

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Santuza Silva Coelho

**MARCADOR DE CÉLULAS-TRONCO SOX2 É AMPLAMENTE EXPRESSO
EM CÉLULAS DA GRANULOSA LUTEINIZADA HUMANA DE MULHERES
SUBMETIDAS À ESTIMULAÇÃO OVARIANA CONTROLADA**

Belo Horizonte
2021

Santuza Silva Coelho

**MARCADOR DE CÉLULAS-TRONCO SOX2 É AMPLAMENTE EXPRESSO
EM CÉLULAS DA GRANULOSA LUTEINIZADA HUMANA DE MULHERES
SUBMETIDAS À ESTIMULAÇÃO OVARIANA CONTROLADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Patologia - área de concentração Patologia Experimental.

Orientadora: Prof. Dr^a. Helen Lima Del Puerto.

Coorientadores: Prof. Dr. Enio Ferreira.

Prof. Dr. Fernando Marcos dos Reis

Belo Horizonte
2021

043 Coelho, Santuza Silva.

Marcador de células-tronco SOX2 é amplamente expresso em células da granulosa luteinizada humana de mulheres submetidas à estimulação ovariana controlada [manuscrito] / Santuza Silva Coelho. – 2021.

78 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof. Dr^a. Helen Lima Del Puerto. Coorientadores: Prof. Dr. Enio Ferreira; Prof. Dr. Fernando Marcos dos Reis.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia.

1. Patologia. 2. Inibinas. 3. Células da Granulosa. 4. Oócitos. 5. Células-Tronco. 6. Fatores de Transcrição SOX. 7. Fertilização In Vitro. I. Del Puerto, Helen Lima. II. Ferreira, Enio. III. Reis, Fernando Marcos dos. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 616

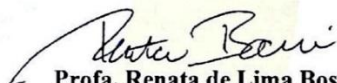
FOLHA DE APROVAÇÃO

“MARCADOR DE CÉLULAS TRONCO SOX2 É AMPLAMENTE EXPRESSO EM CÉLULAS DA GRANULOSA LUTEINIZADA HUMANA DE MULHERES SUBMETIDAS À ESTIMULAÇÃO OVARIANA CONTROLADA”

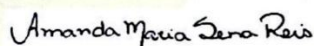
SANTUZA SILVA COELHO

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Patologia, como requisito para obtenção do grau de Mestre em **PATOLOGIA**, área de concentração **PATOLOGIA INVESTIGATIVA**.

Aprovada em 27 de maio de 2021, pela banca constituída pelos membros:



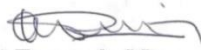
Prof. Renata de Lima Bossi
PUC/MG e Clínica Origen



Prof. Amanda Maria Sena Reis
ICB/UFMG



Prof. Enio Ferreira
ICB/UFMG – COORIENTADOR



Prof. Fernando Marcos dos Reis
Faculdade de Medicina/UFMG - COORIENTADOR



Prof. Helen Lima Del Puerto
ICB/UFMG - ORIENTADORA

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, com sua infinita bondade, por ter me dado força, porque sem Ele eu nada seria.

Ao meu pai Isac Mourão (*in memoriam*) pela vida e educação e minha adorável e amável mãe Sonildes Mourão, que não mede esforços para realizar meus sonhos. Aos meus irmãos Jozilan Coelho, Thais Coelho e Naira Coelho por terem depositado a confiança e terem se orgulhado a cada conquista minha. Ao meu cunhado Jardel Fontes e minha cunhada Cristiane Coelho por todo amor, apoio e entendimento. Aos meus sobrinhos Christina, Gabriel e Ana Luiza por trazerem alegria aos meus dias. Obrigada por sonharem comigo, essa vitória é nossa, amo muito vocês!

Á minha orientadora, Dra. Helen Lima Del Puerto, que foi mais que uma orientadora, uma mãe, um exemplo de ser humano na docência, por ter acreditado na minha capacidade, por te me ensinado com tanto amor, paciência e por permitir que eu conhecesse o mundo científico e trilhasse essa trajetória de tamanho aprendizado.

Aos meus Co-orientadores Dr. Enio Ferreira e Dr. Fernando Marcos dos Reis, pelas contribuições, experiência e conhecimento.

Á Camila Almeida por ter sido pioneira nesse estudo e com muita paciência me orientou nesse caminho, aos meus colegas do Laboratório do Comportamento Celular pelo carinho, sugestões, apoio, conversas, soluções das minhas dúvidas e todo aprendizado no meio científico.

Á todos os professores que colaboraram para minha formação acadêmica e o meu desenvolvimento pessoal.

Á Clara Bernardino e Fernanda Aranha por terem sido grandes amigas e com toda doçura ter me dado apoio, força, conselhos e também compartilhado os medos, as inseguranças, as risadas, as lágrimas e muito conhecimento. Á Flávia Aguiar e Deivenita do Carmo pela amizade, sabedoria e apoio. Obrigada por tirarem a água do meu barco!

Á todos os meus amigos pelas orações, palavras de carinho, força e por terem acreditado em mim e serem o motivo para que eu não desistisse.

As pacientes pela contribuição do meu trabalho.

Á todos que contribuíram para a realização do projeto e ao órgão financiador pelo apoio financeiro que proporcionou o desenvolvimento desse trabalho.

Muito Obrigada!



Este trabalho foi realizado no Laboratório de Comportamento Celular (LCC), no Laboratório de Patologia Comparada (LPC) do Departamento de Patologia Geral – ICB / UFMG, e na Fertibaby – Medicina Reprodutiva, com apoio financeiro do CNPq, FAPEMIG e CAPES.

RESUMO

O ovário humano é responsável por fornecer oócitos maduros e competentes para a reprodução e contém células que exibem marcadores de células-tronco, incluindo uma subpopulação de células da granulosa. As inibinas podem ser consideradas um marcador de atividade folicular e reserva ovariana. Há evidências de que células menos diferenciadas com características de células-tronco podem indicar anormalidades da função ovariana que levam à infertilidade. SOX2 é um fator de transcrição que determina o destino das células-tronco, atuando como um ativador ou supressor de genes envolvidos na diferenciação, proliferação e apoptose celular. Este estudo teve como objetivo investigar a expressão gênica e proteica de SOX2 e alfa-Inibina em células da granulosa luteinizada (CGL) de pacientes submetidas à estimulação ovariana controlada (EOC), e correlacionar esses marcadores com o número total de oócitos e número de oócitos maduros coletados, dentre outros parâmetros clínicos. Trinta e duas mulheres submetidas à EOC para fertilização *in vitro* foram prospectivamente incluídas no estudo. As CGL foram isoladas do fluido folicular, e a expressão da proteína e do gene SOX2 e alfa-inibina em CGL foi avaliada por ICQ (cellblock) e PCRq. Os resultados demonstraram imunocoloração positiva para alfa-inibina e SOX2 em CGL em todas as pacientes, sendo que a marcação nuclear positiva de SOX2 foi observada na maioria das células (média de 95%), com predomínio de células com marcação nuclear forte (média de 64,2%). A marcação citoplasmática foi positiva para alfa-inibina em todos os casos, com média de 66% de marcação positivas (40,6% com coloração forte, 25,7% com coloração fraca e moderada). Em concordância, a expressão de mRNA de alfa-inibina foi detectada em todas as CGL das pacientes. No entanto, a imunolocalização nuclear de SOX2 não apresentou correlação com o número de oócitos puncionados e sua maturação, assim como não indicou correlação com os parâmetros clínicos das pacientes submetidos à EOC. Entretanto, foi observada pela primeira vez a ampla imunolocalização nuclear de SOX2 em CGL, e, no entanto, mesmo sem nenhuma correlação clínica significativa dessa marcação, a ampla expressão de SOX2 indica um potencial das células da granulosa na diferenciação em outros tipos celulares, e seu potencial uso na medicina regenerativa.

Palavras-chave: Alfa-inibina; FIV, Células da Granulosa Humana; SOX2; Oócitos; Células-tronco.

ABSTRACT

The human ovary is responsible for providing mature and competent reproductive oocytes and contains cells that exhibit stem cell markers, including a subpopulation of granulosa cells (GC). Inhibins can be considered a marker of follicular activity and ovarian reserve. There is evidence that less differentiated cells with stem cell characteristics may indicate abnormalities of ovarian function that lead to infertility. SOX2 is a transcription factor that determines the fate of stem cells, acting as an activator or suppressor of genes involved in cell differentiation, proliferation, and apoptosis. This study aimed to evaluate the gene and protein expression of SOX2 and alpha-inhibin in the luteinized granulosa (hGC) cells of patients submitted to controlled ovarian stimulation (COS) and the correlation with the total number of oocytes, the number of mature oocytes collected, among other clinical parameters. Thirty-two women who underwent HOC for in vitro fertilization were prospectively included in the study. GC was isolated from the follicular fluid. The protein and gene expression of SOX2 and alpha-inhibin were evaluated in GC by ICC (Cell Block) and qPCR. The results demonstrated positive immunostaining for alpha-inhibin and SOX2 in CGL in all patients, and positive SOX2 nuclear was observed in most cells (95%), predominantly cells with strong nuclear staining (64.2 %). In addition, positive cytoplasmic staining with alpha-inhibin in CGL was observed in all cases, with an average of 66% of positive cells (40.6% with strong staining, 25.7% with weak and moderate staining). Accordingly, the expression of alpha-inhibin mRNA was detected in all patients' CGL. However, the SOX2 nuclear immunolocalization did not correlate with the number of punctured oocytes and their maturation. It did not indicate a correlation with the clinical parameters of patients undergoing COS. However, for the first time, extensive SOX2 nuclear immunolocalization in LGC was observed. Yet, even without any significant clinical correlation of SOX2 staining, the wide expression of SOX2 indicates the granulosa cells' potential to differentiate into other cell types and its potential use in regenerative medicine.

Keywords: Alpha-inhibin; FIV, Human Granulosa Cells; SOX2; Oocytes; Stem cells.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|-----|
| Figura 1- Desenho esquemático do ovário caracterizando cada estágio da foliculogênese..... | 188 |
| Figura 2 - Crescimento Folicular. | 199 |
| Figura 3 - Folículo Secundário..... | 20 |
| Figura 4 – Folículo Terciário ou Antral | 21 |
| Figura 5 – Fólículo Maduro (de Graaf)..... | 23 |
| Figura 6 - Desenvolvimento folicular. | 23 |
| Figura 7 - Fotomicrografia de cellblock demonstrando células da granulosa humana luteinizada, coradas pela Hematoxilina e Eosina | 26 |
| Figura 8 - Ação dos fatores de transcrição..... | 29 |
| Figura 9 - Estrutura de SOX2..... | 30 |
| Figura 10 -Estrutura das inibinas e ativinas | 31 |
| Figura 11 – Ação da inibina e ativina. | 32 |
| Figura 12A - Seções de bloco de células da granulosa humana luteinizadas de punção ovariana (Imunomarcção nuclear forte)..... | 45 |
| Figura 12B - Seções de bloco de células da granulosa humana luteinizadas de punção ovariana (Imunomarcção nuclear fraco/moderado)..... | 45 |
| Figura 13A - Seções de bloco de células da granulosa humana luteinizadas de punção ovariana (Imunocoloração citoplasmática forte). | 46 |
| Figura 13B - Seções de bloco de células da granulosa humana luteinizadas de punção ovariana(Imunocoloração citoplasmática fraco/moderado) | 47 |
| Figura 16 - Curvas de Melting. | 48 |
| Figura 17 - Correlação da expressão gênica de SOX2 e % de oócitos maduros. | 49 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Informações dos anticorpos utilizados..... | 40 |
| Tabela 2 - Primers de oligonucleotídeos usados para PCRq..... | 42 |
| Tabela 3 - Principais características clínicas das participantes do estudo (n=32)..... | 44 |
| Tabela 4 - Porcentagem das células marcadas SOX2. | 46 |
| Tabela 5 - Porcentagem das células marcadas alfa-inibina..... | 47 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------------|---|
| ActRII | Receptor serina-treonina-quinase tipo II |
| AMH | Anti-mülleriano |
| ASCs | Do inglês <i>Adult Stem Cells</i> |
| BMP-15 | Do inglês <i>human bone morphogenetic protein-15</i> |
| BMPs | Do inglês <i>Bone morphogenetic protein</i> |
| CAPES | Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior |
| cDNA | DNA complementar |
| CGL | Células da granulosa luteinizada |
| CGs | Células da granulosa |
| CNPq | Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico |
| CT | Do inglês <i>Cycle Threshold</i> |
| DAB | Diaminobenzidina |
| DMEM | Do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> |
| DNA | Do inglês <i>desoxyribonucleic acid</i> |
| EOC | Estimulação ovariana controlada |
| EUA | Estados Unidos Da América |
| FAPEMIG | Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais |
| FIV | Fertilização <i>in vitro</i> |
| FSH | Do inglês <i>follicle stimulating hormone</i> |
| FT | Fator de transcrição |
| GDF-9 | Do inglês <i>growth differentiation factor-9</i> |
| GnRH _a | Do inglês <i>Gonadotrophin-releasing hormone agonists</i> |
| hCG | Gonadotrofina coriônica humana |
| HE | Hematoxilina e Eosina |
| hESCs | Do inglês <i>human embryonic stem cells</i> |
| HMG | Do inglês <i>High mobility group</i> |
| ICB | Instituto de Ciências Biológicas |

| | |
|-------|--|
| ICQ | Imunocitoquímica |
| ICSI | Do inglês <i>intracytoplasmic sperm injection</i> |
| IGF-1 | Do inglês <i>insulin-like growth fator 1</i> |
| Kit-L | Do inglês <i>kit ligand</i> |
| LCC | Laboratório de Comportamento Celular |
| LF | Líquido folicular |
| LH | Do inglês <i>luteinizing hormone</i> |
| LIF | Do inglês <i>leukemia-inhibiting factor</i> |
| LPC | Laboratório de Patologia Comparada |
| MII | Metáfase II |
| mRNA | RNA mensageiro |
| NANOG | Do inglês <i>Nanog Homeobox</i> |
| OCT4 | Do inglês <i>Octamer binding transcription factor 4</i> |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| PBS | Do inglês <i>phosphate buffered saline</i> |
| PCR | Do inglês <i>polymerase chain reaction</i> |
| RNA | Do inglês <i>ribonucleic acid</i> |
| rtPCR | Do inglês <i>reverse-transcriptase polymerase chain reaction</i> |
| SOX | Região de determinação do sexo Y-box |
| SOX2 | Região de determinação do sexo Y-box2 |
| Sry | Do inglês <i>sex-determining region Y</i> |
| TGFβ | Do inglês <i>transforming growth factor beta</i> |
| TRA | Tecnologia de reprodução assistida |
| TRI | Trizol |
| UFMG | Universidade Federal de Minas Gerais |
| ZP1 | Zona pélucida |
| β-hCG | Hormônio beta gonadotrofina coriônica humana |
| μL | Microlitros |

SUMÁRIO

| | | |
|------|--|--|
| 1 | INTRODUÇÃO | 155 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO | Erro! Indicador não definido. 7 |
| 2.1 | Foliculogênese Ovariana..... | 17 |
| 2.2 | Hiperestimulação Ovariana Controlada | 23 |
| 2.3 | Células da Granulosa | 24 |
| 2.4 | Regulação da Expressão Gênica | 288 |
| 2.5 | Fator de Transcrição SOX2 | 289 |
| 2.6 | Inibina | 31 |
| 3 | OBJETIVOS | 344 |
| 3.1 | Objetivo Geral..... | 344 |
| 3.2 | Objetivos Específicos | 344 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 355 |
| 4.1 | Aspectos Éticos..... | 355 |
| 4.2 | O Experimento..... | Erro! Indicador não definido. 5 |
| 4.3 | Critérios de Inclusão e Exclusão..... | Erro! Indicador não definido. 5 |
| 4.4 | Estimulação ovariana controlada, aspiração de folículos e fertilização <i>in vitro</i> | 355 |
| 4.5 | Parâmetros Clínicos | 377 |
| 4.6 | Separação do Líquido Folicular e Células da Granulosa..... | 377 |
| 4.7 | Processamento Histológico - Cellblock das Células da Granulosa | 388 |
| 4.8 | Imuno-citoquímica para SOX2 e Alfa-inibina..... | 399 |
| 4.9 | Avaliação imuno-citoquímica..... | 40 |
| 4.10 | Extração de RNA Total e Transcrição Reversa | 40 |
| 4.11 | Primers Específicos..... | 41 |
| 4.12 | Análise Estatística..... | 42 |

| | | |
|----------|--|-----|
| 5 | RESULTADOS | 444 |
| 5.1 | Características Clínicas das Pacientes em Estudo | 444 |
| 5.2 | Resultados imuno-citoquímicos..... | 444 |
| 5.2.1 | Correlação dos Parâmetros Clínicos com a ICQ | 477 |
| 5.4 | Expressão de mRNA de SOX2 e Alfa-inibina..... | 488 |
| 5.4.1 | Correlação dos parâmetros clínicos com a PCRq | 488 |
| 6 | DISCUSSÃO | 50 |
| 7 | CONCLUSÃO | 533 |
| 8 | PERSPECTIVAS FUTURAS | 544 |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 555 |
| | ANEXO A | 62 |
| | ANEXO B | 74 |
| | ANEXO C | 78 |

1 INTRODUÇÃO

As células da granulosa (CGs) constituem o revestimento interno do folículo ovariano e possui uma importante função na maturação oocitária, sendo que uma disfunção nessas células podem ocasionar uma foliculogênese e esteroidogênese anormais. A presença dessas células é indispensável para a formação de um microambiente favorável, tanto bioquímico quanto metabólico, ao redor do oócito, visto que produzem hormônios esteroides e não esteroides, e fatores de crescimento importantes para a maturação oocitária (HENNET; COMBELLES, 2012).

