penicillin (100
95 IU/ml) and streptomycin (50 μ g/ml) and transported to the Radiotherapy Service of Santa
96 Maria University Hospital (Santa Maria, RS, Brazil). A portion of the ovaries was irradiated
97 (view sections 2.2 and 2.3) in an acrylic tank (30cm x 30cm x 15cm) containing saline
98 solution with an Elekta linear accelerator, Precise System model (Elekta, Stockholm,
99 Sweden). Another portion of the ovaries was not submitted to irradiation (control group; n =
100 20 ovaries). Previously to the irradiation procedures, it was performed a Computed
101 Tomography (CT) with the acrylic tank to simulate the irradiation experiments in order to
102 guarantee that the ovaries received 100% of the radiation dose (Figure 1). The irradiation
103 procedures were previously authorized by the Hospital Research Management (Project
104 registration number: 118/2013) and conducted according to internal protocols.

105 **2.2. Experiment 1**

106 **2.2.1 In vitro maturation (IVM)**

107 After irradiation (0.9 Gy, 1.8 Gy, 3.6 Gy and 18.6 Gy; n = 20 ovaries per group), the
108 ovaries were transported from the Hospital to the Laboratory of Biotechnology and Animal
109 Reproduction (BioRep) in saline solution (0.9% NaCl, 30°C). The cumulus oocyte complexes

110 (COC) were aspirated with a vacuum pump (suction flow rate of 15 ml/min) from 2 to 8 mm
111 diameter follicles. The COC's were recovered and selected according to Leibfried and First
112 [18] under a stereomicroscope. COC's grade 1 and 2 were randomly distributed into 400 μ l of
113 maturation medium [19] and cultured in an incubator at 39°C in a saturated humidity
114 atmosphere containing 5% CO₂ and 95% air, for 24h, at which time nuclear maturation
115 analysis was performed. The tested radiation doses correspond to standard fractional
116 therapeutic dose for ovarian cancer treatment (1.8 Gy), half and double of that (0.9 Gy and 3.6
117 Gy, respectively) and the equivalent dose of a total treatment adapted for a single session of
118 irradiation (18.6 Gy).

119 **2.2.2 Assessment of nuclear maturation**

120 After the *in vitro* maturation period, cumulus cells from COC's were removed by
121 mechanical stirring (vortex). The oocytes were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min
122 followed by permeabilization of the nuclear membranes with 0.5% Triton X-100. For the
123 evaluation of nuclear maturation, oocytes were exposed to 10 μ g/ml bisbenzimidazole (Hoechst
124 33342) for 15min. The stained oocytes were evaluated between the slide and cover slip under
125 ultraviolet light with a fluorescence microscope. Classification was performed according to
126 the configuration of chromatin in: germinal vesicle (GV), germinal vesicle breakdown
127 (GVBD), metaphase I (MI), anaphase I (AI), telophase I (TI) and metaphase II (MII) [19].

128 **2.3. Experiment 2**

129 After irradiation of the ovaries (1.8 Gy and 18.6 Gy; n = 20 ovaries per group), the same
130 procedures of experiment 1 were performed for IVM. However, 1h after incubation, cumulus
131 cells from COC's were separated for analysis of gene expression involved on: (a) DNA repair
132 mechanisms including p53 binding protein 1 (53BP1), RAD52 homolog DNA repair protein
133 (RAD52), Ataxia telangiectasia mutated (ATM), 70 kDa subunit of Ku antigen (Ku70), and
134 80 kDa subunit of Ku antigen (Ku80); (b) apoptosis process including the BCL2-associated X
135 protein (BAX); and (c) cell cycle checkpoint including Cyclin D2 (CCND2). The gene
136 expression was assessed through quantitative Real-Time PCR techniques. At the same time,
137 oocytes were selected to assay of H2AX phosphorylated immunofluorescence detection.

138 **2.3.1 Immunofluorescence detection of phosphorylated histone H2AX**

139 Oocytes were fixed for 15-20 minutes in 4% paraformaldehyde and permeabilized in 1%
140 Triton X-100 in PBS (30 min at 37 °C). Fixed oocytes were then washed twice in blocking
141 solution (3% BSA and 0.2% Tween-20 in PBS) and maintained overnight in the presence of
142 the anti-phospho-H2AX (Serine 139) mouse monoclonal primary antibody (Upstate Cell
143 Signaling Solutions, NY, USA) diluted (1:1000) in blocking solution. Oocytes were then
144 washed thrice for 20 min each in blocking solution and incubated for 1 hour at room
145 temperature (24-26°C) in the presence of 1:500 diluted anti-mouse IgG Alexa 394[®] (Life

146 Technologies, Burlington, ON, CAN). Samples were washed twice (20 min each) in blocking
147 solution. After this period, DNA was stained by exposing the samples to 10 µg/ml of 4', 6-
148 diamidino-2-phenylindole (DAPI; Life technologies) in the blocking solution for 20 min. The
149 samples were then washed (20 min) with the blocking solution and mounted on microscope
150 slides using a drop of Mowiol. The slides were kept in a dark box and examined by
151 epifluorescence using a Leica DMI4000B microscope (Leica Microsystems, Buffalo Grove,
152 IL, USA). Images were recorded using a 340FX digital fluorescence camera and Leica LAS
153 software (Leica Microsystems). Nuclei were evaluated for the immunostaining signal and
154 classified as positive or negative.

155 **2.3.2. RNA extraction and qRT-PCR**

156 Total RNA was extracted from cumulus cells using Trizol protocol (Life Technologies)
157 according to the manufacturer's instructions. Quantitation and estimation of RNA purity was
158 performed using a NanoDrop (Thermo Scientific - Waltham, USA; Abs 260/280 nm ratio)
159 spectrophotometer. Ratios above 1.8 were considered pure, and samples below this threshold
160 were discarded. Complementary DNA was synthesized from 300 ng RNA, which was first
161 treated with 0.1U DNase, Amplification Grade (Life Technologies) for 5 min at 37°C. After
162 DNase inactivation at 65°C for 10 min, the samples were incubated in a final volume of 20 µl
163 with iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad, Hercules, CA, USA). Complementary DNA
164 synthesis was performed in three steps: 25°C – 5 min, 42°C – 30 min and 85°C – 5 min.
165 Quantitative polymerase chain reactions (qPCR) were conducted in a CFX384 thermocycler
166 (BioRad) using iQ SYBR Green Supermix (BioRad) and bovine specific primers (Table 1)
167 taken from the literature or designed using the Primer Express Software (Thermo Scientific).
168 Standard two-step qPCR was performed with initial denaturation at 95°C for 5 min followed
169 by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 sec and annealing/extension at 58°C for 30 sec.
170 Melting-curve analyses were performed to verify product identity. To optimize the qPCR
171 assay, serial dilutions of cDNA templates were used to generate a standard curve. The
172 standard curve was constructed by plotting the log of the starting quantity of the dilution
173 factor against the Ct value obtained during the amplification of each dilution. Reactions with
174 a coefficient of determination (R²) higher than 0.98 and efficiency between 95 to 105% were
175 considered optimized. The relative standard curve method was used to assess the amount of a
176 particular transcript in each sample. Samples were run in duplicate and results are expressed
177 in relation to the average Ct values for Cyclophilin B and Histone H2A as internal controls.

178 **2.4. Statistical analysis**

179 Maturation data were analyzed using the ANOVA test in a statistical model for categorical
180 data, using the PROC CATMOD (Categorical Data Analysis Procedures) by SAS software
181 (©SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA). Variation in mRNA expression was analyzed by
182 ANOVA and multiple comparisons between groups were performed by LSMeans Student's t
183 test using the JMP Software (JMP® 7.0, SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA). Continuous

184 data were tested for normal distribution using Shapiro-Wilk test and normalized when
185 necessary. In all analyzes a $p \leq 0.05$ was considered statistically significant. Non-categorical
186 data are presented as means \pm SEM.
187

188 **3. Results**

189 **3.1 Nuclear maturation of oocytes**

190 Nuclear maturation is considered a parameter of the viability and competence of the
191 oocyte. In our study, the analysis of nuclear maturation data between the groups did not show
192 differences, and high levels of maturation were identified in all IR tested doses (Figure 2).
193 The tested doses correspond to standard fractional therapeutic dose for ovarian cancer
194 treatment (1.8 Gy), half and double of that (0.9 Gy and 3.6 Gy, respectively) and the
195 biological equivalent dose to total treatment calculated for a single session of irradiation (18.6
196 Gy). Despite the analyzes having demonstrated no difference between groups in the nuclear
197 maturation, this does not mean that they did not suffered DNA damage. These data suggest
198 that if there was irradiation induced DNA damage, it was probably repaired, allowing the
199 oocyte to develop to the metaphase II stage. Then, we carried out immunofluorescence
200 detection of phosphorylated histone H2AX to verify possible DNA damage.

201 **3.2 Immunofluorescence histone γ H2AX detection**

202 One of the earliest responses to DSB induction is the phosphorylation of histone variant
203 H2AX at the break site. Phosphorylated H2AX, known as γ H2AX, forms “foci” at DSB
204 induced by ionizing radiation, which can be detectable. In our study, we tested the radiation
205 doses of 1.8 Gy and 18.6 Gy, in order to verify a possible DNA damage through detection of
206 histone γ H2AX by immunofluorescence assay. However, we did not detect significant
207 damage 1h after exposition to radiation doses. Just one γ H2AX foci to the dose of 1.8 Gy and
208 one γ H2AX foci to the 18.6 Gy were detected, out of twenty oocytes analyzed per group
209 (Figure 3).