As células da granulosa possuem características de células multipotentes, que se transdiferenciaram em neurônios, condroblastos, e osteoblastos *in vitro* na presença de meio LIF (fator inibidor de leucemia - uma citocina comumente usada em meios de cultura que dá suporte para o desenvolvimento e crescimento de células-tronco), sugerindo que no folículo ovariano, as células da granulosa estão em vários estágios de diferenciação (KOSSOWSKA-TOMASZCZUK *et al.*, 2009). Foi encontrado LIF em ovários humanos fetais e adultos (ABIR *et al.*, 2004) podendo ser detectado no líquido folicular e possivelmente relacionado na transição de folículos primordiais para primários (NILSON; KEZELE; SKINNER, 2002).

Os fatores de transcrição (FT) são importantes para regulação dos padrões da expressão gênica celular, controlando mudanças importantes no desenvolvimento, diferenciação e funções das células. Os FT têm sua ação em promotores gênicos, sendo capazes de potencializar a ativação ou repressão da transcrição de genes específicos. As proteínas NANOG, OCT4, SOX2 são exemplos de FT expressos em células-tronco embrionárias humanas (hESCs) e células-tronco cancerosas e apresenta uma importante função na manutenção de características de indiferenciação celular como a auto-renovação e pluripotência (SMARAKAN *et al.*, 2019).

Os FT da família SOX controlam criticamente o destino e a diferenciação celular nos principais processos de desenvolvimento, e sua regulação positiva ou negativa pode ser importante para a maturação de diferentes tipos celulares (KAMACHI; KONDOH, 2013). O fator de transcrição SOX2 tem papel fundamental na regulação das características das células-tronco, demonstrando importância em várias fases do desenvolvimento embrionário e influenciando no destino celular e diferenciação (HAGEY *et al.*, 2018).

As Inibinas são glicoproteínas da superfamília do fator de crescimento TGF- β , compostas pelas subunidades $\alpha\beta$ A (inibina A) e $\alpha\beta$ B (inibina B) (PAIWATTANANUPANT; PHUPONG; 2008), são sintetizadas por diversos tipos celulares e em diversos tecidos e órgãos diferentes. A fonte de inibina B são as células da granulosa nos folículos em desenvolvimento, o que se torna um marcador de atividade folicular, com níveis elevados na fase folicular e níveis baixos e até indetectáveis na pós-menopausa e a inibina A é secretada pelo corpo lúteo e pela placenta (REIS; REZENDE, 2009).

Podemos observar na literatura que a diferenciação das células da granulosa, assim como a ação de fatores de crescimento sobre elas é de suma importância para sua função, sendo indispensável para sua atividade fisiológica e conseqüentemente para a maturação oocitária (ALAM; MIYANO, 2019). Estudos têm descrito a expressão de marcadores de células-tronco em células da granulosa, incluindo OCT-4, NANOG e SOX2, como também a capacidade de transdiferenciar células da granulosa *in vitro* (JOZKOWIAK *et al.*, 2020).

Na reprodução humana assistida, o estudo do ambiente que cerca o oócito, como as células da granulosa e o líquido folicular, fornece pistas importantes sobre sua qualidade, uma vez que sua avaliação direta é limitada pela necessidade de submetê-lo, apenas, a técnicas não invasivas a fim de preservá-lo. Além disso, observa-se na literatura que a diferenciação das células granulosas é importante para sua função e para maturação oocitária. Diante do exposto, esse estudo justifica-se pela busca de indicadores de qualidade funcional do oócito e do ambiente no qual está inserido com o objetivo de aumentar a probabilidade de gravidez das pacientes, além de investigar fatores de transcrição relacionados à diferenciação celular, como por exemplo, SOX2.

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a expressão gênica e proteica de SOX2 e alfa-Inibina em células granulosa humana luteinizada de pacientes submetidas à Hiperestimulação Ovariana Controlada (HOC) e correlacionar com os parâmetros clínicos das pacientes, assim como investigar o padrão de expressão de SOX2 nas células da granulosa humana, e seu impacto na foliculogênese e maturação oocitária.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

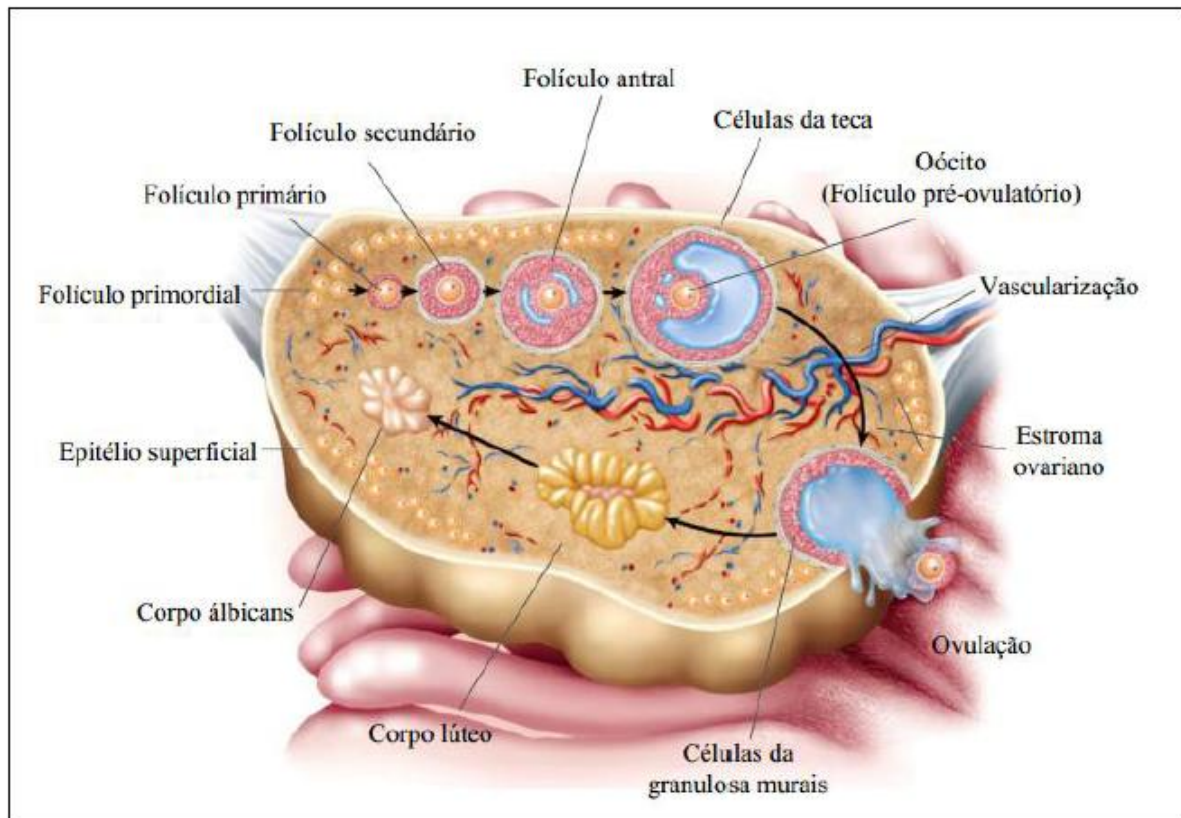
2.1 FOLICULOGÊNESE OVARIANA

Apesar de muitos dos processos compreendidos na reprodução feminina serem cíclicos, o desenvolvimento e a atresia dos folículos ocorrem de forma contínua desde a vida intrauterina até o final da vida reprodutiva (CAMPOS *et al.*, 2011a). Durante a vida reprodutiva um pequeno número de folículos primordiais é estimulado a crescer, quando inicia o crescimento, os folículos entram em um processo de desenvolvimento e maturação, porém a maioria dos folículos, não atingirá a ovulação, visto que a maioria passa por um processo fisiológico denominado como atresia folicular (FAIR, 2003; MARSTRÖM *et al.*, 2002).

O folículo é visto como a unidade morfológica e funcional do ovário, definido por um oócito que é circundado por células somáticas (células da granulosa) e é responsável por oferecer um ambiente propício para o crescimento e maturação do oócito (CORTVRINDT; SMITZ, 2001). O ovário é responsável por promover o desenvolvimento dos folículos e a ovulação, bem como a produção de hormônios que controlam o ciclo menstrual e a gravidez (JOZKOWIAK *et al.*, 2020).

A foliculogênese pode ser caracterizada como o processo de formação, crescimento e maturação folicular, inicia com a formação do folículo primordial, primário, secundário, terciário e atingindo o estágio de folículo de Graaf ou pré-ovulatório e posteriormente o corpo lúteo. (Figura 1). (CAMPOS *et al.*, 2011a). Durante a foliculogênese, a angiogênese é essencial para a função das células da granulosa, fornecendo nutrientes e oxigênio (JOZKOWIAK *et al.*, 2020).

Figura 1- Desenho esquemático do ovário caracterizando cada estágio da foliculogênese.



Fonte: MARTINS, 2009.

A morfologia folicular é modificada constantemente no decorrer do processo da foliculogênese, tendo como principal função o desenvolvimento do oócito, a proliferação e diferenciação das células da granulosa e da teca e também o aparecimento da cavidade antral (BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006).

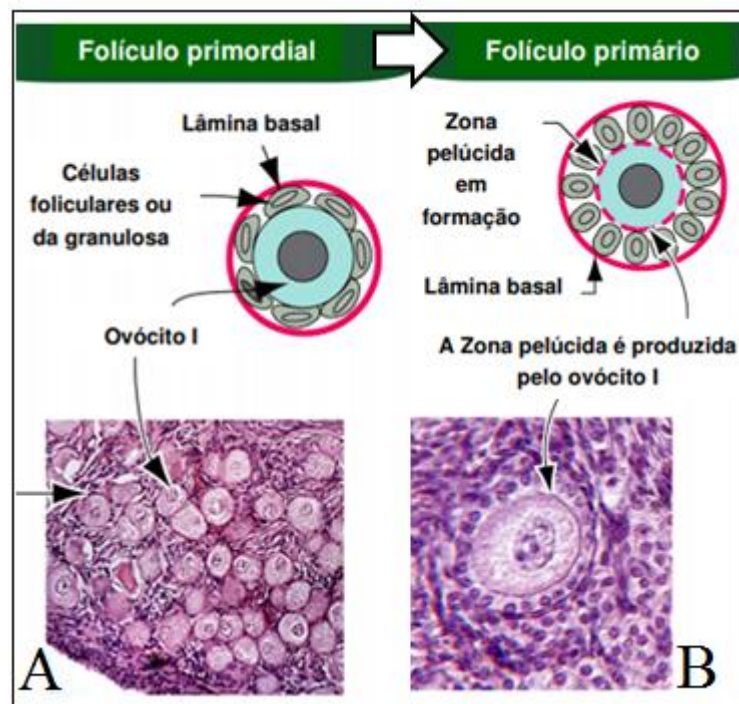
Diante das modificações morfológicas pode-se constatar que a população folicular nos ovários é muito heterogênea (SAUMANDE, 1991). Dessa maneira, conforme o estágio de desenvolvimento, os folículos são classificados em pré-antrais (primordiais, primários e secundários) ou antrais (terciários e pré-ovulatórios) (CAMPOS *et al.*, 2011a).

Os folículos primordiais compõem o pool de reserva folicular, apresentando cerca de 95% de toda população folicular nos ovários dos mamíferos. O folículo primordial inicia a fase de crescimento por meio de um processo denominado ativação folicular, quando os folículos decorrem do pool de repouso para entrar no pool crescente. Esse acontecimento é definido por várias mudanças morfológicas que compreende o aumento do diâmetro oocitário, a proliferação das células da granulosa, mantendo uma única camada, e também a mudança

do formato destas células de pavimentosa para cúbicas (Figura 2A) (MCGEE; HSUEH, 2000).

Os folículos são designados primários quando o oócito passa a ser circundado por uma camada completa de células da granulosa de formato cúbico (GOUGEON; BUSSO, 2000). No decorrer do crescimento destes folículos, as células da granulosa se proliferam e ocorre um aumento do tamanho do oócito e do conteúdo proteico (LIU *et al.*, 2015). Uma característica determinante é a presença de uma zona pelúcida, constituída por glicoproteínas (ZP1, ZP2 e ZP3), que circunda o oócito (LEE V, 2000) (Figura 2B). Nos estágios iniciais do processo de desenvolvimento, o hormônio anti-mülleriano (AMH), é produzido pelos folículos e demonstra ser um marcador promissor na indicação da quantidade e qualidade do folículo ovariano (THEMMEN, 2005).

Figura 2 - Crescimento Folicular.

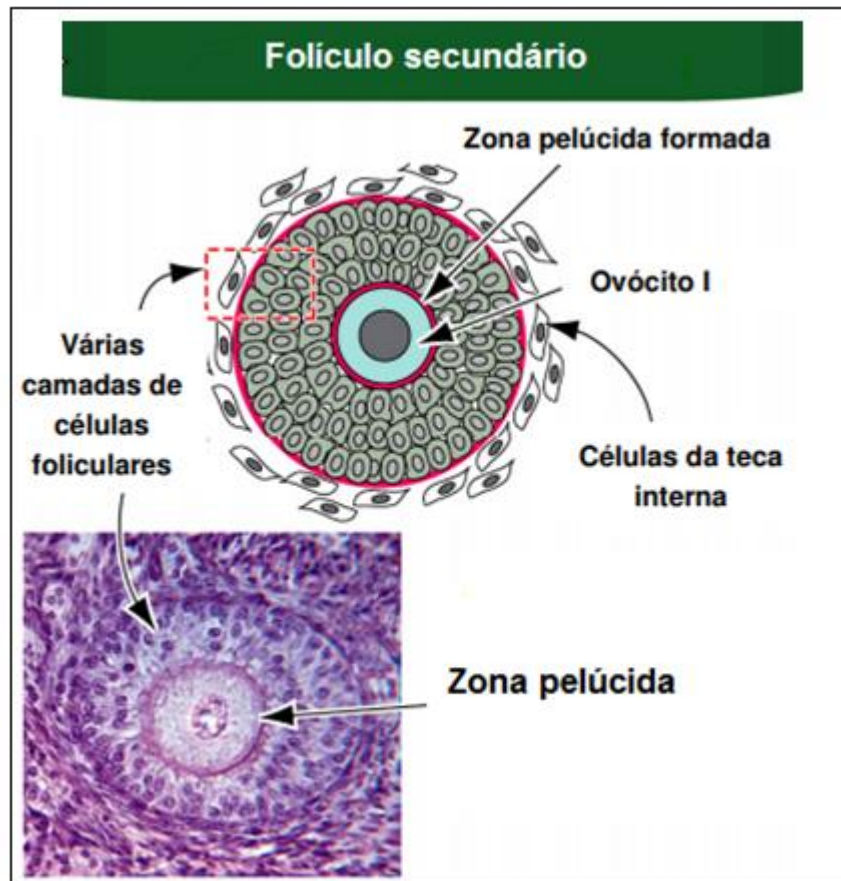


Legenda: A. Folículo Primordial, oócito envolvido por uma única camada de células da granulosa. B. Folículo Primário, oócito envolvido por camada de células da granulosa de forma cúbica, início da formação da zona pelúcida. Fonte: SILVA, 2010a.

Os folículos são descritos como secundários, quando apresentam duas a três camadas de células da granulosa com formato cúbico e células da teca em torno da membrana basal. A zona pelúcida se torna mais evidente e o oócito entra em fase de crescimento intenso aumentando seu volume, devido ao acúmulo de água, íons, carboidratos, proteínas e lipídeos (MCGEE; HSUEH, 2000) (Figura 3). Nessa fase as células da granulosa desenvolvem o

hormônio folículo-estimulante (FSH), estrogênio e receptores de androgênio. Simultaneamente as células da teca adquirem receptores de hormônio luteinizante (LH) e a capacidade de sintetizar hormônios esteroides (STRAUSS; WILLIAMS, 2014).