210 **3.3 Assessment of gene expression**

211 Given that DSB are repaired through homologous recombination (HR) and non-
212 homologous end joining (NHEJ) in mammalian cells, we attempted to analyze some genes
213 involved in these pathways (53BP1, RAD52, ATM, Ku70 and Ku80), as well as a gene
214 involved in apoptosis (BAX) and another gene involved in cell cycle control (CCND2). In our
215 analysis, there was no significant variation in 53BP1 and ATM gene expressions. However, a
216 tendency of increase in 53BP1 expression was observed as the radiation dose increases
217 (Figure 4). The increasing radiation doses affect ($P < 0.05$) the abundance of mRNA encoding
218 RAD52 gene expression. Besides, it was observed a negative correlation between radiation
219 dose and gene expression, i.e., with an increasing dose there was a decrease in the expression

220 (Figure 4C). In relation to the genes involved in non-homologous end joining pathway, a
221 significant variation in Ku70 and Ku80 expression was not identified, but we observed a
222 tendency of increase in Ku70 and a tendency of decrease in ku80 expression when increasing
223 the radiation dose (Figure 5). The analysis of pro-apoptotic gene BAX showed a decrease of
224 mRNA abundance when increasing the radiation dose (Figure 6). Regarding the CCND2 gene
225 expression, the abundance of mRNA encoding was affected ($P < 0.05$) by 18.6Gy radiation
226 dose with a negative correlation, i.e., with an increasing dose there was a decrease in the
227 expression (Figure 7).

228

229 4. Discussion

230 The main findings of this study are: (1) the radiation doses tested (0.9 Gy, 1.8 Gy, 3.6 Gy
231 and 18.6 Gy) did not affect the oocyte maturation rate; (2) it was not possible to detect
232 significant DNA damage on oocyte by γ H2AX immunofluorescence 1h after exposure to
233 ionizing radiation (1.8 Gy and 18.6 Gy); (3) all genes tested in this study were expressed with
234 IR changing the mRNA abundance of RAD52, BAX and CCND2 on cumulus cells 1h after
235 exposure (1.8 Gy and 18.6 Gy). In this study we performed two experiments in order to verify
236 the biological effects of the interaction between ionizing radiation and CCO's obtained from
237 antral follicles. In the experiment 1, we evaluated the nuclear maturation rate. The nuclear
238 maturation refers to the progression of meiosis from the diplotene of prophase I to metaphase
239 II stage, and it is in this period that the oocyte acquires the ability to continue in the coming
240 events (fertilization, embryonic development) [20]. Our analysis demonstrated that nuclear
241 maturation was not significantly affected by the radiation doses tested.

242 Then, we performed experiment 2 to verify possible DNA damage and expression of the
243 genes involved in DNA repair, apoptosis and cell cycle. First, we conducted the
244 immunofluorescence detection of phosphorylated histone H2AX. It is known that histone
245 H2AX generally comprises about 10% of the total H2A complement in mammalian cells, and
246 that this can vary between different mammalian cell lines [21]. One of the earliest responses
247 to DSB induction is the phosphorylation of histone variant H2AX at the break site.
248 Phosphorylated H2AX, known as γ H2AX, forms "foci" at DSB induced by ionizing radiation
249 [22,23]. This foci can be detectable and plays an important role in identifying DNA damage
250 and repair by allowing repair proteins to access the damaged regions of the DNA [24]. A
251 model proposed by Bonner and colleagues suggests that PI3 kinase is attracted to the DSB
252 and phosphorylates H2AX molecules as it progresses away from the break. Some of the ATM
253 then accumulates at these sites, which also attracts other proteins (possibly 53BP1), but once
254 the break is rejoined, the kinase dissociates and the phosphatases remove the γ H2AX [25]. In
255 an experiment with human lymphocytes submitted to different radiation doses, a maximum
256 response of γ H2AX levels was observed at 1 or 2h, which was followed by a gradual loss of
257 γ H2AX over the next 6h, and a slower decline until 24h toward background levels [26].
258 However, we did not detect significant damage 1h after exposition to radiation doses in our

259 analysis. There are some possible explanations for our results: (a) a smaller percentage of
260 H2AX is present or becomes phosphorylated in some cells than others [21]; (b) the time of
261 analysis following exposure to ionizing radiation did not permit expressive detection of
262 γ H2AX, contradicting the literature data [26]; and (c) the radiation doses tested may not have
263 been sufficient to lead DNA damage to this cell line, due to the development stage or even by
264 the radiosensitivity differences between species [27].

265 Still regarding experiment 2, we evaluated the mRNA expression profile of genes involved
266 on HR and NHEJ repair pathways, apoptosis and cell cycle, in order to gain additional
267 insights of the mechanisms involved in the cellular response to IR. It is known that different
268 pathways maintain genome stability in mammalian cells in response to DNA damage
269 controlling either the cell cycle or the repair of the damage itself. Since oocytes are the
270 guardians of the maternal genome, they should in principle have developed an efficient
271 machinery to deal with DNA damage. Evidence from a number of *in vivo* and *in vitro* studies
272 indicates that the mammalian oocytes are capable of repairing DNA damage [28]. It has been
273 shown that human oocytes express DNA repair genes at elevated levels, allowing low
274 tolerance for DNA decays [29]. The mechanisms that detect and repair DSB, which are the
275 most deleterious form of DNA damage, are especially relevant to radiobiology [30]. DSB are
276 repaired through two main mechanisms: homologous recombination (HR) and non-
277 homologous end joining (NHEJ) [31]. The proteins specifically involved in homologous
278 recombination are RAD51, RAD52, ATM, 53BP1 and the proteins specifically involved in
279 non-homologous end joining include the Ku70/Ku80 heterodimer [32]. 53BP1 is a nuclear
280 protein that rapidly localizes the sites of DSB induced by ionizing radiation and other agents
281 (peak detection between 30 min to 1h) [33,34]. 53BP1 participates in DNA damage signaling
282 pathways and is regulated by ATM after IR [34]. ATM is the protein mutated in the human
283 genetic disorder ataxia-telangiectasia (A-T). Cells from A-T patients are radiosensitive and
284 have been shown to be deficient in a number of signaling events that normally occur
285 following DSB formation [35]. Once activated, ATM phosphorylates numerous substrates in
286 the cell and induces the cell response to DNA damage via facilitating DNA repair and
287 modulation of cell cycle arrest [36]. In our analysis, there was no significant variation in
288 53BP1 and ATM mRNA abundance on the tested doses 1h after irradiation. However, a
289 tendency of increase in 53BP1 expression was observed as the radiation dose increases.

290 Another protein involved in homologous recombination is the RAD52 that acts at the
291 earliest stage of homologous DNA repair, playing a key part in the recognition and binding of
292 double-strand breaks [37]. Besides, RAD52 binds selectively to DNA ends, protects these
293 ends from digestion by exonucleases and promotes DNA end joining [37]. In our study, a
294 negative correlation between radiation dose and RAD52 gene expression was observed, i.e.,
295 with an increasing dose there was a decrease in the expression. We hypothesized that the
296 decrease in the abundance of RAD52 mRNA detected might be due to the fact that it had
297 already been translated into proteins to act in DNA repair, but it requires evidence. Another
298 possibility is that Ku and RAD52 are competing for repair pathway [37]. Ku is a heterodimer
299 of two proteins, Ku70 and Ku80, and plays a critical part in NHEJ. Mammalian cells that lack

300 either Ku70 or Ku80 are deficient in NHEJ repair and exhibit extreme sensitivity to ionizing
301 radiation [37]. Following the generation of DSBs by either exogenous forces or intrinsic
302 mechanisms, the Ku70-Ku80 complex binds to free DNA ends and subsequently recruits and
303 activates DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) at the site of DSB [35]. Several lines of
304 evidence indicate that the Ku proteins play an essential role in DNA repair. For example,
305 Ku80 and Ku70 deficient mice show severe impairment in their ability to repair DSBs [38].
306 One study showed that Ku70 rises rapidly (within 30 min) after irradiation in human
307 fibroblasts and lymphoblast, but Ku80 does not. Besides, IR-induced Ku70 up-regulation is a
308 feature common to many cell lines [35]. In our analysis, there was no significant variation in
309 Ku70 and Ku80 mRNA abundance. However, a tendency of increase in Ku70 and a tendency
310 of decrease in ku80 expression when increasing the radiation dose were observed. These data
311 raise the hypothesis that the irradiation rise in Ku70 mRNA abundance may not result in
312 higher cellular concentrations of the Ku70-Ku80 heterodimer.