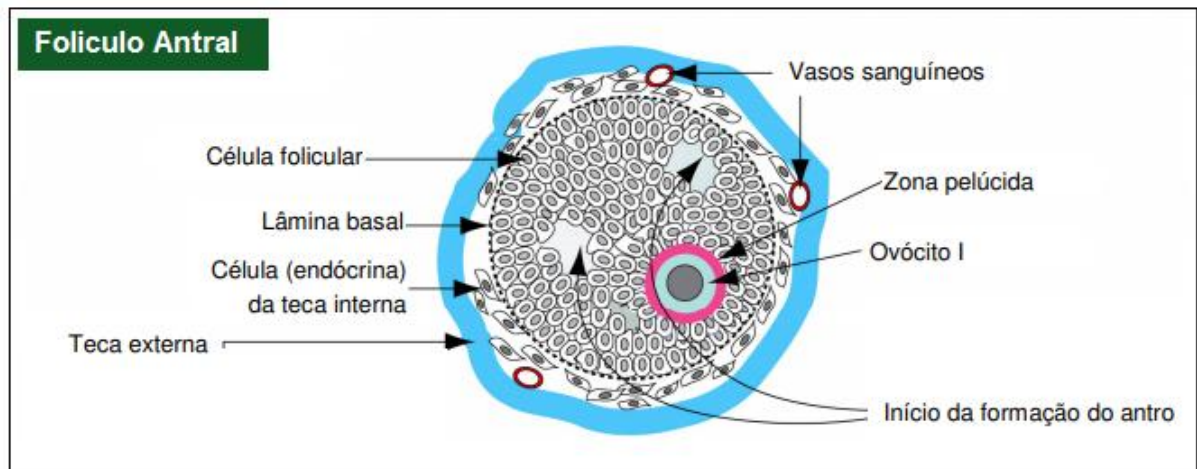
Figura 3 - Folículo secundário.



Legenda: Oócito secundário envolvido por camadas de células da granulosa de formato cúbico, presença de células da teca interna e externa, zona pelúcida evidente e formação da cavidade antral. Fonte: SILVA, 2010a.

A fase em que os folículos passam a ser designados terciários ou antrais é caracterizada por células da granulosa que são dispostas em várias camadas, com a formação de uma cavidade repleta de fluido folicular, entre essas camadas de células da granulosa, que pode ser denominada antro. O fluido folicular que preenche esta cavidade contém água, eletrólitos, proteínas séricas e uma alta concentração de hormônios esteroides secretados pelas células da granulosa (CAMPOS *et al.*, 2011a) (FIGURA 4).

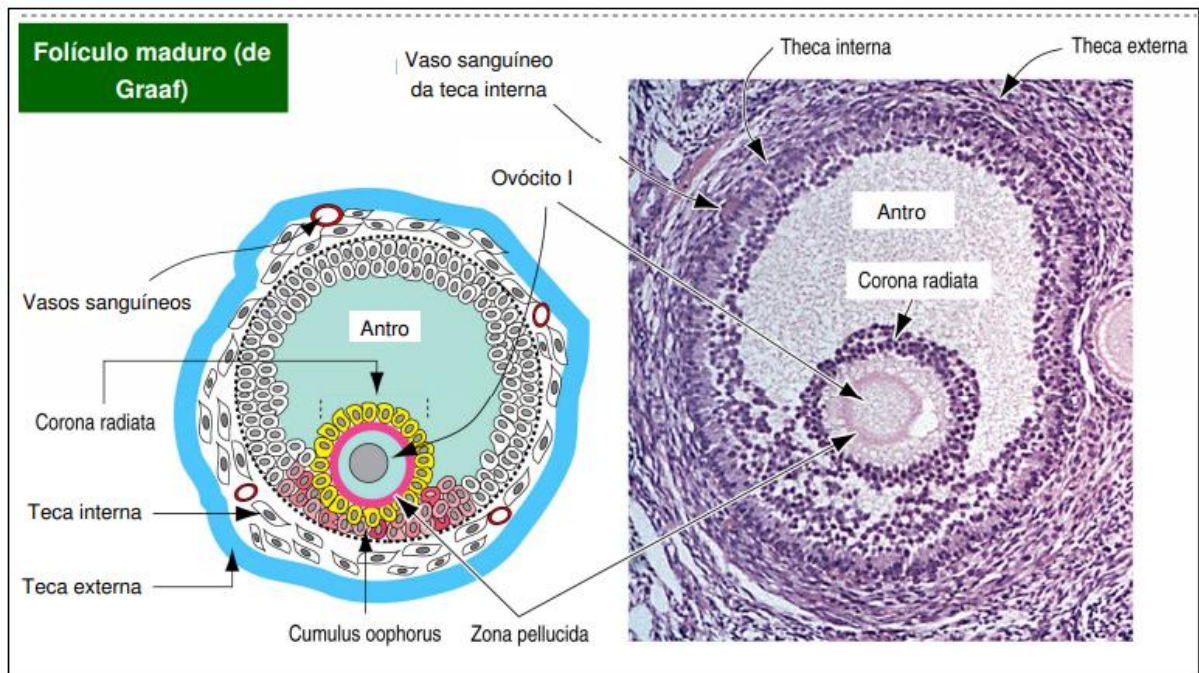
Figura 4 - Folículo terciário ou Antral



Legenda: Presença de células da granulosa dispostas em várias camadas e formação de uma cavidade cheia de líquido folicular (antro). Fonte: SILVA, 2010a.

O folículo maduro (de graaf) é formado por um oócito, na fase da meiose metáfase II, totalmente desenvolvido, pronto para ser fecundado. O oócito é circundado pela zona pelúcida e por células da granulosa que constitui a corona radiata e o *cumulus oophorus*, envolvido por uma pequena cavidade antral, uma membrana basal e duas camadas de células tecais, sendo a teca interna e teca externa (JONES; SHIKANOV, 2019) (Figura 5).

Figura 5 – Folículo maduro (de Graaf)



Legenda: Presença de oócito totalmente desenvolvido, circundado por corona radiata e *cumulus oophorus*, cavidade antral e células da teca interna e externa. Fonte: SILVA, 2010a.

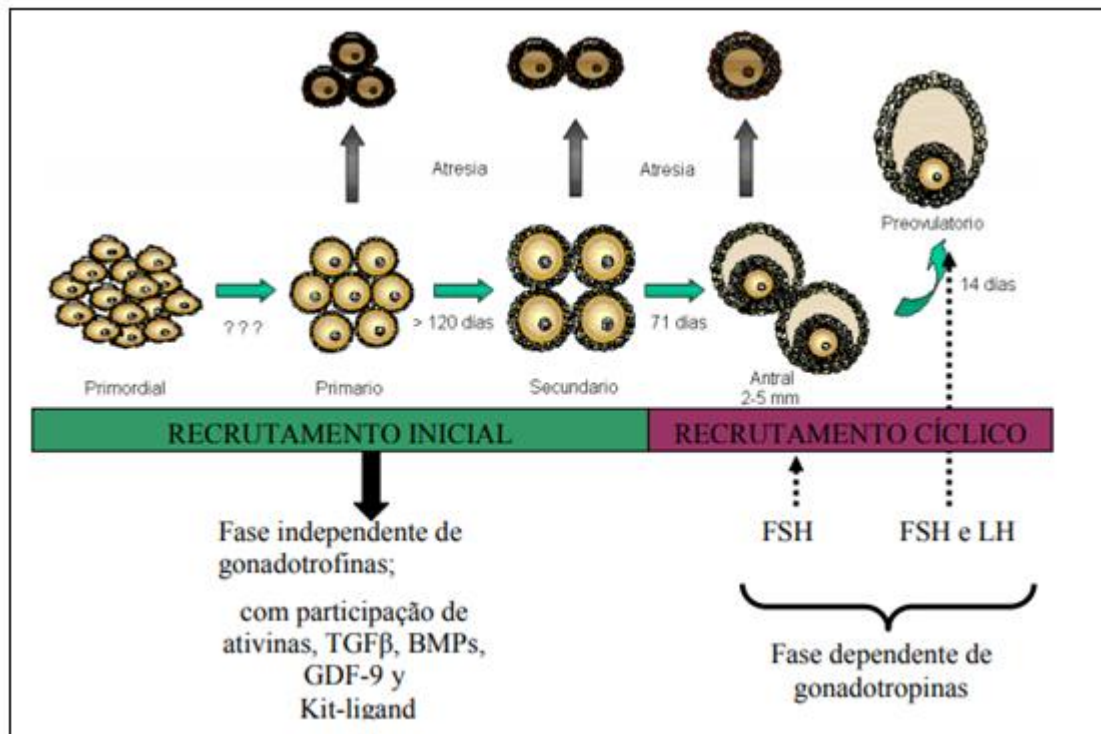
Dentre os vários fatores que podem estar compreendidos no início da formação do antro, ressalta o Fator de Crescimento e Diferenciação 9 (GDF-9) e a Proteína Morfogênica Óssea 15 (BMP-15), originários do oócito; as células da granulosa produzem vários fatores autócrinos e Parácrinos como Kit-L, ativinas, inibinas, hormônio antimulleriano (AMH) e Fator do Crescimento Transformador α (TGF- α) que sincronizam o crescimento do oócito, a proliferação das células da granulosa e a diferenciação das células da teca (DUMESIC et al., 2015).

Depois da formação do antro, os folículos se tornam dependentes de gonadotrofinas, em que o FSH e LH que determinam os mecanismos primários a fim de controlar a seleção e a dominância dos folículos, através dos eixos de *feedback* entre hipotálamo-hipófise-ovário (HENNET; COMBELLES, 2012). O FSH é o principal hormônio que controla o desenvolvimento dos folículos, resultando na síntese e secreção de estradiol e inibina pelas células da granulosa dos folículos maiores e dominantes (YU *et al.*, 2003).

É considerado que a dominância folicular começa quando os folículos maiores atingem altos níveis do fator de crescimento semelhante á insulina - 1 (IGF-1), estradiol e inibina, sendo a inibina responsável por modular a liberação de FSH pela adenohipófise (DRIANCOURT, 2001). Ao mesmo tempo, os folículos obtêm mais receptores para LH, os que tornam menos responsivos ao FSH e conseqüentemente cada vez mais dependentes de LH (SARAIVA *et al.*, 2010). Concluída a dominância folicular, os folículos crescem rapidamente e o pico de LH finalmente resulta na ovulação (Figura 6) (MATSUDA *et al.*, 2012).

Depois da ovulação, o local ocupado previamente pelo folículo é preenchido por fibroblastos, células do sistema imune e células musculares lisas (WEBB *et al.*, 2002), células endoteliais, células da teca interna e células da granulosa que sofrem hiperplasia e/ou hipertrofia (BERTAN, 2004). Essas células em conjunto, proporcionam primeiramente a formação de uma estrutura denominada como corpo hemorrágico, que se organiza para desenvolver o corpo lúteo (DIAZ *et al.*, 2002).

Figura 6 - Desenvolvimento folicular.



Legenda: Nas fases dependentes e independentes de gonadotrofinas. Ao longo de toda esta diferenciação parte da população folicular será eliminada por atresia. Fonte: SILVA *et al.*, 2006b.

2.2 ESTIMULAÇÃO OVARIANA CONTROLADA

A infertilidade é uma doença do sistema reprodutor masculino ou feminino, definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como a incapacidade de um casal em alcançar a gravidez após um ano ou mais de relações sexuais regulares sem proteção contraceptiva (LEAVER, 2016). No sistema reprodutor masculino a infertilidade é frequentemente causada por problemas na ejeção do sêmen, ausência ou baixos níveis de espermatozoide, ou forma anormal (morfologia) e movimento (motilidade) do espermatozoide. No sistema reprodutor feminino a infertilidade é causada por várias anormalidades dos ovários, útero, trompas uterinas, sistema endócrino, dentre outras (VENKATESH; SURESH; TSUTSUMI, 2014).

As estimativas indicam que a infertilidade afeta milhões de pessoas em idade reprodutiva em todo o mundo ocasionando um impacto sobre a saúde psicológica do casal (ZHANG *et al.*, 2016). Teoricamente, tentativas para aumentar o número de oócitos podem ampliar as chances de ocorrer fertilização em pacientes anovulatórias. Deste modo, protocolos de estimulação ovariana foram elaborados, podendo ser utilizado isoladamente ou em conjunto com inseminação intrauterina e outras tecnologias de reprodução assistida

(PASQUALOTTO, 2007).

A Estimulação Ovariana Controlada (EOC) é a base dos procedimentos de reprodução assistida para o tratamento da infertilidade. Tem como objetivo obter um número adequado de oócitos que serão fertilizados *in vivo* como o coito programado e inseminação intrauterina ou coletados, através de uma aspiração folicular, para serem fertilizados por técnicas *in vitro* como a fertilização *in vitro* (FIV) e injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) (LOBACH *et al.*, 2017). A estimulação ovariana é um processo individual, levando em consideração vários fatores como a idade da mulher, reserva ovariana, duração e causas da infertilidade (CHAUFFOUR *et al.*, 2016).

A probabilidade de atingir bons resultados na reprodução assistida está associada à qualidade dos gametas utilizados para gerar os embriões. Para conceber um oócito maduro e de qualidade ao longo da foliculogênese é importante que o processo de desenvolvimento e maturação folicular seja bem regulado (ALMEIDA *et al.*, 2018a).

A avaliação direta dos oócitos é limitada, portanto considera-se a necessidade de usar outras técnicas não invasivas, como a análise morfométrica e morfológica, sendo relevante a descoberta de marcadores de qualidade no fluido folicular e nas células da granulosa, que visam à melhoria dos resultados de tratamentos de tecnologias de reprodução (WALLACE *et al.*, 2012). Lobach *et al.*, 2017 evidenciou que o aumento da expressão do gene da caspase-3 em células da granulosa está associado a pior resposta ovulatória em humanos, podendo ser considerado um marcador da qualidade oocitária.

A qualidade oocitária é um dos fatores mais importantes, podendo ser um indicador de uma probabilidade de uma gravidez bem-sucedida, consequentemente um microambiente folicular apropriado é indispensável para a foliculogênese normal, para o desenvolvimento do oócito e posteriormente a ovulação (LOBACH *et al.*, 2017).

2.3 CÉLULAS DA GRANULOSA

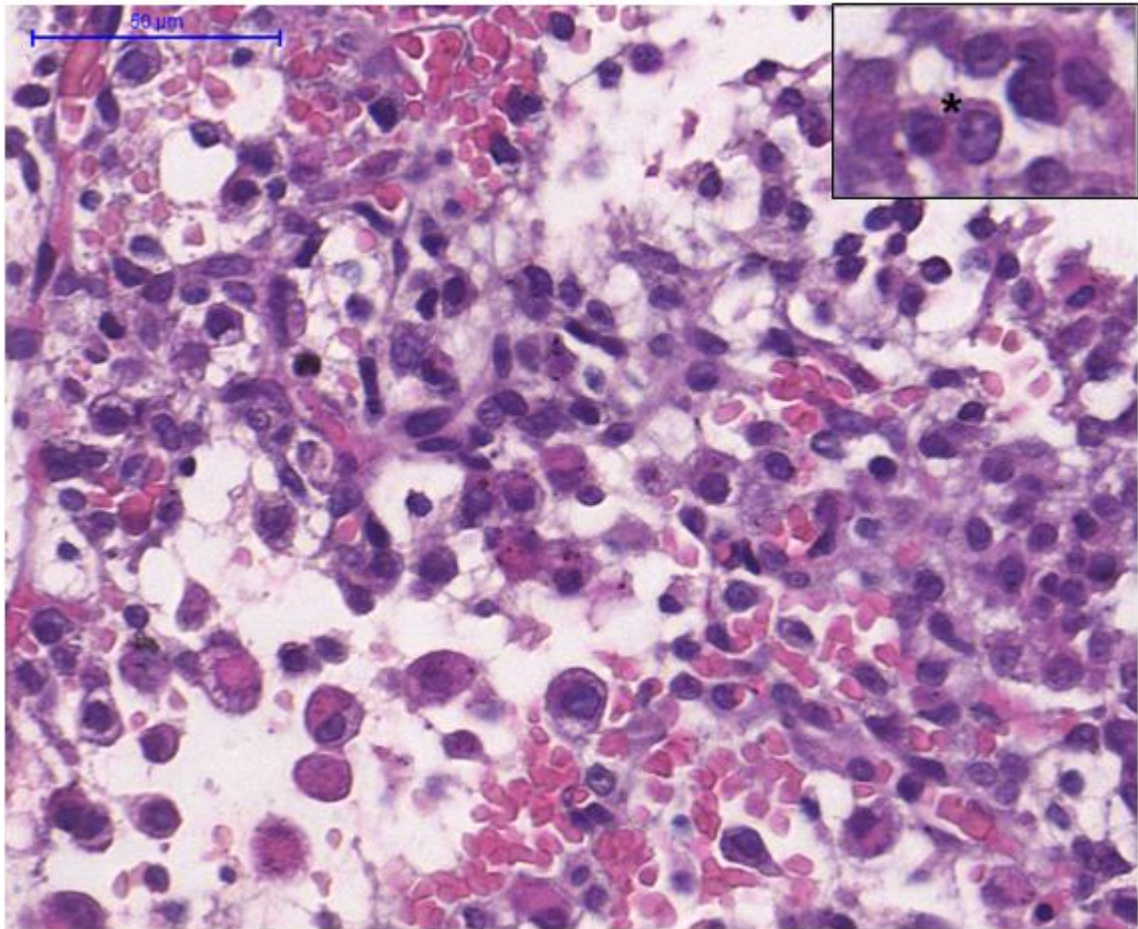
As células da granulosa são células somáticas que comunicam intimamente com o oócito desde quando o folículo se forma até a liberação do oócito na ovulação, atuando como parte importante no desenvolvimento do folículo e no processo de foliculogênese (DZAFIC;

STIMPFEL; VIRANT-KLUN, 2013). A função das células da granulosa na regulação da foliculogênese em humanos inicia já na vida intrauterina com começo da produção de ácido retinóico (RA) pelas células pré-granulosa, estimulando grupos de oogônias a iniciar a meiose, transformando-se em oócitos. Em seguida, os oócitos são envoltos por um epitélio simples de células pré-granulosa escamosas, desenvolvendo os folículos primordiais (BAUMGARTEN; STOCCO, 2018).