313 Furthermore, the response of eukaryotic cells to IR includes cell-cycle arrest and cell death
314 by apoptosis [39]. BAX is a member of the Bcl-2 family of proteins and functions as a
315 proapoptotic death effector [40]. A previous study found that IR induced a time and dose
316 dependent increase of BAX mRNA expression on leukemia cells with no significant increase
317 up to 2h, with a 5 to 6.5 fold increase in BAX levels reached by 8h at all doses tested [39].
318 Because the cell cycle is strongly affected by irradiation, and radiosensitivity depends on cell
319 cycle position and cell cycle progression, it is not surprising that some association between
320 apoptosis and radiosensitivity has been observed [41]. However, our analysis showed a
321 decrease of pro-apoptotic gene BAX mRNA expression with increasing radiation dose,
322 indicating an absence of apoptotic response. In relation to cell cycle, the best-known
323 regulators of mammalian cell proliferation are the 3 D-type cyclins (CCND1, CCND2 and
324 CCND3), which are considered to be the key regulators of cell proliferation and G1/S phase
325 transition in the cell cycle [42]. Most normal cells exposed to IR characteristically activate
326 cell cycle checkpoints, resulting in cell cycle arrest at the G1/S or G2/ M checkpoints [43].
327 Recently, studies have focused more specifically on the influence of cell cycle checkpoints
328 and cell phases on radio responsiveness [41]. Sensitivity to the cytotoxic effects of ionizing
329 radiation vary significantly in different phases of the replicative cell cycle, with decreased
330 radiosensitivity of the S cycle phase and increased radiosensitivity characteristic of the late
331 G2 and M cell cycle phase [44]. In our experiments, the abundance of CCND2 mRNA
332 encoding was affected by 18.6Gy radiation dose with a negative correlation, i.e., with an
333 increasing dose there was a decrease in the expression, indicating a possible status of cell
334 cycle arrest.

335 Taken together, our experimental data support that the sensitivity of follicle/oocyte to
336 radiation clearly differs between species and follicular stages and this adds to the difficulty of
337 correctly estimating the genetic hazard of radiation in humans. It remains clear that precise
338 estimations of the genetic hazard of ionizing radiation must be primarily based on animal
339 studies, and their extrapolation must rely on an understanding of the mechanisms of action
340 and their differences among species [27]. In contrast to the ethical problems associated with

341 monitoring the changes in genes and proteins involved in repair of DNA DSB in oocytes from
342 young and old humans, it is relatively easy to carry out such a study using an animal model
343 [45]. Bovine oocyte research provides a valuable source of transferable, relevant information
344 for human fertility research [46]. The cumulus cells surrounding and supporting the oocyte
345 may also provide a more tractable biomarker than the oocyte itself and thus several studies
346 have analyzed differentially expressed transcripts in the cumulus cells of models of
347 developmental competence of oocyte [47]. Besides, the mRNA abundance in cumulus cells is
348 associated with oocyte competence and have functional significance [47].

349 Despite the evidence of harmful effects of ionizing radiation on biological systems, our
350 results showed that the radiation doses tested did not affect the evolution of the oocyte
351 maturation obtained from antral follicle. However, our results may be potentially important
352 with regard to understanding the molecular basis for cell line-dependent differences in
353 radiation sensitivity. To our knowledge, this is the first study assessing the significance of
354 mRNA expression of this genes on bovine oocyte obtained from ovaries submitted to ionizing
355 radiation by a linear accelerator. Therefore, it is necessary to evaluate the effects of IR on pre-
356 antral follicles, as well as the following development stages of the oocyte (fertilization,
357 embryonic development).

358

359 **Acknowledgments**

360 We thank Silva abattoir that kindly provided the bovine ovaries, the Radiotherapy Service
361 of University Hospital of Santa Maria for the support in the irradiation procedures and the
362 Laboratory of Biotechnology and Animal Reproduction that kindly provided the reagents,
363 equipment and physical structure for the experiments.

364

365 **Conflicts of Interest**

366 The authors declare there is no conflict of interest that perceived as prejudicing the
367 impartiality of the research reported.

368

369 **References and Notes**

370 [1] M. Ding, E. Zhang, R. He, X. Wang, Newly developed strategies for improving
371 sensitivity to radiation by targeting signal pathways in cancer therapy, *Cancer Sci.* 104 (2013)
372 1401–1410. doi:10.1111/cas.12252.

373 [2] W. Chemaitilly, A.C. Mertens, P. Mitby, J. Whitton, M. Stovall, Y. Yasui, Acute
374 ovarian failure in the childhood cancer survivor study., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91 (2006)
375 1723–1728. doi:10.1210/jc.2006-0020.

- 376 [3] L. Barbera, Effects of pelvic radiation therapy on fertility, *C. J. Gynecol. Oncol.* 8
377 (2003) 101–106.
- 378 [4] S.J. Hosseinimehr, The protective effects of trace elements against side effects
379 induced by ionizing radiation, *33 (2015) 66–74.*
- 380 [5] Z. Nikitaki, C.E. Hellweg, A.G. Georgakilas, J.-L. Ravanat, Stress-induced DNA
381 damage biomarkers: applications and limitations, *Front. Chem.* 3 (2015) 1–15.
382 doi:10.3389/fchem.2015.00035.
- 383 [6] C.J. Lord, A. Ashworth, The DNA damage response and cancer therapy, *Nature.* 481
384 (2012) 287–294. doi:10.1038/nature10760.
- 385 [7] M. Mohamed, Z. Shaban, M. Alkafafy, L-Carnitine protects against testicular
386 dysfunction caused by gamma irradiation in mice, *Acta Histochem.* 116 (2014) 1046–1055.
- 387 [8] A. Lo Presti, G. Ruvolo, R.A. Gancitano, E. Cittadini, Ovarian function following
388 radiation and chemotherapy for cancer, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 113 (2004) 33–
389 40. doi:10.1016/j.ejogrb.2003.11.008.
- 390 [9] W.H.B. Wallace, a. B. Thomson, T.W. Kelsey, The radiosensitivity of the human
391 oocyte, *Hum. Reprod.* 18 (2003) 117–121. doi:10.1093/humrep/deg016.
- 392 [10] M. Sonmezer, K. Oktay, Fertility preservation in female patients., *Hum. Reprod.*
393 *Update.* 10 (2004) 251–266. doi:10.1093/humupd/dmh021.
- 394 [11] W.H.B. Wallace, A.B. Thomson, F. Saran, T.W. Kelsey, Predicting age of ovarian
395 failure after radiation to a field that includes the ovaries, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 62
396 (2005) 738–744. doi:10.1016/j.ijrobp.2004.11.038.
- 397 [12] H.R.G. W. H. B. Wallace, S. M. Shalet, E. C. Crowne, P. H. Morris-Jones, Ovarian
398 Failure Following Abdominal Irradiation in Childhood: Natural History and Prognosis, *Clin.*
399 *Oncol.* 1(2) (1989) 75–79.
- 400 [13] Yurut-Caloglu V, Caloglu M, Eskiocak S, Tastekin E, Ozen A, Kurkcu N, Oz-Puyan
401 F, Kocak Z, Comparison of the protective roles of L-carnitine and amifostine against
402 radiation-induced acute ovarian damage by histopathological and biochemical methods, *J.*
403 *Cancer Res. Ther.* 11 (2015) 447–453. doi:10.4103/0973-1482.146091.
- 404 [14] A. Pesty, M. Doussau, J.B. Lahaye, B. Lefèvre, Whole-body or isolated ovary ⁶⁰Co
405 irradiation: Effects on in vivo and in vitro folliculogenesis and oocyte maturation, *Reprod.*
406 *Toxicol.* 29 (2010) 93–98. doi:10.1016/j.reprotox.2009.10.007.
- 407 [15] A.R. Baerwald, Human antral folliculogenesis : what we have learned from the bovine
408 and equine models, *Anim. Reprod.* 6 (2009) 20–29.
- 409 [16] P.S. Malhi, G.P. Adams, J. Singh, Bovine model for the study of reproductive aging in
410 women: follicular, luteal, and endocrine characteristics., *Biol. Reprod.* 73 (2005) 45–53.
411 doi:10.1095/biolreprod.104.038745.

- 412 [17] A. Langbeen, H. F. M. De porte, E. Bartholomeus, J. L. M. R. Leroy, P. E. J. Bols,
413 Bovine in vitro reproduction models can contribute to the development of (female) fertility
414 preservation strategies, *Theriogenology*. 84 (2015) 477–489.
415 doi:10.1016/j.theriogenology.2015.04.009.
- 416 [18] L. Leibfried, N.L. First, Characterization of Bovine Follicular Oocytes and Their
417 Ability to Mature , *J. Anim. Sci.* 48 (1979) 76–86. doi:10.2134/jas1979.48176x.
- 418 [19] M. Henrique Barreta, B. Garziera Gasperin, V. Braga Rissi, M.P. De Cesaro, R.
419 Ferreira, J.F. De Oliveira, et al., Homologous recombination and non-homologous end-joining
420 repair pathways in bovine embryos with different developmental competence, *Exp. Cell Res.*
421 318 (2012) 2049–2058. doi:10.1016/j.yexcr.2012.06.003.
- 422 [20] F.P. Gottardi, G.Z. Mingoti, Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição
423 da competência para o desenvolvimento do embrião, *Rev Bras Reprod Anim.* 33 (2010) 82–
424 94.
- 425 [21] S.H. MacPhail, J.P. Banáth, T.Y. Yu, E.H.M. Chu, H. Lambur, P.L. Olive, Expression
426 of phosphorylated histone H2AX in cultured cell lines following exposure to X-rays., *Int. J.*
427 *Radiat. Biol.* 79 (2003) 351–358. doi:10.1080/0955300032000093128.
- 428 [22] E.P. Rogakou, D.R. Pilch, A.H. Orr, V.S. Ivanova, W.M. Bonner, DNA double-
429 stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139, *J. Biol. Chem.* 273
430 (1998) 5858–5868. doi:10.1074/jbc.273.10.5858.
- 431 [23] E.P. Rogakou, C. Boon, C. Redon, W.M. Bonner, Megabase chromatin domains
432 involved in DNA double-strand breaks in vivo, *J. Cell Biol.* 146 (1999) 905–915.
433 doi:10.1083/jcb.146.5.905.
- 434 [24] S. Sudhakaran, S. Uppangala, S.R. Salian, S.D. Honguntikar, R. Nair, G. Kalthur,
435 Oocytes recovered after ovarian tissue slow freezing have impaired H2AX phosphorylation
436 and functional competence., *Reprod. Fertil. Dev.* (2014). doi:10.1071/RD14048.
- 437 [25] C. Redon, D. Pilch, E. Rogakou, O. Sedelnikova, K. Newrock, W. Bonner, Histone
438 H2A variants H2AX and H2AZ, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12 (2002) 162–169.
439 doi:10.1016/S0959-437X(02)00282-4.
- 440 [26] M. Ghardi, M. Moreels, B. Chatelain, C. Chatelain, S. Baatout, Radiation-induced
441 double strand breaks and subsequent apoptotic DNA fragmentation in human peripheral blood
442 mononuclear cells, *Int. J. Mol. Med.* 29 (2012) 769–780. doi:10.3892/ijmm.2012.907.
- 443 [27] I. Adriaens, J. Smits, P. Jacquet, The current knowledge on radiosensitivity of ovarian
444 follicle development stages, *Hum. Reprod. Update.* 15 (2009) 359–377.
445 doi:10.1093/humupd/dmn063.
- 446 [28] G.H. Vazquez-Nin, M.L. Escobar, M. De Felici, O.M. Echeverría, F.G. Klinger, DNA
447 Damage and Apoptosis in Fetal and Ovarian Reserve Oocytes, in: *Cell Death Mamm. Ovary*,
448 2011: pp. 143–163. doi:10.1007/978-94-007-1134-1.

- 449 [29] Y. Ménéz, B. Dale, M. Cohen, DNA damage and repair in human oocytes and
450 embryos: a review., *Zygote*. 18 (2010) 357–365. doi:10.1017/S0967199410000286.
- 451 [30] M. Moscariello, R. Wieloch, A. Kurosawa, F. Li, N. Adachi, E. Mladenov, et al., Role
452 for Artemis nuclease in the repair of radiation-induced DNA double strand breaks by
453 alternative end joining, *DNA Repair (Amst)*. 31 (2015) 29–40.
454 doi:10.1016/j.dnarep.2015.04.004.
- 455 [31] A. Ruiz-Herrera, F. Garcia, M. Garcia-Caldés, Radiobiology and reproduction-What
456 can we learn from mammalian females?, *Genes (Basel)*. 3 (2012) 521–544.
457 doi:10.3390/genes3030521.
- 458 [32] D. Ristic, M. Modesti, R. Kanaar, C. Wyman, Rad52 and Ku bind to different DNA
459 structures produced early in double-strand break repair, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 5229–
460 5237. doi:10.1093/nar/gkg729.
- 461 [33] L.B. Schultz, N.H. Chehab, A. Malikzay, T.D. Halazonetis, P53 Binding Protein 1
462 (53bp1) Is an Early Participant in the Cellular Response to DNA Double-Strand Breaks, *J.*
463 *Cell Biol.* 151 (2000) 1381–1390. doi:10.1083/jcb.151.7.1381.
- 464 [34] I. Rappold, K. Iwabuchi, T. Date, J. Chen, Tumor Suppressor p53 Binding Protein 1
465 (53BP1) Is Involved in DNA Damage–signaling Pathways, *J. Cell Biol.* 153 (2001) 613–620.
- 466 [35] K.D. Brown, T. a. Lataxes, S. Shangary, J.L. Mannino, J.F. Giardina, J. Chen, et al.,
467 Ionizing radiation exposure results in up-regulation of Ku70 via a p53/ataxia-telangiectasia-
468 mutated protein-dependent mechanism, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 6651–6656.
469 doi:10.1074/jbc.275.9.6651.
- 470 [36] M. Gatei, K. Sloper, C. Sörensen, R. Syljuäsen, J. Falck, K. Hobson, et al., Ataxia-
471 telangiectasia-mutated (ATM) and NBS1-dependent phosphorylation of Chk1 on Ser-317 in
472 response to ionizing radiation, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 14806–14811.
473 doi:10.1074/jbc.M210862200.
- 474 [37] K. Hiom, DNA repair: Rad52 - The means to an end, *Curr. Biol.* 9 (1999) 446–448.
475 doi:10.1016/S0960-9822(99)80278-4.
- 476 [38] H. Ouyang, a Nussenzweig, a Kurimasa, V.C. Soares, X. Li, C. Cordon-Cardo, Ku70
477 is required for DNA repair but not for T cell antigen receptor gene recombination In vivo., *J.*
478 *Exp. Med.* 186 (1997) 921–929. doi:10.1084/jem.186.6.921.
- 479 [39] B. Gong, Q. Chen, B. Endlich, S. Mazumder, A. Almasan, Ionizing radiation-induced,
480 Bax-mediated cell death is dependent on activation of cysteine and serine proteases., *Cell*
481 *Growth Differ.* 10 (1999) 491–502.
- 482 [40] M.J. Chong, M.R. Murray, E.C. Gosink, H.R. Russell, a Srinivasan, M. Kapsetaki,
483 Atm and Bax cooperate in ionizing radiation-induced apoptosis in the central nervous system.,
484 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 889–894. doi:10.1073/pnas.97.2.889.

- 485 [41] T.M. Pawlik, K. Keyomarsi, Role of cell cycle in mediating sensitivity to
486 radiotherapy, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 59 (2004) 928–942.
487 doi:10.1016/j.ijrobp.2004.03.005.
- 488 [42] T. Shimizu, Y. Hirai, a. Miyamoto, Expression of cyclins and cyclin-dependent kinase
489 inhibitors in granulosa cells from bovine ovary, *Reprod. Domest. Anim.* 48 (2013) 65–70.
490 doi:10.1111/rda.12177.
- 491 [43] V. Vucic, E.R. Isenovic, M. Adzic, S. Ruzdijic, M.B. Radojic, Effects of gamma-
492 radiation on cell growth, cycle arrest, death, and superoxide dismutase expression by DU145
493 human prostate cancer cells, *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 39 (2006) 227–236.
- 494 [44] T.L. Deweese, J.M. Shipman, L.E. Dillehay, W.G. Nelson, Low Dose Rate Radiation
495 Exposure, *J. ULROLOGY.* 159 (1998) 591–598.
- 496 [45] V. Govindaraj, R. Keralapura Basavaraju, A.J. Rao, Changes in the expression of
497 DNA double strand break repair genes in primordial follicles from immature and aged rats,
498 *Reprod. Biomed. Online.* 30 (2015) 303–310. doi:10.1016/j.rbmo.2014.11.010.
- 499 [46] L.C. O’Shea, J. Mehta, P. Lonergan, C. Hensey, T. Fair, Developmental competence
500 in oocytes and cumulus cells: candidate genes and networks, *Syst. Biol. Reprod. Med.* 58
501 (2012) 88–101. doi:10.3109/19396368.2012.656217.
- 502 [47] A. Bettegowda, O. V Patel, K.-B. Lee, K.-E. Park, M. Salem, J. Yao, et al.,
503 Identification of novel bovine cumulus cell molecular markers predictive of oocyte
504 competence: functional and diagnostic implications., *Biol. Reprod.* 79 (2008) 301–309.
505 doi:10.1095/biolreprod.107.067223.
- 506 [48] A. Bettegowda, O. V. Patel, J.J. Ireland, G.W. Smith, Quantitative analysis of
507 messenger RNA abundance for ribosomal protein L-15, cyclophilin-A,
508 phosphoglycerokinase, beta-glucuronidase, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, beta-
509 actin, and histone H2A during bovine oocyte maturation and early embryogen, *Mol. Reprod.*
510 *Dev.* 73 (2006) 267–278. doi:10.1002/mrd.20333.
- 511
- 512
- 513
- 514
- 515
- 516
- 517
- 518

519 **Tables and figures**

520

521 **Table 1** - List of primers used in the expression analysis. The primer sequences and
 522 concentrations used to amplify each gene are described.

Gene name	Primer sequence (5' to 3')	Conc. (nM)	Reference or accession n°.
<i>Cyclophilin B</i>	F: GGTCATCGGTCTCTTTGGAA	200	NM_174152.2
	R: TCCTTGATCACACGATGGAA	200	
<i>Histone H2A</i>	F: GAGGAGCTGAACAAGCTGTTG	200	Bettegowda <i>et al.</i> 2006 [48]
	R: TTGTGGTGGCTCTCAGTCTTC	200	
<i>53BP1</i>	F: ATCAGACCAACAGCAGAATTTCC	200	ENSBTAT00000028388
	R: CACCACGTCAAACACCCCTAA	200	
<i>RAD52</i>	F: GGCCAGGAAGGAGGCAGTA	200	ENSBTAT00000055617
	R: TGACCTCAGATAGTCTTTGTCCAGAA	200	
<i>ATM</i>	F: CTTAGGAGGAGCTTGGGCCT	200	ENSBTAT00000040104
	R: CCGCTGTGTGGCAAACC	200	
<i>BAX</i>	F: GACATTGGACTTCCTTCGAGA	200	ENSBTAT00000017739
	R: AGCACTCCAGCCACAAAGAT	200	
<i>Ku70</i>	F: AATTGACTCCTTTTGACATGAGCAT	200	Designed
	R: CCATAGAACACCACTGCCAAGA	200	
<i>Ku80</i>	F: TGGCATCTCCCTGCAGTTCT	200	Designed
	R: AGGCCCATGGTGGTCTGA	200	
<i>CCND2</i>	F: TGCCCCAGTGCTCCTACTTC	200	ENSBTAT00000022145
	R: CGGGTACATGGCAAACCTTGA	200	
F, Forward primers; R, Reverse primers.			