As células da granulosa forma uma monocamada ao redor da oogônia no folículo primordial e posteriormente irá estabelecer ás inúmeras camadas do *cumulus oophorus* que envolve o oócito no folículo pré-ovulatório. No decorrer do desenvolvimento folicular, tanto o oócito quanto as células da granulosa passam por modificações funcionais e morfológicas significativas (DUMESIC *et al.*, 2015).

As células da granulosa são caracterizadas como células grandes e globosas, de citoplasma amplo e eosinofílico, por vezes de aspecto granular, o núcleo é globoso, amplo e basofílico, com alguns nucléolos evidentes (Figura 6). As células da granulosa podem ser encontradas aderidas umas as outras, agrupadas em tamanhos variáveis, denominado *clusters*, ou isoladas e cercada de hemácias. (ALMEIDA *et al.*, 2018a).

Figura 6 - Fotomicrografia de *cell block* demonstrando células da granulosa humana luteinizada, coradas pela Hematoxilina e Eosina (HE).



Legenda: Grupo de células da granulosa que apresentam citoplasma amplo e eosinofílico, por vezes de aspecto granular, com o núcleo globoso, amplo e basofílico, aumento 20X. No *insert*, observa-se células da granulosa com nucléolos evidentes (asterisco). Fonte: Laboratório do Comportamento Celular – ICB/UFMG.

As células da granulosa demonstram distintos graus de diferenciação conforme sua localização folicular e estágio de crescimento do folículo ovariano (VIREQUE, 2013). A morfologia dessas células difere muito em algumas regiões, existem populações incluindo células menos diferenciadas e populações altamente diferenciadas (KOSSOWSKA-TOMASZCZUK; GEYTER, 2012).

Em todos os estágios de diferenciação, as células da granulosa são constituintes críticos para a nutrição e maturação do gameta feminino, formando um ambiente metabólico e hormonal fundamental para coordenar a receptividade uterina com a liberação dos oócitos maduros e suportar os primeiros estágios da gravidez (BAUMGARTEN; STOCCO, 2018).

Cultura de células da granulosa tem sido utilizada frequentemente para estudar a diferenciação *in vitro* de células ovarianas e assim utilizadas em tecnologia de reprodução assistida (TRA) para apoiar a maturação *in vitro* em cultura de oócitos e embriões (VIREQUE, 2013). Dentre as células foliculares, as células da granulosa exibem o maior potencial de células-tronco (DZAFIC; STIMPFEL; VIRANT-KLUN, 2013).

As células-tronco são definidas pela capacidade de se auto-renovar continuamente e ter grande potencial de se diferenciar para produzir alguns ou todos os principais tipos de células especializadas do mesmo tecido ou órgão. Essas células têm a finalidade de formar tecidos e órgãos durante o desenvolvimento dos mamíferos e mantém a renovação celular proporcionando a capacidade regenerativa em alguns tecidos adultos (SIMONS; CLEVERS, 2011). Existe dois tipos fisiológico dessas células, que estão presentes em diferentes estágios da vida, as células-tronco embrionárias (hESCs) e as células-tronco adultas (ASCs) (ALVAREZ *et al.*, 2012).

As células-tronco embrionárias (hESCs) compõem a massa celular interna do blastocisto antes da implantação. No decorrer do processo de embriogênese, as células estabelecem agregações chamadas de camadas germinativas: endoderme, mesoderme e ectoderme, cada um provavelmente dando origem a células e tecidos diferenciados do feto e em seguida, do organismo adulto. Após as hESCs diferenciarem em uma das camadas germinativas, elas tornam-se células-tronco multipotentes, da qual a potencia é limitada apenas às células da camada germinativa (ALVAREZ *et al.*, 2012).

As células-tronco adultas (ASCs) são provenientes das hESCs existente em todo o corpo, tem capacidade de se dividir e gerar tanto uma nova célula idêntica e com o mesmo potencial, como outra diferenciada, são denominadas multipotentes por serem menos versáteis que as células-tronco embrionárias (ZAKRZEWSKI *et al.*, 2019).

Estudos demostram que existem um pool de células-tronco em ovários maduros de camundongos e humanos, que dão origem a oogênese e a foliculogênese. É através dessas células-tronco que o folículo primário pode ser produzido no decorrer do período reprodutivo (KRANC *et al.*, 2019). Anteriormente acreditava-se que o número de folículos primários é determinado e definido antes do nascimento, porém nos últimos anos, comprovou que todo tecido ou órgão, incluindo o ovário, inclui uma população de células-tronco com competência

para se diferenciar (PARTE *et al.*, 2011).

Experimentalmente, as células da granulosa indicam ter propriedades semelhantes a células-tronco, as subpopulações de células-tronco luteinizada expressam fatores de transcrição como OCT-4, NANOG e SOX-2 (marcadores de células-tronco embrionárias), entretanto a expressão demonstrou variações de acordo com o estágio de maturação das células da granulosa isoladas (KOSSOWSKA-TOMASZCZUK; GEYTER, 2012).

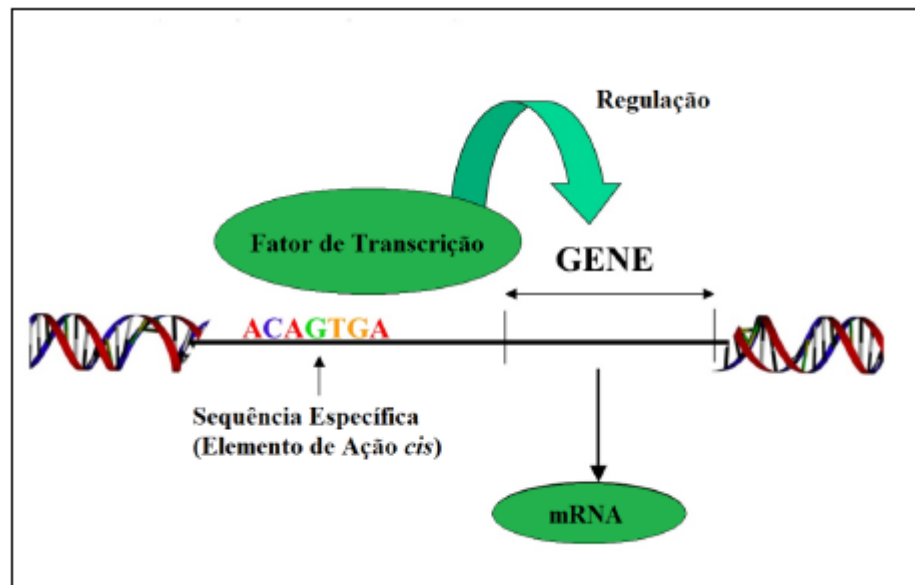
Esses fatores de transcrição são importantes, uma vez que condiciona o fenótipo de células-tronco embrionárias pluripotentes (RODDA *et al.*, 2005) e são bastante expressos nesse estado, sendo que a inibição ou remoção de qualquer um desses genes sucede na diferenciação dessas células-tronco embrionárias. Contudo, os fatores de transcrição têm uma importante função na manutenção da pluripotencialidade de células-tronco (CHAMBERS; TOMLINSON, 2009).

2.4 REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

A regulação da expressão gênica é um processo indispensável para todas as células. É por meio desse mecanismo que a célula consegue responder devidamente aos estímulos internos e externos, gerando uma resposta apropriada e diferenciada para cada situação, a partir de um mesmo material genético. Vários mecanismos permitem essa modulação da resposta celular, porém o controle da transcrição aparenta ser o mais relevante para a maioria das células, visto que modera diretamente a síntese de moléculas de RNA, intermediárias entre o DNA e as proteínas (ALBERTS *et al.*, 2010).

O controle da transcrição de RNA mensageiro na célula implica três elementos principais: o promotor; região responsável por possibilitar a ancoragem da RNA Polimerase II e o começo da transcrição do DNA, fatores de transcrição; proteínas que se ligam a RNA Polimerase II e podem tanto estimular níveis mais eficientes de transcrição quanto reprimi-la, regiões reguladoras; regiões do DNA que atraem e ligam fatores de transcrição, que vai induzir seu contato com o complexo RNA polimerase II (ALBERTS *et al.*, 2010). Os fatores de transcrição são proteínas capazes de se ligar a certas sequências de DNA e promover a estimulação ou o bloqueio do recrutamento da enzima RNA Polimerase II para o gene alvo e consequentemente permitir ou inibir a transcrição gênica (Figura 7) (GRIFFITHS, 2000).

Figura 7 - Ação dos fatores de transcrição.



Legenda: O fator de transcrição, uma proteína com sítio de ligação do DNA, reconhece e liga uma sequência específica no promotor do gene. Essa ligação regula (ativando ou silenciando) a transcrição do mesmo
 Fonte: D'ALMEIDA, 2014.

Normalmente, essas proteínas apresentam dois domínios distintos, um deles tem a função de determinar a ligação do fator de transcrição a uma determinada região do DNA, o outro vai modular a taxa de transcrição. Esse último domínio exerce interação com o complexo de transcrição, formado pela RNA Polimerase II, o que pode suceder no aumento da velocidade de formação, ou no aumento da sua eficiência de transcrição do gene alvo (ALBERTS *et al.*, 2010).

Os fatores de transcrição também podem impedir a transcrição de certos genes, através do bloqueio físico de ligação de outros ativadores na região gênica alvo, ou na formação de um complexo inibidor de ativação de RNA Polimerase II (GRIFFITHS, 2000).

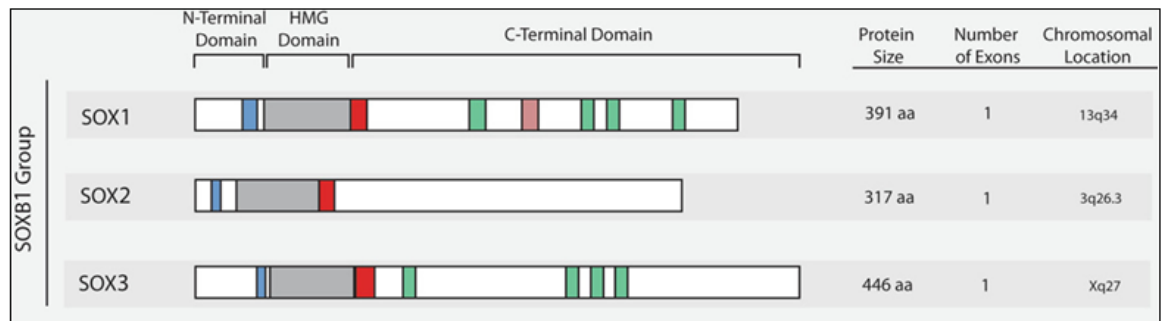
2.5 FATOR DE TRANSCRIÇÃO SOX2

A família SOX é um grupo de fatores de transcrição que determinam uma importância na biologia do desenvolvimento e das células-tronco. Foi descoberto o fator determinante do testículo de mamíferos e o gene foi denominado SRY correspondente na região determinante do sexo no cromossomo Y. SRY tem um domínio distinto de grupo de alta mobilidade (HMG), que possibilita o reconhecimento e ligação precisa do DNA (GUBBAY *et al.*, 1990 ; SINCLAIR *et al.*, 1990).

As funções relacionadas a essa proteína vão desde a regulação do desenvolvimento embrionário e manutenção das células-tronco até a homeostase em tecidos adultos (KAMACHI; KONDOH, 2013). A partir das semelhanças no domínio HMG, os genes SOX são divididos em subgrupos de A a H e os membros dos mesmos subgrupos partilham propriedades bioquímicas parecidas e possui funções sobrepostas e redundantes (JUURI *et al.*, 2013).

O gene SOX2, um dos membros da família SOX, foi descoberto e caracterizado em humanos, está localizado no cromossomo 3 (3q26.33), pertencente ao grupo SOXB1 e codifica uma proteína que consiste em 317 aminoácidos, constituído por três domínios principais: N-terminal, HMG e domínio de transativação (Figura 8) (LIU *et al.*, 2013.). A parte central é o domínio HMG que é altamente conservado entre as espécies e a função do domínio de transativação C-terminal é reconhecer e ligar os promotores dos genes alvos e levar a ativação ou repressão do gene (CASTILLO; SANCHEZ-CESPEDES, 2012).

Figura 8 - Estrutura do SOX2



Legenda: Homologia SOX2, estrutura da proteína. SOX2 pertence ao grupo SOXB1 das proteínas SOX. Possui grande homologia entre o grupo SOXB1 e todos possuem três domínios principais: N-terminal, HMG e domínio C-terminal. Fonte: WEINA; UTIKAL, 2014

A princípio, a proteína SOX2 foi conhecida por regular a auto-renovação das células-tronco embrionárias humanas (hESCs), além disso, é importante para a manutenção de células-tronco em vários tecidos adultos, incluindo o cérebro e traqueia, sendo um dos principais fatores de transcrição para o estabelecimento de células-tronco pluripotentes induzidas (LIU *et al.*, 2013). SOX2 junto com OCT-4 e NANOG condiciona a célula em estado de célula-tronco (SARKAR; HOCHEDLINGER, 2013).

As células da granulosa humana são sugestivas como células-tronco, visto que

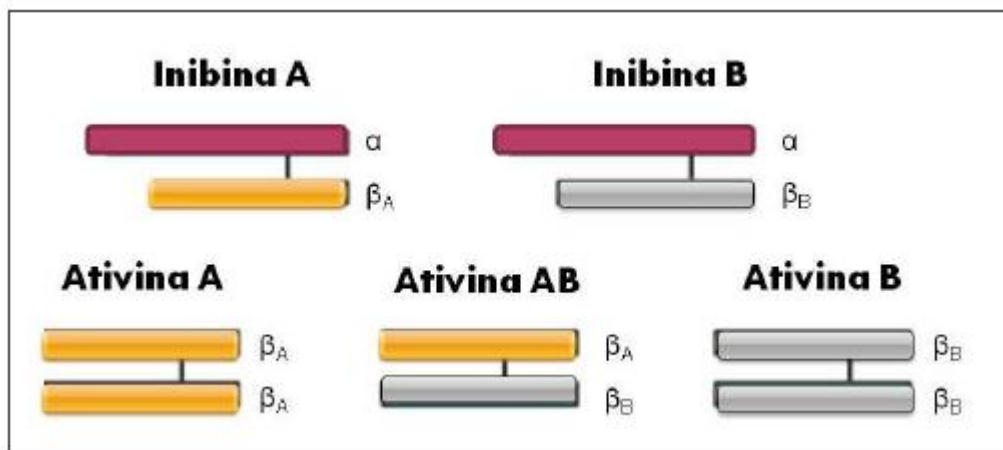
expressam marcadores de indiferenciação e demonstraram serem capaz de se diferenciarem em diferentes tipos de células que não estão presentes nos folículos ovarianos (KOSSOWSKA-TOMASZCZUK *et al.*, 2009). Um estudo, realizado com células da granulosa isoladas de suínos, demonstraram a expressão de marcadores específicos de células-tronco pluripotentes como NANOG, SOX2 tanto em células da granulosa em crescimento como células da granulosa luteinizada (MATTIOLI *et al.*, 2012). Outro estudo avaliou a expressão de SOX2 em células da granulosa a fresco provenientes de folículos ovarianos bovinos (HONG *et al.*, 2019).

2.6 INIBINA

As inibinas são glicoproteínas formados pela combinação de uma subunidade α (comum em ambas) e uma subunidade β . Existem dois tipos de inibina, de acordo com o tipo da subunidade β , (β_A ou β_B) sendo a inibina A (formada pelas subunidades α e β_A) e inibina B (formada pela subunidade α e β_B). As inibinas atuam como antagonistas das ativinas (glicoproteína da superfamília TGF- β), com quem partilham grande homologia estrutural, já que a subunidade proteica beta das inibinas é a mesma que se combina em homodímero para originar as ativinas (PANGAS; WOODRUFF, 2000).

As ativinas são denominadas de acordo com o tipo de subunidade β : ativina A (formada pelas subunidades β_A e β_A), ativina B (formada pelas subunidades β_B e β_B) e ativina AB (formada pelas subunidades β_A e β_B) (TSUCHIDA *et al.*, 2009) (Figura 9).

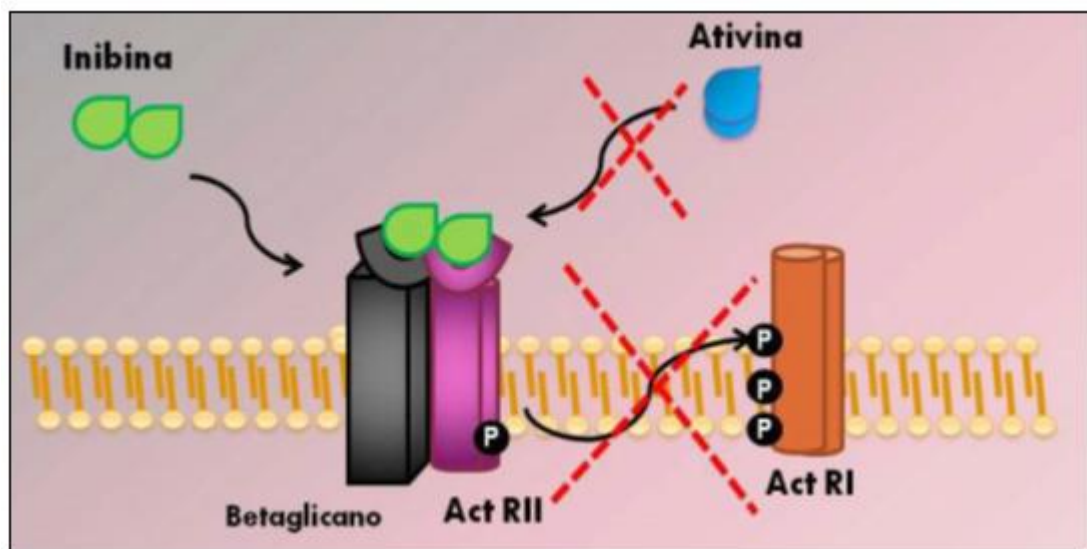
Figura 10 - Estrutura das inibinas



Legenda: Estrutura das inibinas e ativinas, de acordo com a ligação de subunidades α e β .
Fonte: VILLAMIL, 2010.

A inibina desempenha sua ação celular a partir da ligação ao receptor serina-treonina-quinase tipo II (ActRII), mas com afinidade consideravelmente mais reduzida que a da ativina. Quando se liga no ActRII, a inibina antagoniza a ação da ativina, por não deixar que este recrute ActRI. Para que a inibina possa deslocar a ativina do seu receptor é preciso um correceptor ancorado à membrana celular, o betaglicano (também chamado de receptor TGF- β tipo III ou TGF- β III), que se liga especificamente á subunidade α da inibina e proporciona sua ligação ao ActRII, desta forma impossibilitando o acesso da ativina ao ActRII (GRAY; BILEZIKJIAN; VALE, 2001) (Figura 10).

Figura 11 – Ação da inibina e ativina



Legenda: Mecanismo de ação celular da inibina: ligação em ActRII e bloqueio à ligação da ativina
Fonte: VILLAMIL, 2010.

A inibina foi descrita como um supressor da secreção hipofisária do hormônio folículo-estimulante (FSH). A molécula da inibina foi purificada e permitiu ao isolamento de frações capazes de estimular a produção de FSH por células da hipófise, permitindo a identificação da ativina como um homodímero de subunidades β da inibina. Posteriormente, definiram-se o receptor de ativina e isolou-se a folistatina, que confirmou ser um neutralizador da ativina, por meio da ligação de alta afinidade com a mesma (BUSTER, 2003). A inibina, ativina e folistatina são três fatores expressos nas células da granulosa e da teca dos folículos antrais e tem como função uma ação reguladora local e a distância (SANTOS, 2009).

Em mulheres saudáveis, o ovário é responsável pela circulação da inibina A e da inibina B, que são secretadas pelas células da granulosa dos folículos em crescimento no corpo lúteo

em resposta as gonadotrofinas e alguns outros fatores. Estudo demonstrou em humanos comprovou que tanto o FSH quanto o LH estimulam a secreção de inibina A e B nas células da granulosa luteinizada. (WELT *et al.*, 2001).

A concentração plasmática de inibina A mantém baixa durante a fase folicular inicial e posteriormente mostra um pequeno pico de fase médio-folicular, aumentando rapidamente com a ovulação. A inibina B demonstra concentração plasmática alta na fase folicular inicial e uma queda na fase folicular tardia durante os dias antes da ovulação (TSIGKOU *et al.*, 2008). Portanto os folículos antrais têm a capacidade de secretar inibina B, em contrapartida os folículos pré-ovulatórios são capazes de secretar inibina A (WELT *et al.*, 2001).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão gênica e proteica de SOX2 e alfa-inibina em células granulosa humana luteinizada de pacientes submetidas à Estimulação Ovariana Controlada (EOC) e sua correlação com os parâmetros clínicos das pacientes.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a expressão e imunolocalização das proteínas SOX2 e alfa-inibina, em células da granulosa humana, por imunocitoquímica;
- Investigar a expressão gênica de SOX2 e alfa-inibina por PCR quantitativo em tempo real, em células da granulosa humana;
- Correlacionar à expressão gênica e proteica de SOX2 e alfa-inibina em células da granulosa humana com os seguintes parâmetros clínicos das pacientes:
 - Idade;
 - Número de folículos antrais à ultrassonografia;
 - Dose de gonadotrofina;
 - Duração do ciclo
 - Quantidade de oócitos coletados;
 - Número de oócitos maduros obtidos;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi realizado de acordo com os princípios éticos após aprovação pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob o Número do CAAE: 64379416.1.0000.5149, Número do Parecer 1979648 (Anexo B).

4.2 O EXPERIMENTO

Foi realizado um estudo prospectivo, comparativo, envolvendo a coleta de líquido folicular e de células da granulosa humanas no período de Março a Setembro de 2018, de 32 pacientes admitidas para a realização de congelamento de oócitos, fertilização *in vitro* (FIV) e injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) em uma clínica particular de Belo Horizonte- MG. Todas as pacientes envolvidas no estudo assinaram o Termo De Consentimento Livre e Esclarecido antes da inclusão no estudo (Anexo C).

4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram incluídas no estudo as pacientes admitidas para o tratamento de infertilidade em uma clínica particular de Belo Horizonte- MG, submetidas ao protocolo de estimulação ovariana controlada, e que concordaram em participar do estudo e que, portanto, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Os critérios de exclusão foram à desistência e revogação do consentimento da paciente em participar em quaisquer etapas do estudo e pacientes positivas para doenças infectocontagiosas.

4.4 ESTIMULAÇÃO OVARIANA CONTROLADA, ASPIRAÇÃO DE FOLÍCULOS E FERTILIZAÇÃO *IN VITRO*

As pacientes incluídas nesse estudo passaram por estimulação ovariana controlada (EOC), de acordo com o Protocolo estabelecido para cada paciente definido pela clínica privada de Reprodução Humana.

Para esse procedimento é realizado o ultrassom basal no 1º ou 2º dia da menstruação com intuito de comprovar a ausência de cistos ovarianos. Posteriormente, administra-se gonadotrofina (hMG ou FSH) a partir do 2º/3º dia da menstruação, com dose inicial padrão de 225 UI/dia. É utilizado Fostimon (FSH urinário), Elonva100 ou 150 (FSH recombinante), Puregon (FSH recombinante) e Menopur hMG) (conforte análise clínica de cada paciente).

A critério clínico, opta-se pela associação do Letrozol, na dosagem de 2,5 a 5 mg ao dia, por 5 dias, iniciado entre o primeiro e o terceiro dia do ciclo. O primeiro ultrassom é realizado no 5º/6º dia da estimulação e quando confirmada a presença de pelo menos 1 folículo maior que 13mm de diâmetro médio, inicia-se a dessensibilização hipofisária com a administração do antagonista (Orgalutran) entre o quinto e o sétimo dia de estimulação ovariana, até 24 horas antes da administração do hCG / GnRHa. Os demais exames de ultrassom são realizados a cada 48-72 horas. A gonadotrofina coriônica (hCG) é administrada na presença de pelo menos dois folículos maiores que 17 mm e 4 folículos entre 14 e 17 mm.

A aspiração dos folículos é então realizada utilizando uma agulha de aspiração folicular de calibre 17 conectada a uma sonda de ultrassom transvaginal com uma pressão negativa de 100 mm Hg aproximadamente 36 horas após a injeção do hCG. O líquido folicular é coletado em tubos de ensaio estéreis, e os oócitos imediatamente identificados com o auxílio de uma lupa em capela de fluxo laminar para manter o ambiente estéril. O número de oócitos coletados é registrado, o sêmem é preparado utilizando a técnica swim-up e a inseminação dos oócitos coletados é realizada por fertilização *in vitro* simples (FIV) ou injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) conforme indicação médica.

A fertilização do oócito é avaliada em um período de 18-20 horas após a inseminação confirmada pela presença e da localização de dois pró-núcleos. Até quatro embriões são selecionados para a transferência e os restantes são deixados em cultivo até o estágio de blastocisto e subsequentemente criopreservados. Os embriões obtidos são então transferidos entre o segundo e quinto dia após a fertilização, segundo protocolo da clínica e assim administrado progesterona por via vaginal na dose de 600 mg/dia para suporte de fase lútea desde o dia da transferência de embriões até a confirmação da gravidez, com β -hCG sérico acima de 25 mUI/ml, duas semanas após a transferência.

4.5 PARÂMETROS CLÍNICOS

Os dados clínicos foram inseridos em uma planilha eletrônica e analisados de forma anônima, garantindo a identidade das pacientes, que foram identificadas na planilha apenas pelo número. Foi realizada a correlação da expressão gênica e proteica de SOX2 e alfa-inibina com as informações clínicas das pacientes:

- Idade (anos)
- Contagem dos folículos antrais
- Dose de gonadotrofina utilizada na HOC (IU)
- Duração do protocolo de HOC (dias)
- Número de oócitos coletados;
- Número de oócitos maduros (MII) coletados
- Proporção de oócitos maduros (%)
- Proporção de folículos preenchidos (%)
- Proporção de folículos preenchidos por oócitos maduros (%)

4.6 SEPARAÇÃO DO LÍQUIDO FOLICULAR E CÉLULAS DA GRANULOSA

A separação do líquido folicular (LF) e o isolamento das células da granulosa (CG) foram executados de acordo com protocolo padronizado pelo Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP (CAMPOS *et.al.*, 2012b).

Depois da identificação dos oócitos pela equipe de embriologia da clínica privada, o restante do LF que seria descartado foi coletado em tubos falcon de 50 ml. Duas alíquotas de 1 mL do LF foram separadas em tubos eppendorf e o material foi transportado em gelo para o Laboratório do Comportamento Celular (LCC), no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

No laboratório, a separação das CG foi realizada vertendo um volume pequeno do LF com sangue para uma placa de petri de 100 mm. Os *clusters* de CG foram coletados por uma pipeta automática de 1000 uL e transferidos para outra placa de 100 mm contendo de 2-5 ml de salina tamponada com fosfato (PBS) a 4°C, para se retirar o excesso de hemácias. O

procedimento descrito acima foi repetido sucessivamente até ser vertida a última porção de LF dos Falcons de transporte. Os *clusters* foram transferidos para tubos Falcon de 15 mL contendo 2 mL de PBS a 4°C. Os tubos Falcon foram centrifugados a 2000 rpm por 15 minutos a 4°C. Depois da centrifugação, os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* de CG e hemácias foram ressuspensos em 1 mL de meio de cultura DMEM (Gibco, Grand Island, USA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco, Grand Island, USA). As suspensões de CG e hemácias foram transferidas para colunas de Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) montadas em tubo Falcon de 15mL contendo 1 mL de Histopaque e 1 mL de DMEM mantidas a 4°C, formando duas fases na proporção de 2 mL da suspensão de células em DMEM e 1 mL de Histopaque.

As colunas foram centrifugadas a 2000 rpm por 20 minutos a 4°C e em seguida as CG foram coletadas na interface das duas fases das colunas de Histopaque e transferidas para tubos Falcon de 15 mL contendo 2 mL de PBS a 4°C. Os Falcons foram centrifugados a 2000 rpm por 15 minutos a 4°C, os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* de CG ressuspensos em 3 mL de PBS a 4°C.

As suspensões de CG foram divididas em 2 eppendorfs contendo 1,5 mL cada, centrifugados a 3000 rpm por 1 minuto e tiveram os sobrenadantes descartados. Em um dos pellets foi adicionado 500 µL de TRI reagente (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) congelado até o isolamento do RNA e outro *pellet* foi usado para execução do *cellblock*.

4.7 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO - CELLBLOCK DAS CÉLULAS DA GRANULOSA

O *cellblock* das células da granulosa foi realizado no Laboratório do Comportamento Celular (LCC-ICB-UFMG), conforme descrito anteriormente (ALMEIDA *et al.*, 2021b).

Após a separação, os pellets de células da granulosa passaram por fixação e desidratação para serem emblocados em parafina. Os pellets foram fixados em 200 µL de álcool 80° por 1 min; depois acrescentou 800 µL de formaldeído tamponado por 24 horas. Após a fixação, os pellets foram cuidadosamente coletados com agulha e depositados em papel filtro, foram corados com duas gotas de eosina para facilitar a visualização das células, a seguir o papel filtro foi dobrado e depositado em cassetes e devidamente identificado. Os

cassetes foram mantidos em etanol 70° até o processamento histológico pela técnica rotineira de inclusão em parafina, do qual foram obtidos cortes histológicos de 4µm de espessura. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (HE) e com a técnica de imuno-citoquímica (ICQ) para análise em microscopia óptica (PROPHET *et al.*, 1992).

4.8 IMUNO-CITOQUÍMICA PARA SOX2 E ALFA-INIBINA

A técnica de coloração imunocitoquímica para SOX2 foi padronizada no Laboratório do Comportamento Celular (LCC-ICB-UFMG), e para alfa-inibina foi realizada conforme descrito anteriormente (ALMEIDA *et al.*, 2021b).

Realizada pela técnica de reação em peroxidase com identificação a partir de anticorpo secundário polimerizado Avidina-biotina-peroxidase para identificação (ABC Kit – Vector Laboratories, San Francisco, CA, USA) e (Novolink Polymer Detection System; Leica Biosystems, Newcastle upon Tyne, UK). A recuperação antigênica ocorreu em calor úmido pressurizado a 137°C (Autoclave ALT 5LD plus; ALT, São Paulo, Brasil) com Target Retrieval Solution Citrate - pH 6,0 (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) e calor úmido (banho-maria a 98°C). A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com Peroxidase Blockade Solution (Novolink Polymer Detection System; Leica Biosystems, Newcastle upon Tyne, UK) e com solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 10% em álcool metílico por 15 minutos. Para bloqueio das proteínas endógenas, a incubação foi de 15 minutos em Protein Block Solution (Novolink Polymer Detection System; Leica Biosystems, Newcastle upon Tyne, UK).

Os reagentes foram aplicados manualmente, sendo o tempo de incubação do anticorpo primário de 16 horas e a imunorreatividade foi visualizada incubando as lâminas com o cromógeno diaminobenzidina (Liquid DAB + Substrate Chromogen system; Dako North America, Via Real Carpinteria, CA, USA) por 3 minutos. Após a incubação no DAB os cortes foram contracorados com Hematoxilina (HE).

Para controles positivos foram utilizados tecidos que sabidamente expressam a proteína em questão, usados cortes histológicos de cérebro humano (SOX2) e fragmentos de testículo humano (alfa-inibina) Para controle negativo a etapa de incubação do anticorpo primário foi omitida e substituída pela incubação apenas com o diluente do anticorpo (Antibody Diluent

with Background Reducing Components; Dako North America; Via Real Carpinteria, CA, USA). Na tabela 1 estão identificados dados dos anticorpos utilizados.

Tabela 1 - Informações dos anticorpos utilizados.

| | Fabricante | Clone | Diluição | Tempo de incubação | Bloqueio peroxidase | Bloqueio proteína | Anticorpo secundário |
|---------------------|------------|------------|----------|--------------------|---------------------|-------------------|----------------------|
| SOX2 | RDSystems | Policlonal | 1:50 | 16h | DAKO | DAKO | KITABC |
| Alfa Inibina | Abcam | Monoclonal | 1:100 | 16h | Novolink | Novolink | Novolink |

4.9 AVALIAÇÃO IMUNO-CITOQUÍMICA

Foi avaliada a expressão proteica através da marcação imunocitoquímica seguindo o padrão de coloração celular nuclear (SOX2) (ZHANG *et al.*, 2012) e citoplasmático (alfa-inibina). As células foram contadas manualmente, por um único observador, através do software de imagem J (SciJava).