523

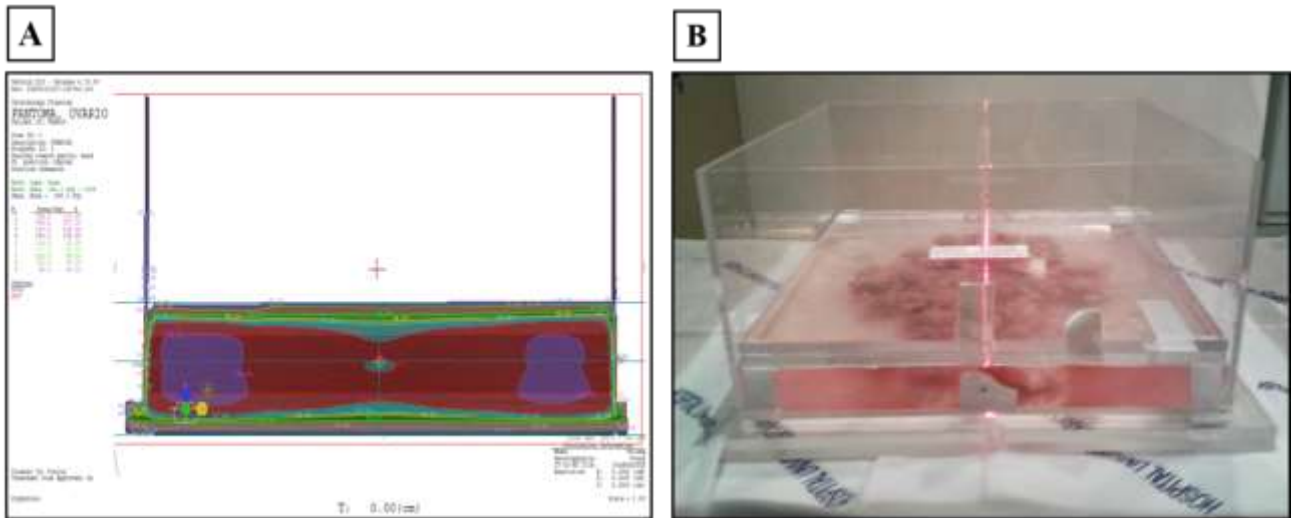
524

525

526

527 **Figure 1.** Simulation of the irradiation experiments by a Computed Tomography (A) and the
 528 irradiation procedure of the bovine ovaries in the acrylic tank (B).

529



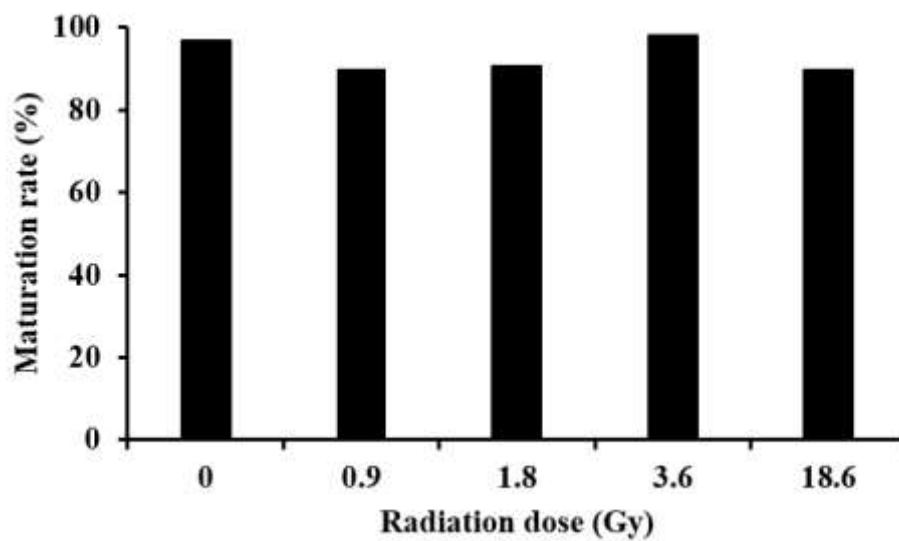
530

531

532

533 **Figure 2.** Effect of radiation dose (Gy) on nuclear maturation of bovine oocytes after 24h *in*
 534 *vitro* culture. The experiment was performed in triplicate (n = 272).

535

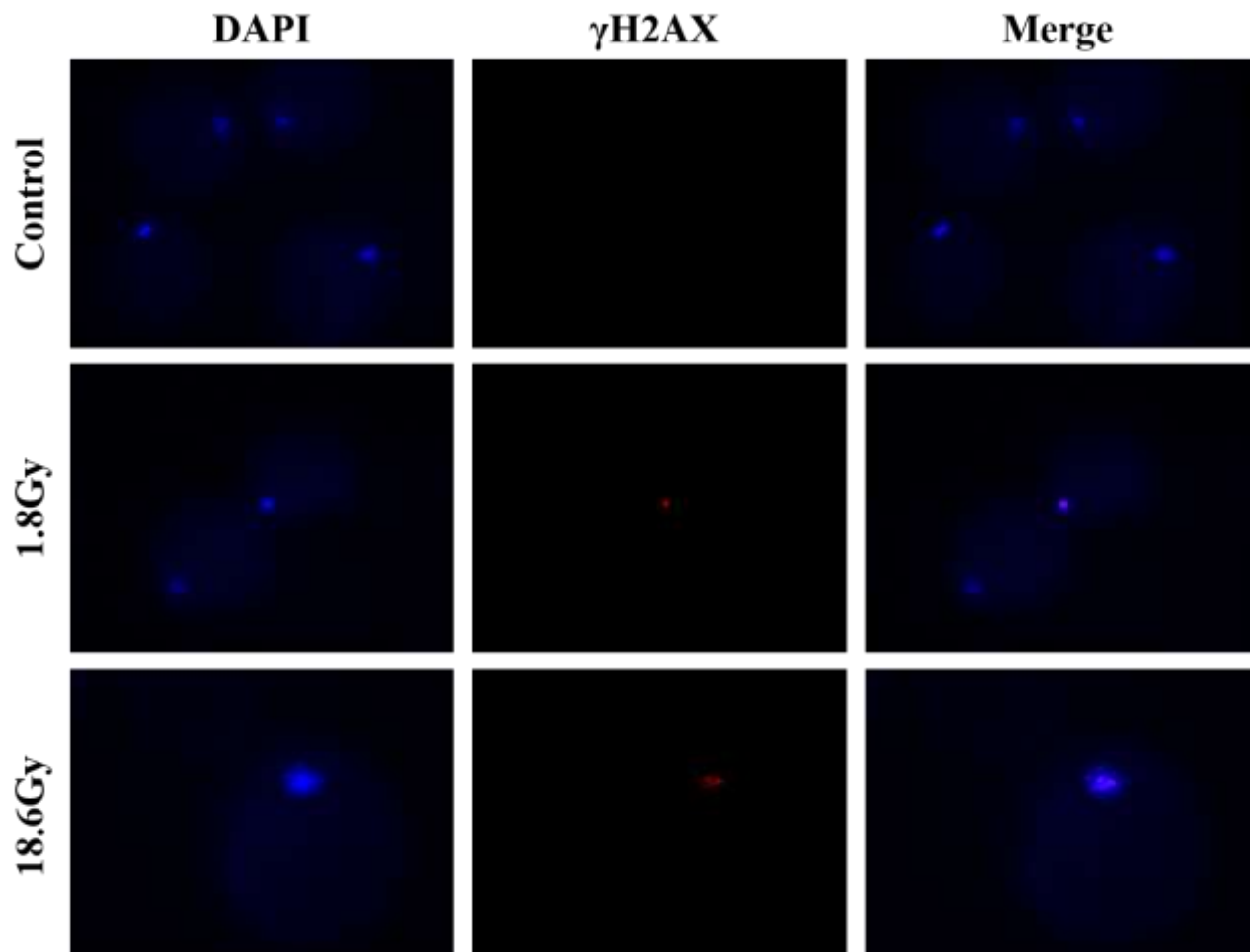


536

537

538 **Figure 3.** Representative fluorescent images of phosphorylated histone H2AX
539 immunodetection technique 1h after irradiation with a linear accelerator. The experiment was
540 performed in duplicate. Control (non-irradiated group; n = 20 oocytes), 1.8 Gy (n = 20
541 oocytes) and 18.6 Gy (n = 20 oocytes).