Para realizar a análise de imunoexpressão, foram contadas até 500 células por paciente, seguindo um score que categorizava as células de acordo com a marcação: ausente, fraco/moderado e forte, determinando em cada paciente o percentual de células com ausência de marcação, marcação fraco/moderado e marcação forte. Por fim, foi considerado o somatório dos percentuais de células com score fraco/moderado e forte e calculado a média de marcação de todas as pacientes.

A morfologia das células da granulosa foi comprovada pela identificação das análises anteriores de HE (ALMEIDA *et al.*, 2021b). Foram excluídas da contagem células muito pequenas, sem padrão celular definido, células inflamatórias e hemácias. Todas as análises foram realizadas por microscopia de luz com aumento de 400X. As imagens foram capturadas usando uma câmera Olympus BX_40 (Olympus Company, Shinjuku, Tóquio, Japão) e software de imagem Spot Basic para microscopia (Spot Imaging, Diagnostic Instruments, Inc).

4.10 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E TRANSCRIÇÃO REVERSA

Foi avaliada a expressão dos genes-alvo (alfa-inibina, SOX2 e S26) por meio da PCR em tempo real após a extração de RNA total das células da granulosa.

Para extração do RNA total o pellet das CGs foi ressuspensão em 500 μ L de TRI Reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis USA) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA). Após o protocolo o RNA total foi ressuspensão em 20 μ L de água *diethylpyrocarbonate* (H₂O DEPC), livre de ribonuclease (RNase) e desoxirribonuclease (DNase) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) para biologia molecular e quantificado no *NanoDrop Lite* (*Thermo Fisher Scientific*, Wilmington, Delaware, USA). Posteriormente, alíquotas contendo 1000 ng de RNA total foram tratadas com DNase I *Amplification grade* (*Invitrogen Life Technologies*, Carlsbad, CA, USA), com a finalidade de descartar uma provável contaminação por DNA genômico. Após o tratamento com DNase as amostras de RNA foram requantificadas no *NanoDrop Lite*.

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada utilizando-se o kit SuperScript III *First-Strand Synthesis System for PCRq* (Invitrogen®), de acordo com o protocolo do fabricante, sem alterações.

4.11 PRIMERS ESPECÍFICOS

Os primers (oligonucleotídeos) designados para a transcrição reversa e PCR em tempo real dos genes (alfa-inibina, SOX2) foram padronizados pelo Laboratório do Comportamento Celular (LCC). Os primers usados para amplificação por PCR em tempo real para SOX2, alfa- inibina e S26 estão listados na tabela 2.

Como gene de referência para correção da expressão dos genes-alvo na PCR em tempo real, foi utilizado o gene que codifica a proteína ribossomal humana S26. Os primers específicos foram desenhados a partir de sequências obtidas no GenBank, usando o programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>), em seguida, as sequências foram projetadas e analisadas usando o programa do site Integrated DNA Technologies (<http://www.idtdna.com>).

Tabela 2 - Primers de oligonucleotídeos usados para PCRq.

| Primers | Sequência de nucleotídeos | Tamanho do fragmento | Nº Acesso GenBank |
|----------------|---------------------------------|----------------------|-------------------|
| HsS26 Forw | 5'-TGTGCTTCCCAAGCTGTATGTGAAG-3' | 75pb | NM_001029.3 |
| HsS26 Rev | 5'-CGATTCCTGACTACTTTGCTGTGAA-3' | | |
| HsAlfInib Forw | 5'-ACTGCCACAGAGTAGCACTGAACA-3' | 87pb | NM_002191.2 |
| HsAlfInib Rev | 5'-AGTGGAAGATGAAACTGGGAGGGGT-3' | | |
| HsSOX2 Forw | 5'-CCATCACCCACAGCAAAT-3' | 111pb | NM_003106.3 |
| HsSOX2 Rev | 5'-GAAGTCCAGGATCTCTCTCA-3' | | |

As amostras de cDNA provenientes da RT foram submetidas á PCR em tempo real executadas no equipamento de sistema de PCR em tempo real Applied Biosystems StepOne Plus™ (Laboratório Birbrair Lab - UFMG), usando o kit Sybr®Green Power Master Mix (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). As amostras foram inseridas em placas de 96 poços (ABI PRISM® 96-Well Optical Reaction Plate with Barcode, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), em duplicada, com volume final de 20 µL. Os parâmetros utilizados na reação foram: 52°C por 2 mim/ 95 °C por 10 mim/ 95 °C por 15 s/ 57 °C por 30 s/ 60 °C por 1 min/ 95 °C por 15 s.

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para expressão imunocitoquímica foi considerada a média de marcação de todas as pacientes, e o somatório dos percentuais de células com score fraco/moderado e forte nas células positivas.

Alguns dados clínicos foram expressos como percentuais:

- Percentual oócitos maduros (obtido pela proporção entre o nº de oócitos maduros e oócitos coletados).
- Percentual de folículos preenchidos (obtido pela proporção entre o nº de folículos coletados e nº de oócitos coletados).
- Percentual de folículos preenchidos por oócitos maduros (obtido pela proporção entre o nº de folículos coletados e nº de oócitos maduros coletados).

Para análise estatística da expressão proteica, a normalidade das variáveis, partindo dos dados sem outlier, foi verificada usando o teste de o teste Shapiro-Wilk para avaliar se apresentavam distribuição normal. Para verificar possíveis correlações entre os parâmetros foi realizado o teste de Pearson ou de Spearman.

O resultado da PCRq foi obtido como *cycle threshold* (Ct) e a expressão gênica foi avaliada pelo método comparativo de CT (CT médio para o gene alvo – CT médio do normalizador). Os resultados normalizados foram expressos como $1/\Delta\text{CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

A normalidade das variáveis dos dados foi verificada por meio do teste de D'Agostino-Pearson (CAVALLO, *et al.*, 2017). Foram consideradas como significativas os resultados cuja probabilidade de significância do teste foi de $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism v. 8.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DAS PACIENTES EM ESTUDO

Foram analisados os dados clínicos de 32 pacientes incluídas no estudo, os resultados apresentados como valor mínimo, valor máximo e a média, seguem listados na tabela 3.

Tabela 3 - Principais características clínicas das participantes do estudo (n=32).

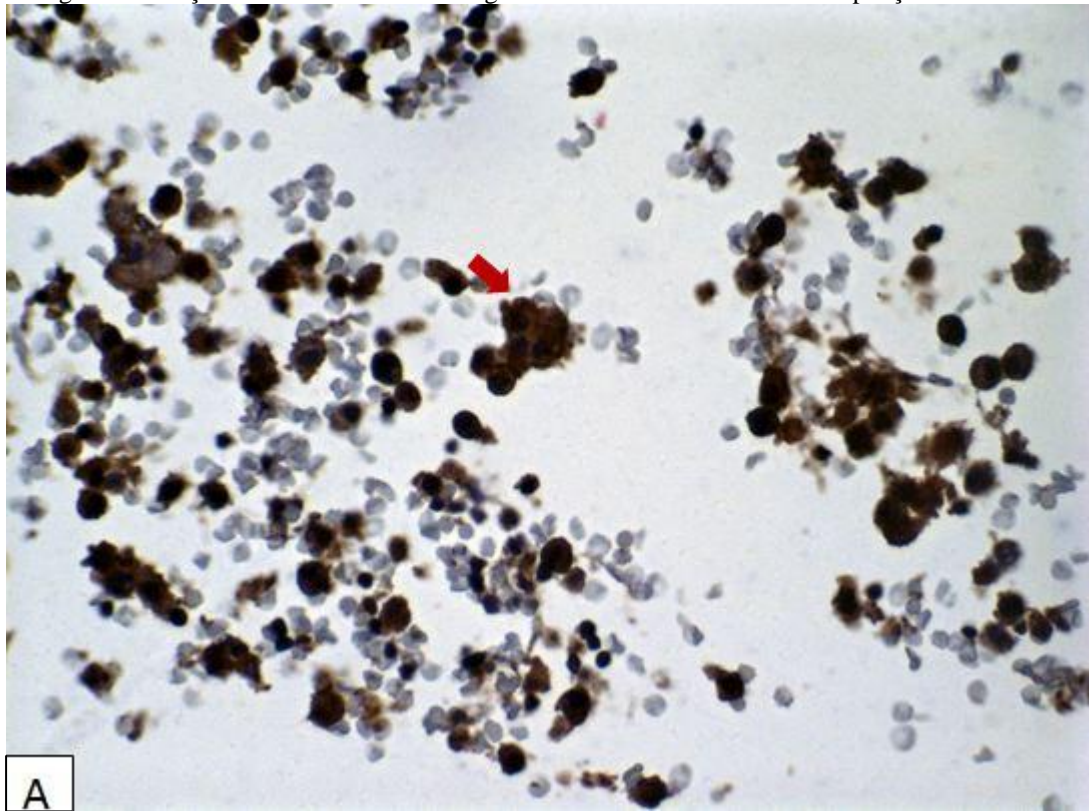
| | Mínimo | Máximo | Média | Desvio Padrão |
|-----------------------------|--------|--------|-------|---------------|
| Idade (anos) | 30 | 44 | 35,81 | 3,872 |
| Contagem Folículos Antrais | 1 | 47 | 20,06 | 11,47 |
| Dose Gonadotrofinas (IU) | 375 | 4125 | 2189 | 1122 |
| Duração do ciclo (dias) | 8 | 13 | 10,33 | 1,209 |
| Número de oócitos coletados | 1 | 47 | 17,47 | 10,84 |
| Número de oócitos maduros | 1 | 33 | 13,31 | 8,778 |

5.2 RESULTADOS IMUNO-CITOQUÍMICOS

Foi observada a imunomarcagem positiva das proteínas SOX2 e alfa-inibina em todas as amostras analisadas. A imunomarcagem positiva foi identificada pela coloração marrom escuro, apresentando diferentes padrões de marcações, podendo ser observadas células com marcação fraco/moderado e forte, além de variações no número de células marcadas entre as pacientes.

A marcação para SOX2 em células da granulosa luteinizada foi predominantemente nuclear, e por vezes observada também no citoplasma, apresentando células com marcações definidas como forte (Figura 11), fraco/moderado (Figura 12) e ausência de marcação, quando a célula não foi marcada pelo cromógeno DAB. Portanto, consideramos marcação positiva para SOX2 apenas células imunomarcadas no núcleo, que indica sua função como fator de transcrição.

Figura 12 - Seções de bloco de células da granulosa humana luteinizadas de punção ovariana.

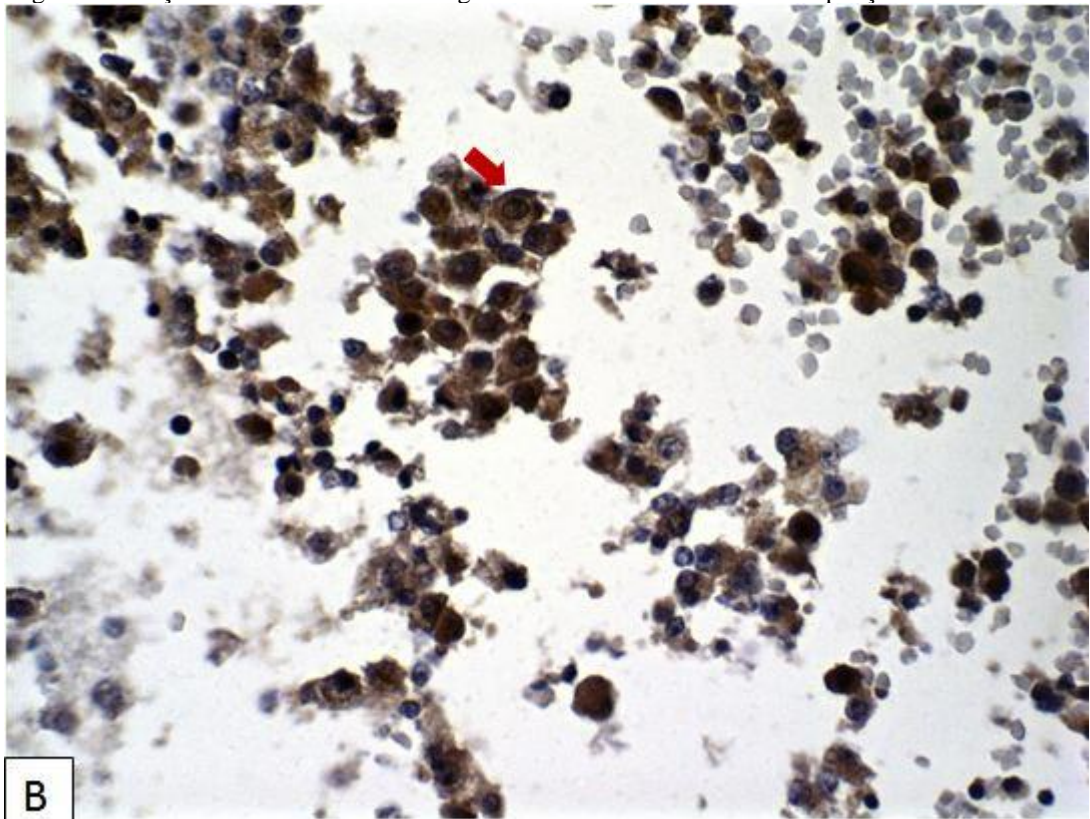


Legenda: Imunocoloração para SOX2 identificado pelo cromógeno DAB e contrastado com Hematoxilina.

A. Imunomarcção nuclear forte (seta vermelha) Aumento 60X.

B.

Figura 13 - Seções de bloco de células da granulosa humana luteinizadas de punção ovariana.



Legenda: Imunocoloração para SOX2 identificado pelo cromógeno DAB e contrastado com Hematoxilina

B. Imunomarcção nuclear fraco/moderado (seta vermelha). Aumento 60X.

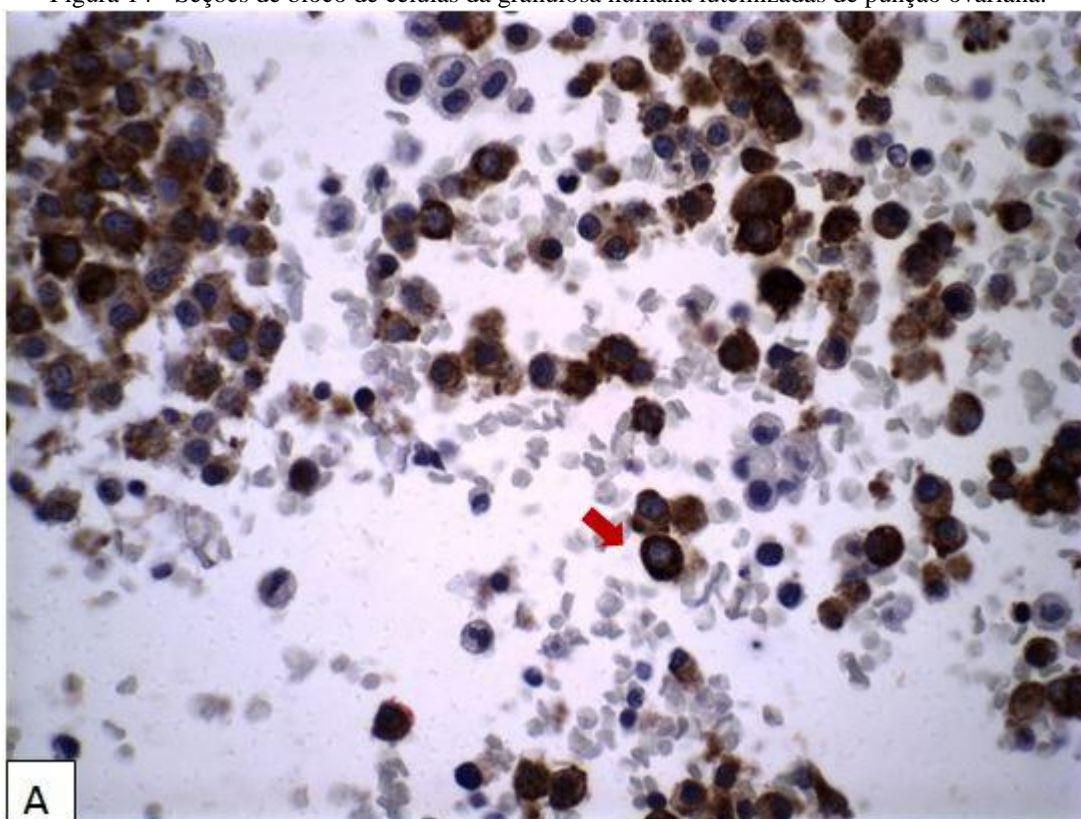
As células com marcação positiva demonstraram uma média de marcação de 94,81%, sendo predominantemente marcação forte (64,22%), seguida de marcação fraco/moderado (30,59%). As células com marcação negativa representaram 5,184 % (Tabela 4).

Tabela 4 - Porcentagem das células marcadas SOX2.

| | Mínimo | Máximo | Média | Desvio Padrão |
|----------------------------------|--------|--------|-------|---------------|
| SOX2 Marcação Negativa (%) | 0 | 49,2 | 5,184 | 8,993 |
| SOX2 Marcação Fraco/Moderado (%) | 2,817 | 50,8 | 30,59 | 10,64 |
| SOX2 Marcação Forte (%) | 0 | 96,48 | 64,22 | 16,78 |

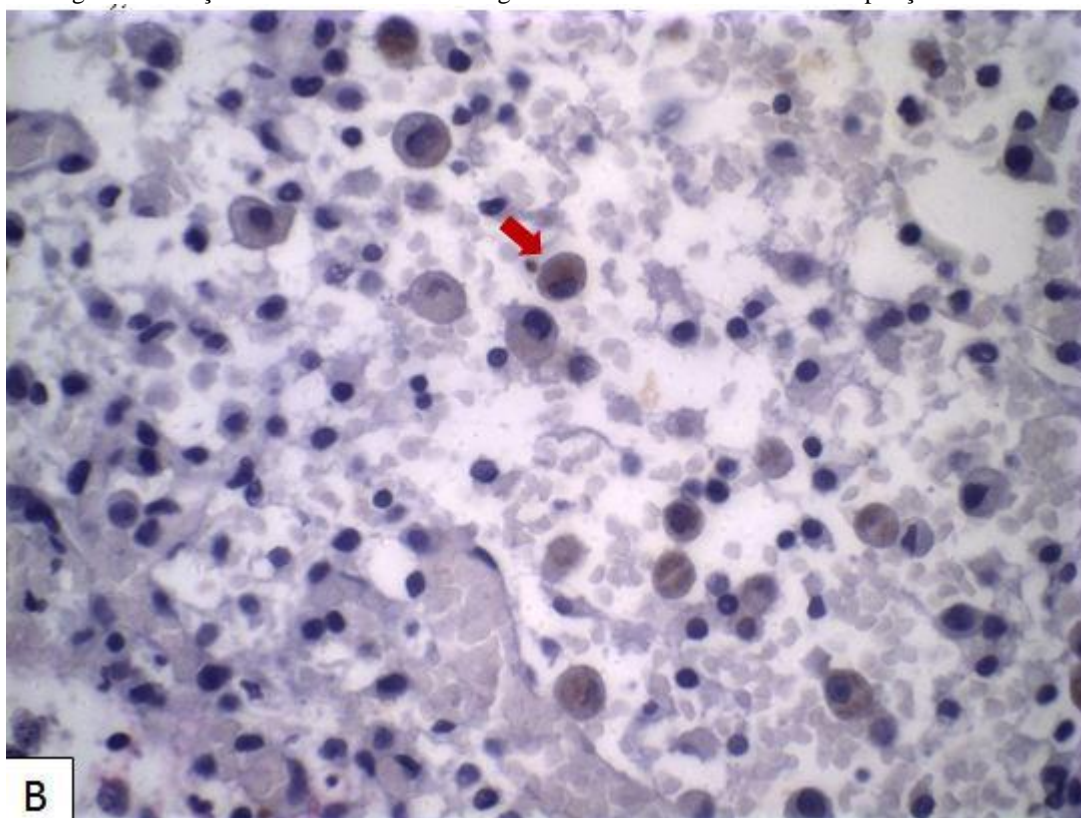
A marcação para alfa-inibina em células da granulosa luteinizada foi predominantemente citoplasmática. Apresentando células com marcações definidas como forte (Figura 13), marcação fraco/moderado (Figura 14) e, ausência de marcação, quando a célula não foi marcada pelo cromógeno DAB.

Figura 14 - Seções de bloco de células da granulosa humana luteinizadas de punção ovariana.



Legenda: Imunocoloração para alfa-inibina identificado pelo cromógeno DAB e contrastado com Hematoxilina.
A. Imunocoloração citoplasmática forte (seta vermelha) aumento 60X.

Figura 15 - Seções de bloco de células da granulosa humana luteinizadas de punção ovariana.



Legenda: imunocoloração para alfa inibina identificado pelo cromógeno DAB e contrastado com Hematoxilina
B. Imunocoloração citoplasmática fraco/moderado (seta vermelha), aumento 60X.

As marcações positivas apresentaram uma média de 66,56 % de todos os casos (40,68% apresentando coloração forte, 25,88% com coloração fraco/moderado) e 33,44% das células com marcação negativa) (Tabela 5).

Tabela 5 - Porcentagem das células marcadas alfa-inibina.

| | Mínimo | Máximo | Média | Desvio Padrão |
|--|--------|--------|-------|---------------|
| Alfa Inibina Marcação Negativa (%) | 0,6316 | 76,4 | 33,44 | 22,38 |
| Alfa Inibina Marcação Fraco/Moderado (%) | 3,432 | 44,4 | 25,88 | 10,53 |
| Alfa Inibina Marcação Forte (%) | 0,4 | 91,53 | 40,68 | 26,53 |

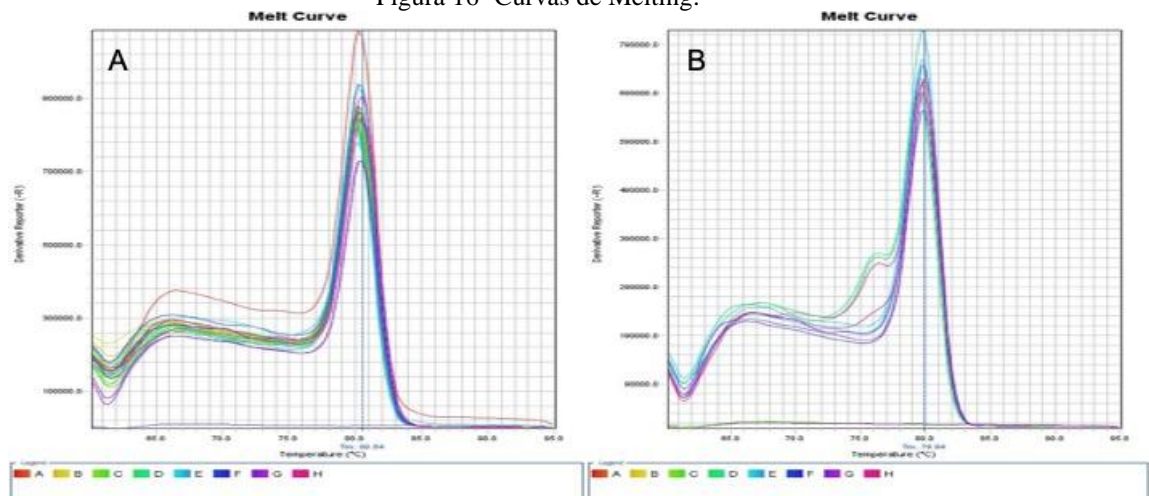
5.2.1 CORRELAÇÃO DOS PARÂMETROS CLÍNICOS COM A ICC

Os resultados da expressão imuno-citoquímica de SOX2 e alfa-inibina não apresentaram nenhuma correlação com os parâmetros clínicos das pacientes.

5.3 EXPRESSÃO DE mRNA DE SOX2 E ALFA-INIBINA

Foram analisadas 27 das 32 pacientes com amostras coletadas, pois 5 pacientes foram excluídas da análise da expressão gênica por não ter material suficiente para o Cellblock e extração de RNA. Todas as amostras demonstraram amplificação do gene de referência S26. As duplicatas das amostras foram concordantes e a curva de *Melting* apresentou pico único para cada gene-alvo, demonstrando a especificidade dos fragmentos amplificados (Figura 15).

Figura 16- Curvas de Melting.



Legenda: Curvas de Melting com picos únicos, comprovando a especificidade dos fragmentos dos genes alvos amplificados. (A) Alfa-inibina e (B) SOX2.

Foi observado a expressão do gene de referência (S26) e dos genes (SOX2 e alfa-inibina) nas amostras avaliadas e os valores da expressão relativa foram calculados com base no ΔCt ($1 / \Delta Ct$), após a normalização dos resultados pelo Ct do gene alvo – Ct do gene de referência. A expressão mRNA do gene SOX2 foi detectado em 20 pacientes, sendo que 07 delas não tiveram expressão detectada até o ciclo 45 (20/27), apresentando expressão em 26% das pacientes e uma média de Ct de 30,88. A expressão de mRNA do gene alfa-inibina foi detectado em todas as pacientes (27/27), demonstrando uma média de Ct de 25,91.

5.3.1 CORRELAÇÃO DOS PARÂMETROS CLÍNICOS COM A PCRq

Os resultados da expressão gênica de SOX2 e alfa-inibina não apresentaram nenhuma correlação com os parâmetros clínicos das pacientes. No entanto, a expressão gênica de SOX2 apresentou uma correlação positiva ($r: 0,3891$ $p: 0,0448$) com a porcentagem de oócitos maduros (Figura 16).

6 DISCUSSÃO

A infertilidade atinge mundialmente cerca de 8% a 10% dos indivíduos em idade reprodutiva, e um em cada seis casais enfrentam dificuldades para atingir a concepção. Associado a esses dados as transformações sociais trouxeram mudanças em relação à maternidade e o resultado é a crescente busca por procedimentos de reprodução assistida, em parte, determinada pelo adiamento da primeira gravidez na mulher, associado a outros fatores de saúde da mulher e, do casal (JOELMA *et al.*, 2019). De acordo com os dados do relatório do SisEmbrio/2019 o número de ciclos de fertilizações *in vitro* no Brasil vem aumentando e só no ano de 2019 foram realizados 44.705 ciclos (ANVISA, 2019).

Nos procedimentos de reprodução assistida, após a punção folicular resultante da EOC e separação dos oócitos que serão utilizados nos procedimentos, as células da granulosa humana são descartadas (DZAFIC; STIMPFEL; VIRANT-KLUN, 2013). As células da granulosa produzem hormônios e fatores de crescimento, que desempenham um papel importante para a foliculogênese, crescimento e maturação oocitária (HENNET; COMBELLES, 2012). O crescimento e o desenvolvimento do oócito dependem, em grande parte, do ambiente nutritivo do folículo, sendo de extrema importância para a formação de embriões viáveis, contudo a análise do ambiente folicular é uma etapa importante, não invasiva e que fornece pistas para alguns estudos (WALLACE *et al.*, 2012).

Alguns estudos têm buscado evidenciar a relação e importância das células da granulosa na foliculogênese e maturação oocitária, como os estudos recentes que investigaram e descreveram a apoptose nas células da granulosa humana e sua influência sobre a qualidade e as características clínicas do ciclo de fertilização (LOBACH *et al.*, 2017; ALMEIDA *et al.*, 2018a; ALMEIDA *et al.*, 2021b), com intuito de melhorar os resultados nos processos de reprodução assistida, em busca de marcadores em potencial da qualidade oocitária e, conseqüentemente, do embrião.

No presente estudo, levantamos a hipótese que a expressão de marcadores de indiferenciação celular, como o SOX2, nas células da granulosa humana, teria um efeito negativo na foliculogênese e maturação oocitária, assim como uma correlação inversa com a expressão de alfa-inibina pelas células da granulosa.

SOX2 é um dos principais fatores de transcrição indispensáveis para manutenção de células somáticas em células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC), e em conjunto com NANOG e OCT-4 executam um papel central na manutenção de células-tronco embrionárias (BIKSHAPATHI *et al.*, 2021). O nível da expressão da proteína SOX2 deve ser mantido no núcleo para sustentar sua pluripotência (BALTUS *et al.*, 2009). Portanto, em nosso estudo, foi considerado positivo para SOX2 apenas as células com imunomarcagem nuclear para SOX2, indicando seu efeito como fator de transcrição nuclear.

Pouco se sabe sobre a expressão de SOX2 em células da granulosa, no entanto, é extensamente estudada e relacionada ao comportamento agressivo de tumores, incluindo tumores ovarianos. A desregulação da expressão de SOX2 está relacionada a vários tipos de cânceres e afeta positivamente as características das células neoplásicas, como a competência de proliferar, migrar, invadir e metastatizar (NOVAK, 2020). A maioria dos estudos realizados evidencia que a expressão de SOX2 em células neoplásicas foi significativamente associada a um mau prognóstico e com características tumorais agressivas (YE *et al.*, 2011).

O presente estudo é o primeiro a demonstrar a expressão e imunolocalização de SOX2 em células da granulosa humanas luteinizada a fresco provenientes de mulheres submetidas à estimulação ovariana controlada. Anteriormente, Hoang e colaboradores (2019), investigaram pela técnica de PCRq a expressão de SOX2 em células da granulosa a fresco coletadas de folículos bovinos, e Mattioli e colaboradores (2012) investigaram pela técnica de PCRq e imuno-histoquímica a expressão de SOX2 em células da granulosa de folículos suíno após a coleta, expansão e após a diferenciação *in vitro* quando cultivadas em meio osteogênico.

A expressão gênica de SOX2 quando correlacionada com a porcentagem de oócitos maduros apresentou uma correlação positiva ($r: 0,3891$ $p: 0,0448$). Portanto, esse resultado foi contrário ao esperado pela nossa hipótese, de que a expressão de SOX2 estaria associada ao estado de indiferenciação das células da granulosa, e poderia impactar o desenvolvimento folicular e maturação oocitária, sendo associado ao menor número de oócitos maduros coletados. No entanto, a correlação foi fraca, e a expressão gênica de SOX2 não apresentou correlações significativas com outros parâmetros clínicos das pacientes incluídas no presente estudo.

Foi descrito pela primeira vez por Kossowska-Tomaszczuk e colaboradores (2009) a

multipotência de um subconjunto de células da granulosa luteinizada isoladas de folículos ovarianos humanos, quando cultivadas por um longo período em meio LIF. Essas células se transdiferenciaram em outras linhagens, como: neuronal, condrocítica e osteoblástica, linhagens que não estão presente nos folículos ovarianos. No entanto, os resultados apresentados no presente trabalho, indicam que as células da granulosa humana já apresentam marcadores de células tronco (SOX2), logo após a punção folicular, sem cultivo prévio em meio LIF.

Diante da busca de marcadores de atividade folicular, observou-se que a alfa-inibina foi expressa pelas células da granulosa, sendo possível a caracterização morfológica e identificação precisa das células da granulosa o que comprova que os dados relacionados à expressão das proteínas são pertencentes somente às células da granulosa. Isso também foi descrito por Mccluggage (2001) pela técnica imunocitoquímica, que identificou a imunomarcção citoplasmática de alfa-inibina nas células da granulosa, sendo possível comprovar a morfologia dessas células.

A alfa-inibina é formada em sua estrutura por duas subunidades alfa que é comum nas duas inibinas, e não foi possível diferenciar se a expressão gênica e proteica observada é da inibina A ou B. Consequentemente, tornou-se inviável fazer uma abordagem da expressão dos dois tipos de alfa-inibina nas amostras estudadas, não aprofundando na questão do estágio de maturação folicular.

Com relação à expressão gênica e proteica de alfa-inibina, não foi obtido correlação direta com a expressão da proteína SOX2. No entanto, alguns estudos *in vitro* validam que o mRNA da subunidade B da inibina é expresso predominantemente em folículos antrais e o mRNA da inibina A é expresso no folículo pré ovulatório (WELT *et al.*, 2001).

O interesse em investigar o potencial das células-tronco humanas nas células da granulosa tem crescido devido ao avanço na medicina regenerativa e também por ser uma fonte acessível de células-tronco. Contudo a alta expressão do fator de transcrição de SOX2 nas células da granulosa humana luteinizada fornece resultados promissores para investigação e uso dessas células para diferenciação *in vitro* e *in vivo* em outros tipos de células e tecidos, com o potencial uso na medicina regenerativa (DZAFIC; STIMPFEL; VIRANT-KLUN, 2013).

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos nesse estudo e nas condições empregadas, podemos concluir que o fator de transcrição SOX2 é expresso amplamente nas células da granulosa humana luteinizada provenientes de pacientes que foram submetidas à estimulação ovariana controlada. A alta expressão de SOX2 nas células da granulosa humana luteinizada pode abrir caminhos para o seu potencial uso na medicina regenerativa.

A expressão de alfa-inibina também foi expressa na maioria das células da granulosa. No entanto, não observamos correlação significativa dos marcadores estudados com os parâmetros clínicos mencionados das pacientes incluídas no estudo.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Estudar a expressão de NANOG e OCT-4 nas células da granulosa por atuarem em conjunto com SOX2 e mantêm a manutenção de células-tronco embrionárias.
- Estudar a expressão de SOX2 nas células da granulosa humana resultantes de uma foliculogênese fisiológica; a fim de investigar se o protocolo e o ciclo de estimulação ovariana controlada (EOC) podem influenciar na expressão de SOX2.
- Investigar o potencial de transdiferenciação e/ou diferenciação das células da granulosa humana em outros tipos de células e tecidos, com o objetivo de avaliar seu potencial uso na medicina regenerativa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAM, H.; MIYANO.T. Interaction between growing oocytes and granulosa cells in vitro. **Reproductive Medicine and Biology**, v.19, p.13-23, 2020.

ALBERTS, B *et al.*, **Biologia molecular da célula**. Porto Alegre: Artes Médicas, 5. Ed, 2010.