542



543

544

545

546

547

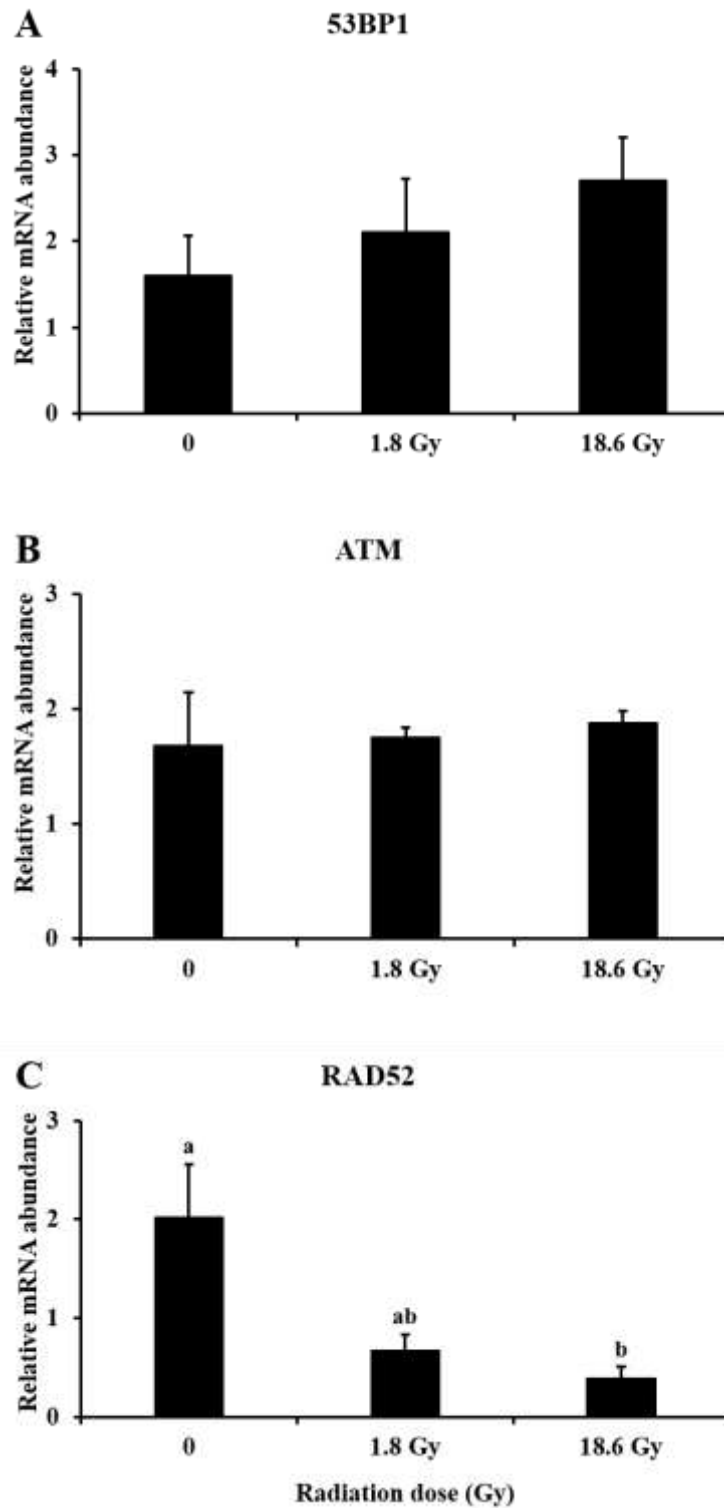
548

549

550

551 **Figure 4.** Relative mRNA abundance (mean \pm standard error of mean) of 53BP1 (A), ATM
552 (B) and RAD52 (C) in bovine cumulus cells 1h after irradiation with a linear accelerator.
553 Different letters indicate statistical difference ($P \leq 0.05$) between groups.

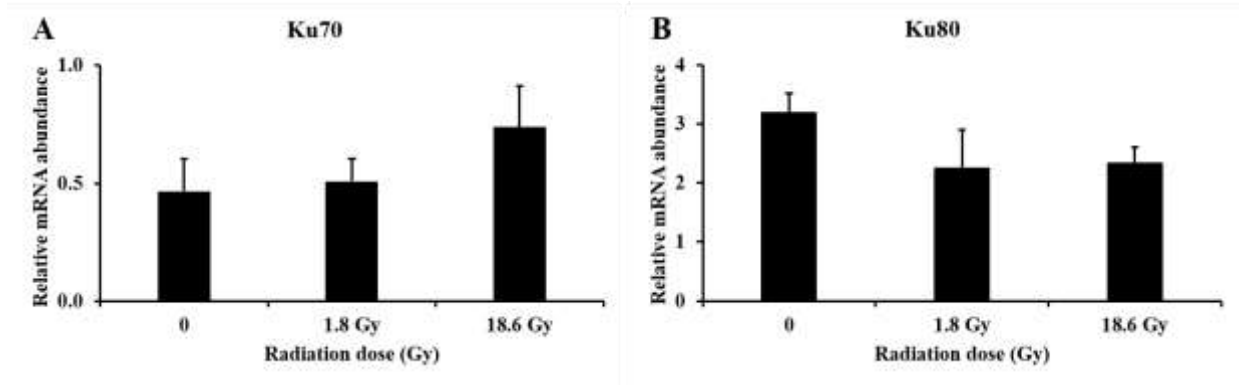
554

555
556557
558559
560

561 **Figure 5.** Relative mRNA expression (mean \pm standard error of mean) of Ku70 (A) and Ku80
 562 (B) in bovine cumulus cells 1h after irradiation with a linear accelerator.

563

564



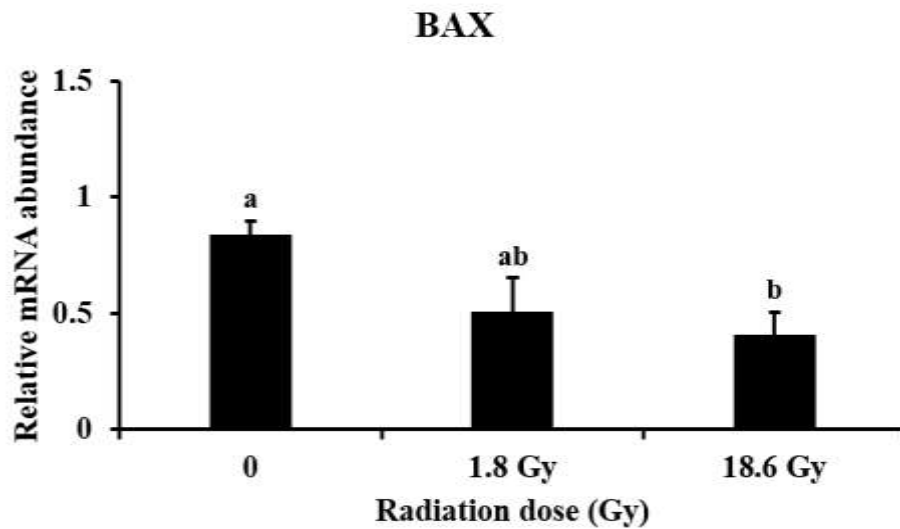
565

566

567

568 **Figure 6.** Relative mRNA expression (mean \pm standard error of mean) of BAX in bovine
 569 cumulus cells 1h after irradiation with a linear accelerator. Different letters indicate statistical
 570 difference ($P \leq 0.05$) between groups.

571



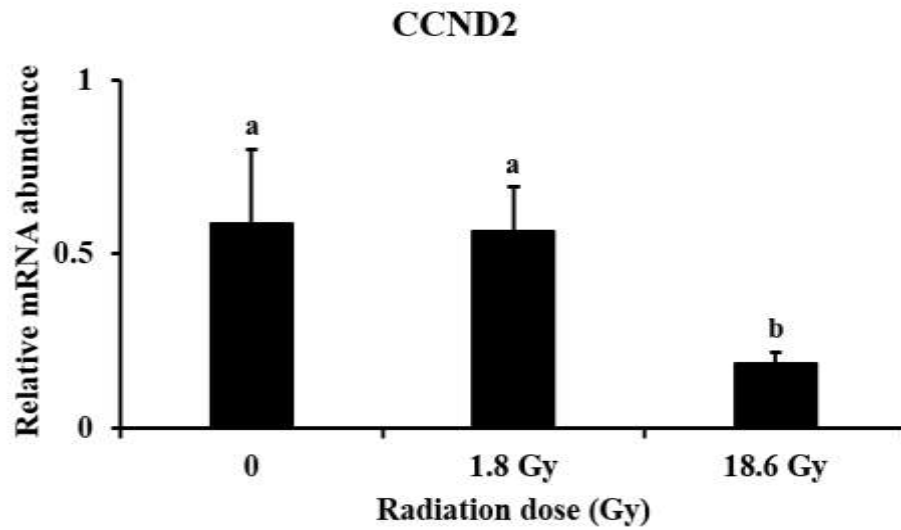
572

573

574

575 **Figure 7.** Relative mRNA expression (mean \pm standard error of mean) of CCND2
576 in bovine cumulus cells 1h after irradiation with a linear accelerator. Different
577 letters indicate statistical difference ($P \leq 0.05$) between groups.

578



579

580

581

582

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os principais resultados deste estudo foram: (1) as doses de radiação testadas (0,9 Gy; 1,8 Gy; 3,6 Gy e 18,6 Gy) não afetaram a taxa de maturação do oócito; (2) não foi possível detectar danos significativos ao DNA do oócito através da imunofluorescência da γ H2AX 1h após a exposição a RI (1,8 Gy e 18,6 Gy); (3) todos os genes testados foram expressos sendo que a RI alterou apenas a abundância de mRNA dos genes RAD52, BAX e CCND2 nas células do cumulus 1h após a exposição (1,8 Gy e 18,6 Gy).

Neste estudo foram realizados dois experimentos, a fim de verificar os efeitos biológicos da interação entre a radiação ionizante e CCO's obtidos a partir de folículos antrais. No experimento 1, foi avaliada a taxa de maturação nuclear. A maturação nuclear compreende à progressão da meiose da fase de prófase I (diplóteno) até a metáfase II. É neste período que o oócito adquire a capacidade ou competência para dar continuidade nos eventos seguintes (fertilização, desenvolvimento embrionário) (GOTTARDI; MINGOTI, 2010). Nossa análise demonstrou que a maturação nuclear não foi significativamente afetada pelas doses de radiação testadas (0,9 Gy; 1,8 Gy; 3,6 Gy e 18,6 Gy).

Em seguida, foi realizado o experimento 2 para verificação da possibilidade de danos ao DNA bem como a expressão de genes envolvidos no reparo, apoptose e ciclo celular. Primeiro, realizamos o teste de imunofluorescência da histona γ H2AX, a qual constitui uma das primeiras respostas à indução de quebras de fita dupla no DNA γ H2AX, formando "focos" nos sítios de quebra que podem ser detectáveis (SUDHAKARAN et al., 2014). No entanto, em nossos testes não detectamos danos significativos 1h após a exposição as doses de radiação (1,8 Gy e 18,6 Gy). Existem algumas explicações possíveis para os resultados encontrados: (a) uma porcentagem menor de H2AX está presente ou se torna fosforilada em algumas linhagens celulares (MACPHAIL et al., 2003); (b) o tempo em que foi efetuada a análise após a exposição à radiação ionizante não tenha permitido uma detecção expressiva de γ H2AX, contrariando os dados da literatura (GHARDI et al., 2012); ou (c), as doses de radiação testadas podem não ter sido suficientes para provocar danos ao DNA nesta linhagem celular, devido à fase de desenvolvimento ou mesmo por diferenças de radiosensibilidade entre as espécies (ADRIAENS, 2009).

Ainda em relação ao experimento 2, foi avaliada a expressão de mRNA de genes envolvidos nas duas vias de reparo (HR e NHEJ), no processo de apoptose e ciclo celular, com objetivo de obter conhecimentos adicionais sobre os mecanismos envolvidos na resposta

celular a IR e da influência das células do cumulus na maturação. Os mecanismos que detectam e reparam as DSB's, que são a forma mais prejudicial de danos ao DNA, são especialmente relevantes para radiobiologia (MOSCARIELLO et al., 2015). Com relação as proteínas envolvidas na via de reparo homólogo, em nossas análises não houveram variações significativas na abundância de mRNA dos genes 53BP1 e ATM nas doses testadas 1h após a irradiação. No entanto, foi observada uma tendência de aumento da abundância de 53BP1 com o aumento da dose de radiação. Quanto a análise da RAD52, a qual desempenha um papel fundamental no reconhecimento e ligação de quebras de fita dupla, foi observada uma correlação negativa entre dose de radiação e abundância de mRNA, ou seja, quanto maior a dose de radiação menor a abundância de mRNA. Possivelmente essa diminuição na abundância de mRNA da RAD52 se deva ao fato de que ele já tenha sido traduzido em proteínas para atuar no reparo do DNA, o que necessita comprovação. Outra hipótese é que Ku e RAD52 estejam competindo pela via de reparo, como sugere a literatura (HIOM, 1999).

Em relação as análises dos genes envolvidos no reparo por união terminal não homóloga (NHEJ), não houve variação significativa na abundância de mRNA em Ku70 e Ku80. No entanto, observou-se uma tendência de aumento na expressão de Ku70 e uma tendência de diminuição em Ku80 de acordo com o acréscimo na dose de radiação. Estes dados levantam a hipótese de que um aumento na abundância de mRNA de Ku70 com o aumento da dose de radiação pode não resultar em concentrações celulares mais elevadas do heterodímero Ku70-Ku80.

Sabe-se que a resposta de células eucarióticas a RI pode incluir a parada do ciclo celular bem como morte celular por apoptose (GONG et al., 1999). No entanto, em nossa análise foi observado que concomitante ao aumento da dose de radiação houve uma diminuição na abundância de mRNA do gene pró-apoptótico BAX, indicando uma possível ausência de resposta apoptótica. Já em relação ao ciclo celular nossos estudos demonstraram que a abundância de mRNA que codifica ciclina D2 (CCND2) foi afetada pela dose de radiação 18,6 Gy, sendo observada uma correlação negativa, ou seja, com um aumento da dose, houve uma diminuição na abundância de mRNA, sinalizando uma possível situação de parada do ciclo celular. A CCND2 faz parte da família de ciclinas, as quais são consideradas as principais reguladores de proliferação celular e de transição da fase G1 / S do ciclo celular (SHIMIZU, 2013).

Analizados em conjunto, nossos dados experimentais suportam que a sensibilidade do folículo/oócito à radiação ionizante difere entre as espécies e entre os diferentes estágios foliculares, o que dificulta estimar corretamente os riscos genéticos da radiação em seres

humanos. Estimativas do risco genético das radiações ionizantes baseadas em estudos com modelos animais, devem contar com a compreensão dos mecanismos de ação e suas diferenças entre as espécies (ADRIAENS, 2009). Em contraste com os problemas éticos associados ao monitoramento das alterações nos genes e proteínas envolvidas no reparo de DSB's do DNA em oócitos de mulheres, é relativamente mais fácil executar este tipo de estudo utilizando um modelo animal (GOVINDARAJ, 2015). Pesquisas realizadas com oócitos bovinos podem constituir uma valiosa fonte de informações relevantes para a investigação da fertilidade humana (O'SHEA et al., 2012). Células do cumulus, as quais circundam e dão suporte ao oócito, também podem fornecer dados importantes, sendo que vários estudos têm analisado transcritos diferencialmente expressos nas células do cumulus em modelos de competência para o desenvolvimento do ovócito (BETTEGOWDA et al., 2008). Assim, a abundância de mRNA em células cumulus está associada a competência do oócito e possui importância funcional (BETTEGOWDA et al., 2008).

6. CONCLUSÃO

Apesar das evidências dos efeitos prejudiciais da radiação ionizante em células saudáveis, nossos resultados demonstraram que as doses de radiação testadas (doses utilizadas na radioterapia) não afetaram a evolução da maturação de oócitos obtidos a partir de folículos antrais. No entanto, esses resultados podem ser potencialmente importantes no que diz respeito a compreensão da base molecular para diferenças dependentes da linhagem celular quanto a sensibilidade à radiação. Para nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que avaliou a significância da abundância de mRNA de genes envolvidos no reparo do DNA, apoptose e ciclo celular, sobre oócitos bovinos obtidos a partir de ovários submetidos à radiação ionizante por um acelerador linear. Portanto, tornam-se necessárias maiores investigações sobre os efeitos da RI sobre o sistema reprodutivo, bem como sua ação em folículos pré-antrais e nas fases posteriores de desenvolvimento do oócito (fertilização, desenvolvimento embrionário).

7. REFERÊNCIAS

- ADAMS, G. P.; SINGH, J.; BAERWALD, a. R. Large animal models for the study of ovarian follicular dynamics in women. **Theriogenology**, v. 78, n. 8, p. 1733–1748, 2012.
- ADRIAENS, I.; SMITZ, J.; JACQUET, P. The current knowledge on radiosensitivity of ovarian follicle development stages. **Human Reproduction Update**, v. 15, n. 3, p. 359–377, 2009.
- AHMED, M. M.; IBRAHIM, Z. S.; ALKAFIFY, M.; EL-SHAZLY, S. A. l-Carnitine protects against testicular dysfunction caused by gamma irradiation in mice. **Acta Histochemica**, v. 8, p. 1–10, 2014.
- BAERWALD, A. R. Human antral folliculogenesis : what we have learned from the bovine and equine models. **Animal Reproduction**, v. 6, n. 1, p. 20–29, 2009.
- BARBERA, L. Effects of pelvic radiation therapy on fertility. **CME Journal of Gynecologic Oncology**, v. 8, n. 2, p. 101–106, 2003.
- BETTEGOWDA, A.; PATEL, O. V; LEE, K.-B.; PARK, K.-E.; SALEM, M.; YAO, J.; IRELAND, J. J.; SMITH, G. W. Identification of novel bovine cumulus cell molecular markers predictive of oocyte competence: functional and diagnostic implications. **Biology of reproduction**, v. 79, n. 2, p. 301–309, 2008.
- BILSLAND, E.; DOWNS, J. a. Tails of histones in DNA double-strand break repair. **Mutagenesis**, v. 20, n. 3, p. 153–163, 2005.
- BRANZEI, D.; FOIANI, M. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 9, n. 4, p. 297–308, 2008.
- BRENDEL, V.; BROCCIERI, L.; SANDLER, S. J.; CLARK, A. J.; KARLIN, S. Evolutionary comparisons of RecA-like proteins across all major kingdoms of living organisms. **Journal of Molecular Evolution**, v. 44, n. 5, p. 528–541, 1997.
- CHEMAITILLY, W.; MERTENS, A. C.; MITBY, P.; WHITTON, J.; STOVALL, M.; YASUI, Y.; ROBISON, L. L.; SKLAR, C. a. Acute ovarian failure in the childhood cancer survivor study. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 91, n. 5, p. 1723–1728, 2006.
- CNEN. **Diretrizes básicas da radioproteção**. Rio de Janeiro: Comissão Nacional de Energia Nuclear, 2005.
- DE ANDRADE, E. R.; DE FREITAS BAUERMAN, L. **Introdução à radiobiologia: conexões bioquímicas e biomoleculares**. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2010.
- DING, M.; ZHANG, E.; HE, R.; WANG, X. Newly developed strategies for improving sensitivity to radiation by targeting signal pathways in cancer therapy. **Cancer Science**, v. 104, n. 11, p. 1401–1410, 2013.

GHARDI, M.; MOREELS, M.; CHATELAIN, B.; CHATELAIN, C.; BAATOUT, S. Radiation-induced double strand breaks and subsequent apoptotic DNA fragmentation in human peripheral blood mononuclear cells. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 29, n. 5, p. 769–780, 2012.

GINTHER, O. J. The mare: A 1000-pound guinea pig for study of the ovulatory follicular wave in women. **Theriogenology**, v. 77, n. 5, p. 818–828, 2012.

GONÇALVES, P. B. D.; DE FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. de F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2a. ed. São Paulo: Roca, 2008.

GONG, B.; CHEN, Q.; ENDLICH, B.; MAZUMDER, S.; ALMASAN, a. Ionizing radiation-induced, Bax-mediated cell death is dependent on activation of cysteine and serine proteases. **Cell growth & differentiation: the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research**, v. 10, n. 7, p. 491–502, 1999.

GOSWAMI, D.; CONWAY, G. S. Premature ovarian failure. **Human Reproduction Update**, v. 11, n. 4, p. 391–410, 2005.

GOTTARDI, F. P.; MINGOTI, G. Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 33, n. 2, p. 82–94, 2010.

GOVINDARAJ, V.; KERALAPURA BASAVARAJU, R.; RAO, A. J. Changes in the expression of DNA double strand break repair genes in primordial follicles from immature and aged rats. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 30, n. 3, p. 303–310, 2015.

GREEN, D. M.; SKLAR, C. a.; BOICE, J. D.; MULVIHILL, J. J.; WHITTON, J. a.; STOVALL, M.; YASUI, Y. Ovarian failure and reproductive outcomes after childhood cancer treatment: Results from the childhood cancer survivor study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 14, p. 2374–2381, 2009.

HALL, E.J., GIACCIA, A. J. **Radiobiology for the radiologist**. 7a. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2012.

HIOM, K. DNA repair: Rad52 - The means to an end. **Current Biology**, v. 9, n. 12, p. 446–448, 1999.

HOSSEINIMEHR, S. J. The protective effects of trace elements against side effects induced by ionizing radiation. **Radiation Oncology Journal**, v. 33, n. 2, p. 66–74, 2015.

JOHNSON, R. D.; JASIN, M. Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. **The EMBO journal**, v. 19, n. 13, p. 3398–3407, 2000.

KAPLAN, I. **Física nuclear**. 2a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1978.

KHAN, F. M. **The physics of radiation therapy**. 3a. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003.

LANGBEEN, A.; DE PORTE, H. F. M.; BARTHOLOMEUS, E.; LEROY, J. L. M. R.; BOLS, P. E. J. Bovine in vitro reproduction models can contribute to the development of (female) fertility preservation strategies. **Theriogenology**, v. 84, n. 4, p. 477–489, 2015.

LEHNERT, S. **Biomolecular action of ionizing radiation: medical physics and biomedical engineering**. Montreal: Taylor & Francis Group, LLC, 2008.

LIEBER, M. R. The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End Joining Pathway. **Molecular Microbiology**, v. 79, n. 3, p. 181–211, 2010.

LO PRESTI, A.; RUVOLO, G.; GANCITANO, R. A.; CITTADINI, E. Ovarian function following radiation and chemotherapy for cancer. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, v. 113, n. SUPPL., p. 33–40, 2004.

LOMAX, M. E.; FOLKES, L. K.; O'NEILL, P. Biological consequences of radiation-induced DNA damage: Relevance to radiotherapy. **Clinical Oncology**, v. 25, n. 10, p. 578–585, 2013.

LORD, C. J.; ASHWORTH, A. The DNA damage response and cancer therapy. **Nature**, v. 481, n. 7381, p. 287–294, 2012.

MACPHAIL, S. H.; BANÁTH, J. P.; YU, T. Y.; CHU, E. H. M.; LAMBUR, H.; OLIVE, P. L. Expression of phosphorylated histone H2AX in cultured cell lines following exposure to X-rays. **International journal of radiation biology**, v. 79, n. 5, p. 351–358, 2003.

MALHI, P. S.; ADAMS, G. P.; SINGH, J. Bovine model for the study of reproductive aging in women: follicular, luteal, and endocrine characteristics. **Biology of reproduction**, v. 73, n. 1, p. 45–53, 2005.

MEIROW, D.; BIEDERMAN, H.; ANDERSON, R. a; WALLACE, W. H. B. Toxicity of chemotherapy and radiation on female reproduction. **Clinical obstetrics and gynecology**, v. 53, n. 4, p. 727–739, 2010.

MEIROW, D.; NUGENT, D. The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. **Human Reproduction Update**, v. 7, n. 6, p. 535–543, 2001.

MOSCARIELLO, M.; WIELOCH, R.; KUROSAWA, A.; LI, F.; ADACHI, N.; MLADENOV, E.; ILIAKIS, G. Role for Artemis nuclease in the repair of radiation-induced DNA double strand breaks by alternative end joining. **DNA Repair**, v. 31, p. 29–40, 2015.

NIKITAKI, Z.; HELLWEG, C. E.; GEORGAKILAS, A. G.; RAVANAT, J.-L. Stress-induced DNA damage biomarkers: applications and limitations. **Frontiers in Chemistry**, v. 3, n. June, p. 1–15, 2015.

O'SHEA, L. C.; MEHTA, J.; LONERGAN, P.; HENSEY, C.; FAIR, T. Developmental competence in oocytes and cumulus cells: candidate genes and networks. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 58, n. 2, p. 88–101, 2012.

PÁSSARO, B. M. **Análise quantitativa dos resultados dos testes de controle de qualidade em radioterapia**. 2011. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Universidade de São Paulo, 2011.

PESTY, A.; DOUSSAU, M.; LAHAYE, J. B.; LEFÈVRE, B. Whole-body or isolated ovary ⁶⁰Co irradiation: Effects on in vivo and in vitro folliculogenesis and oocyte maturation. **Reproductive Toxicology**, v. 29, n. 1, p. 93–98, 2010.

RICH, T.; ALLEN, R. L.; WYLLIE, a H. Defying death after DNA damage. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 777–783, 2000.

RISTIC, D.; MODESTI, M.; KANAAR, R.; WYMAN, C. Rad52 and Ku bind to different DNA structures produced early in double-strand break repair. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 18, p. 5229–5237, 2003.

ROGAKOU, E. P.; BOON, C.; REDON, C.; BONNER, W. M. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. **Journal of Cell Biology**, v. 146, n. 5, p. 905–915, 1999.

ROGAKOU, E. P.; PILCH, D. R.; ORR, A. H.; IVANOVA, V. S.; BONNER, W. M. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 10, p. 5858–5868, 1998.

SAPORA, O.; BARONE, F.; BELLI, M.; MAGGIT, A.; QUINTILIANI, M.; TABOCCHINI, M. . A. Relationships between cell killing, mutation induction and DNA damage in X-irradiated V79 cells: the influence of oxygen and DMSO. **International Journal of Radiation Biology**, v. 60, n. 3, p. 467–482, 1991.

SHIMIZU, T.; HIRAI, Y.; MIYAMOTO, a. Expression of cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in granulosa cells from bovine ovary. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, n. 5, p. 65–70, 2013.

SONMEZER, M.; OKTAY, K. Fertility preservation in female patients. **Human reproduction update**, v. 10, n. 3, p. 251–266, 2004.

SOTO-SUAZO, M.; ZORN, T. Primordial germ cells migration: morphological and molecular aspects. **Animal Reproduction**, v. 2, n. 3, p. 147–160, 2005.

SUDHAKARAN, S.; UPPANGALA, S.; SALIAN, S. R.; HONGUNTIKAR, S. D.; NAIR, R.; KALTHUR, G.; ADIGA, S. K. Oocytes Recovered after Ovarian Tissue Slow Freezing Have Impaired H2AX Phosphorylation and Functional Competence. **Reproduction, fertility, and development**, 2014.

TAUHATA, L., et al. **Radioproteção e dosimetria: fundamentos**. 5a. ed. Rio de Janeiro: Instituto de Radioproteção e Dosimetria, 2003.

TEH, W. T.; STERN, C.; CHANDER, S.; HICKEY, M. The Impact of Uterine Radiation on Subsequent Fertility and Pregnancy Outcomes. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–8, 2014.

VAN ATTIKUM, H.; GASSER, S. M. The histone code at DNA breaks: a guide to repair? **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 6, n. 10, p. 757–765, 2005.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1717–1751, 2005.

W. H. B. WALLACE, S. M. SHALET, E. C. CROWNE, P. H. MORRIS-JONES, H. R. G. Ovarian Failure Following Abdominal Irradiation in Childhood: Natural History and Prognosis. **Clinical Oncology**, v. 1(2), p. 75–79, 1989.

WALLACE, W. H. B.; THOMSON, A. B.; KELSEY, T. W. The radiosensitivity of the human oocyte. **Human Reproduction**, v. 18, n. 1, p. 117–121, 2003.

WALLACE, W. H. B.; THOMSON, A. B.; SARAN, F.; KELSEY, T. W. Predicting age of ovarian failure after radiation to a field that includes the ovaries. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 62, n. 3, p. 738–744, 2005.

WO, J. Y.; VISWANATHAN, A. N. Impact of Radiotherapy on Fertility, Pregnancy, and Neonatal Outcomes in Female Cancer Patients. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 73, n. 5, p. 1304–1312, 2009.

YURUT-CALOGLU V., CALOGLU M., ESKIOCAK S., TASTEKIN E., OZEN A., KURKCU N., OZ-PUYAN F., KOCAK Z., U. C. Comparison of the protective roles of L - carnitine and amifostine against radiation - induced acute ovarian damage by histopathological and biochemical methods. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 11, n. 2, p. 447–453, 2015.