ALMEIDA, C. P *et al.*, Clinical correlation of apoptosis in human granulosa cells-A review. **Cell Biology International**, v. 42, n. 10, p. 1276–1281, 2018a.

ALMEIDA, C. P *et al.*, Pro-caspase-3 is constitutively expressed in luteinized granulosa cells from women undergoing controlled ovarian stimulation for in vitro fertilization. **Acta Histochem**, v.123, 2021b.

ALVAREZ, C.V *et al.*, Defining stem cell types: understanding the therapeutic potential of ESCs, ASCs, and iPS cells. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.49, p.89-111, 2012.

BALTUS, G. A. *et al.*, Acetylation of Sox2 induces its nuclear export in embryonic stem cells. **Stem Cells**, v. 27, n. 9, p. 2175-2184, 2009.

BAUMGARTEN, S. C.; STOCCO, C. **Granulosa Cells**, v.2, n.2, p.8-13, 2018.

BERTAN C.M.; BINELI M.; MADUREIRA E.H.; TRALDI A.S. Mecanismos endócrinos e moleculares envolvidos na formação do corpo lúteo e na luteólise - revisão de literatura. **Braz J Vet Res Anim Sci**, v.43, p.824-840, 2006.

BIKSHAPATHI, J *et al.*, “Structural basis for nuclear import selectivity of pioneer transcription factor SOX2.” **Nature communications**.v.12, n.1, 2021.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada- RDC Nº 23, de 27 de maio de 2011. Dispõe sobre o regulamento técnico para o funcionamento dos bancos de células e tecidos germinativos e dá outras providências.

BRISTOL-GOULD, S.; WOODRUFF, T.K. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). **Theriogenology**, v. 66, p. 5-13, 2006.

BUSTER, J. E. Activins, inhibins, and follistatins in reproduction. **J Soc Gynecol Investig**, v.10, n.4, 2003.

CAMPOS, O.C. *et.al.*, Influência da interação entre o oócito e as células da granulosa nos resultados dos procedimentos de reprodução assistida. **FEMINA**, v. 39, n. 4. 2011a.

CASTILLO, S.D.; SANCHEZ-CESPEDES, M. The sox family of genes in cancer development: biological relevance and opportunities for therapy. **Expert Opin. Ther. Targets**, v.16, n.9, p. 903-919, 2012.

CAVALLO, K.I *et al.*, Angiotensin-(1-7) in human follicular fluid correlates with oocyte maturation. **Hum Reprod**, v..32, n.6, p.1318-1324, 2017.

CHAMBERS, I.; TOMLINSON. S. R. The transcriptional foundation of pluripotency. **Development**, v. 136, p. 2311-2322, 2009.

CHAUFFOUR, C *et al.*, Effect of Endometriosis on IVF Outcomes in Cases of Single Embryo Transfer for first IVF Attempt in Patients under 35. **Journal of Endometriosis and Pelvic Pain**, v.8, n. 1 p. 13-18, 2016.

CORTVRINDT, R.; SMITZ, J. In vitro follicle growth: achievements in mammalian species. **Reprod Domest Anim**, v. 36, n.1, p.3-9, 2001.

D´ALMEIDA, S, G. Caracterização da família de fatores de transcrição DOF de *Eucalyptus grandis*. **BDTD**, 2014

DIAZ F.J *et al.*, Regulation of progesterone and prostaglandin F2 α production in the CL. **Mol Cell Endocrinol**, v.191, p.65-68, 2002.

DRIANCOURT, M.A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals: Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v. 55, p. 1211-1239, 2001.

DUMESIC, D. A. *et.al.*, Oocyte environment : follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. **Fertility and Sterility**, v. 103, n. 2, p. 303–316, 2015.

DZAFIC, E.; STIMPFEL, M.; VIRANT-KLUN, I. Plasticity of granulosa cells: on the crossroad of stemness and transdifferentiation potential. **J Assist Reprod Genet**, v.30, p. 1255–1261, 2013.

FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Anim Reprod Sci**, v. 78, p 203-206, 2003.

GOUGEON, A.; BUSSO, D. Morphologic and functional determinants of primordial and primary follicles in the monkey ovary. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 163, p. 1-2, 2000.

GRAY, P.C.; BILEZIKJIAN, L.M.; VALE, W. Antagonism of activin by inhibin and inhibin receptors: a functional role for betaglycan-glycan. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.180, p. 47-53, 2001.

GRIFFITHS, A. J. F *et al.*, Transcription: An overview of gene regulation in eukaryotes. **In An introduction to genetic analysis**, n.7, 2000.

GUBBAY, J *et al.*, A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. **Nature**, v. 346, p. 245–250, 1990.

HAGEY, D.W *et al.*, SOX2 regulates common and specific stem cell features in the CNS and endoderm derived organs. **PLOS Genetics**, v. 14, n. 2, 2018.

HENNET, M. L.; COMBELLES, C. M. H. The Antral Follicle: A Microenvironment for Oocyte Differentiation. **International Journal of Developmental Biology**, v. 56, p. 819–31, 2012.

HOANG, S.N *et al.*, Evaluation of stemness marker expression in bovine ovarian granulosa cells. **Anim. Reprod**, v.16 n.2, 2019.

JOELMA *et al.*, Técnicas de reprodução humana assistida: uma revisão bibliográfica. **Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento**, v.2,p. 90-104, 2019.

JONES, A.S.K.; SHIKANOV, A. Follicle development as an orchestrated signaling network in a 3D organoid. **J Biol Eng**, v. 13, n. 2, 2019.

JOZKOWIAK, M *et.al.*, The Stemness of Human Ovarian Granulosa Cells and the Role of Resveratrol in the Differentiation of MSCs—A Review Based on Cellular and Molecular Knowledge. **Cells**, v.9, n. 6, p. 1418, 2020.

JUURI, E *et al.*, SOX2 marks epithelial competence to generate teeth in mammals and reptiles. **Development**, v. 140, p. 1424-1432.2013.

KAMACHI, Y.; KONDOH, H. Sox proteins: regulators of cell fate specification and differentiation. **Development**, v. 140, n. 20, p. 4129-44, 2013.

KOSSOWSKA-TOMASZCZUK. K.; GEYTER.C. Cells with Stem Cell Characteristics in Somatic Compartments of the Ovary. **BioMed Research International**, v.2013, p.8, 2012.

KOSSOWSKA-TOMASZCZUK, K *et al.*, The multipotency of luteinizing granulosa cells collected from mature ovarian follicles. **Stem Cells**, v.27, p.210-219, 2009.

KRANC, W *et al.*, Heart development and morphogenesis is a novel pathway for human ovarian granulosa cell differentiation during long-term in vitro cultivation—a microarray approach. **Molecular Medicine Reports**, v.19, p. 1705-1715, 2019.

LEAVER B R.; Male infertility: an overview of causes and treatment options. **British Journal of Nursing**, v. 25, n.18, 2016.

LEE, H.V. Expression of Rabbit Zona Pellucida-1 Messenger Ribonucleic Acid During Early Follicular Development. **Biology Of Reproduction**, v. 63, p. 401–408, 2000.

LIU, C *et.al.*, Lineage specification of ovarian theca cells requires multicellular interactions via oocyte and granulosa cells. **Nature Communications**, v.6, n. 6934, 2015.

LIU, K *et al.*, The multiple roles for Sox2 in stem cell maintenance and tumorigenesis. **Cell Signal**. v.25, n.5, p. 1264-1271, 2013.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v.1.25, n.4, p.402-408, 2001.

LOBACH, V. N *et al.*, Caspase-3 gene expression in human luteinized granulosa cells is inversely correlated with the number of oocytes retrieved after controlled ovarian stimulation. **Human Fertility**, v. 1, p. 33-38, 2017.

MARKSTRÖM, E. *et.al.*, Survival factors regulating ovarian apoptosis: dependence on follicle differentiation. **Reproduction**, v.123, p.23-30, 2002.

MARTINS, F.S. Papel do GDF-9, IGF-I E GH sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos. **Tese**. Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, 2009.

MATSUDA, F. *et al.* Follicular Growth and Atresia in Mammalian Ovaries: Regulation by Survival and Death of Granulosa Cells. **J. Reprod. Dev**, v.58, n.1, p. 44-50, 2012.

MATTIOLI, M *et al.*, Osteo-regenerative potential of ovarian granulosa cells: an in vitro and in vivo study. **Theriogenology**, v.77, n.7, p.1425-1437, 2012.

MCGEE, A.E.; HSUEH, W.J.A. Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 2, p. 200-214, 2000.

NILSON, E.E.; KEZELE, P.; SKINNER, M.K. Leukemia inhibitory factor (LIF) promotes the primordial to primary follicle transition in rat ovaries. **Mol Cell Endocrinol**, v.188, p. 65-73, 2002.

NOVAK, D *et al.*, SOX2 in development and cancer biology. **Seminars in Câncer Biology**, v.67, n. 1, p. 74-82, 2020.

PAIWATTANANUPANT, K.; PHUPONG, V. Serum Inhibin A Level in Preeclampsia and Normotensive Pregnancy. **Hypertension in Pregnancy**, v.27, p. 337 343, 2008.

PANGAS, S.A; WOODRUFF, T.K. Activin signal transduction pathways. **Trends in endocrinology and Metabolism**, v.11, n.8, p.309-314, 2000.

PARTE, S *et al.*, Detection, characterization, and spontaneous differentiation in vitro of very small embryonic-like putative stem cells in adult mammalian ovary. **Stem Cells Dev**, v.8, p. 1451-64, 2011.

PASQUALOTTO, F. Investigação e reprodução assistida no tratamento da infertilidade masculina. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet**, v.29, n. 2, p. 103-112, 2007.

PROPHET, E. *et al.*, Laboratory methods in histotechnology. **Washington: American Registry of Pathology**, 1992.

REIS, M. F.; REZENDE, C. P. Aplicações das dosagens de inibinas em Ginecologia e Obstetrícia. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 31, n.12 p. 621-5, 2009.

RODDA, D.J *et al.*, Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. **J Biol Chem**, v.280, n.26, 2005.

SANTOS, T.A. Fisiologia do ovário e da reprodução. **Manual de ginecologia**, v. 3, p.39-56, 2009.

SARAIVA, M. V. A *et al.* Hormônios hipofisários e seu papel na foliculogênese. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, p. 206-221, 2010.

SARKAR, A.; HOCHEDLINGER, K. The Sox family of transcription factors: versatile regulators of stem and progenitor cell fate. **Cell Stem Cell**, v. 12, n. 1, p. 15-30, 2013.

SAUMANDE, J. La folliculogênese chez les ruminants. **Rec. Vét.** v. 167, p. 205-218, 1991.

SILVA *et al.*, Aspectos fisiológicos do LH na foliculogênese. **Departamento de Ginecologia e Obstetrícia**. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2006b.

SILVA, M. D. P. Sistema reprodutor feminino. Botucatu. **Departamento de Morfologia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"**, 2010a.

SIMONS, B. D.; CLEVERS, H. Strategies for homeostatic stem cell self-renewal in adult tissues. **Cell**. v.145, n.6. p.851-62, 2011.

SINCLAIR, A *et al.*, A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. **Nature**, v. 346, p. 240-244, 1990.

SMARAKAN, S *et al.*, Analysis of Human Stem Cell Transcription Factors. **Cellular Reprogramming**, v. 21, n.4, 2019.

STRAUSS, J. F.; WILLIAMS, C. J. Chapter 8 - Ovarian Life Cycle. **Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology**, n.8, p. 167-205, 2019.

THEMMEN, A.P. Anti-Mullerian hormone: its role in follicular growth initiation and survival and as an ovarian reserve marker. **J Natl Cancer Inst Monogr**, v.34, p. 18-21, 2005.

TSIGKOU, A *et al.*, Inhibins as diagnostic markers in human reproduction. **Advances in clinical chemistry**, v.45, 2008.

TSUCHIDA, K. *et al.*, Activin signaling as an emerging target for therapeutic interventions. **Cell Commun Signal**, v. 18, n. 7, p. 15, 2009.

VENKATESH, T.; SURESH P. S.; TSUTSUMI, R. New insights into the genetic basis of infertility. **Appl Clin Genet**, v. 1, n. 7, p. 235-43, 2014.

VILLAMIL, Q. T. M. F. Subunidade alfa da inibina e seu correceptor betaglican na endometriose. **BDTD**, 2010.

VIREQUE, A.A *et al.*, Culture of human granulosa cells with follicular phase phenotype: influence of chemically defined system on morphology, ultrastructure, secretion of steroids and relaxin. **Reprod Clim**, v.28, n.3, p.92-103, 2013.

WALLACE, M *et al.*, An investigation into the relationship between the metabolic profile of follicular fluid, oocyte developmental potential, and implantation outcome. **Fertility and Sterility**, v. 97, n. 5, 2012.

WEBB, R.; WOAD, K.J.; ARMSTRONG, D.J. Corpus luteum function: local control mechanisms. **Domest Anim Endocrinol**, v.23, p.277-285.2002.

WEINA, K.; UTIKAL, J. SOX2 and cancer: current research and its implications in the clinic. **Clinical and Translational Medicine**, v.3, n.19, p.2-10, 2014.

WELT, C *et al.*, Activins, inhibins, and follistatins: from endocrinology to signaling. A paradigm for the new millennium. **Experimental Biology and Medicine**, v.9, p. 724-752, 2002.

WELT, K.C *et al.*, Differential regulation of inhibin A and inhibin B by luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and stage of follicle development. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, vol.86, n.6, 2001.

YANG, J *et al.*, Gating pluripotency via nuclear pores. **Trends in Molecular Medicine**, v.20, n. 1, p. 1-7, 2014.

YE, F *et al.*, Expression of Sox2 in human ovarian epithelial carcinoma. **J Cancer Res Clin Oncol**, v.137, p.131-137, 2011.

YU, Y *et al.*, The effect of follicle-stimulating hormone on follicular development, granulosa cell apoptosis and steroidogenesis and its mediation by insulin-like growth factor-I in the goat ovary. **Theriogenology**, v. 60, p. 1691-1704, 2003.

ZAKRZEWSKI, W *et al.*, Stem cells: past, present, and future. **Stem Cell Res Ther**, v.3, n.1, p.11-20, 2013.

ZHANG, J *et al.*, Sex-determining region Y-box 2 expression predicts poor prognosis in human ovarian carcinoma. **Human Pathology**, v.43, n.9, p. 1405-1412, 2012.

ZHANG, Y. *et al.*, Research Trends and Perspectives of Male Infertility: A Bibliometric Analysis of 20 Years of Scientific Literature. **Andrology**, v. 4, p. 990-1001, 2016.

ANEXO A

Title: Stemness factor SOX2 is widely expressed in human luteinized granulosa cells from women undergoing controlled ovarian stimulation

Authors: Santuza Silva COELHO¹; Camila Pereira ALMEIDA¹; Rafaela Malta Coutinho Chaves de OLIVEIRA¹; Emerson SOARES¹; Enio FERREIRA¹; Fernando Marcos dos REIS²; Helen Lima DEL PUERTO¹

¹Department of General Pathology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; ²Department of Obstetrics and Gynecology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Running headline: SOX2 in human granulosa cells

Corresponding author:

Helen L. Del Puerto, PhD

Department of General Pathology, Institute of Biological Sciences,
Federal University of Minas Gerais.

Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha

31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

Tel. +55 31 3409-2878 Fax +55 31 3409-2879

e-mail: helendelpuerto@hotmail.com

Periodical for submission: Journal of Ovarian Research

Abstract

The human ovary is responsible for providing mature and competent oocytes for reproduction and contains cells displaying stem cell markers, including a granulosa cell subpopulation. Inhibins can be considered a marker of follicular activity and ovarian reserve. There is evidence that less differentiated cells with stem cell characteristics may indicate abnormalities of ovarian function leading to infertility. SOX2 is a transcription factor that determines the fate of stem cells, acting as an activator or suppressor of genes involved in cell differentiation, proliferation, and apoptosis. This study aimed to evaluate the gene and protein expression of SOX2 and Alpha-Inhibin of luteinized granulosa cells of patients submitted to controlled ovarian stimulation (COS) and its correlation with the total number of oocytes, the number of mature oocytes collected, among other clinical parameters. Thirty-two women undergoing controlled ovarian stimulation for in vitro fertilization were prospectively included in the study. Cells from luteinized granulosa (LGC) were isolated from the follicular fluid and the protein and gene expression of SOX2 and Alpha Inhibin was evaluated by ICC (cell block) and RT-RTPCRq. Results demonstrated positive immunostaining for Alpha-inhibin and SOX2 in GCs from all patients, being that SOX2 positive nuclear staining was observed in the majority of the cells (average 95%), predominantly cells with strong nuclear staining (average 64.2%). In contrast, SOX2 mRNA expression was not detected in 26% of patients LGCs. Besides, alfa-Inhibin positive cytoplasmic staining in human luteinized GCs was observed in all cases, with an average of 66% (40.6% showing strong staining, 25.7% with weak and moderate staining, and 33.4% with negative staining). In agreement, alpha-inhibin mRNA expression was detected in all patient's LGCs. However, contrary to expectations, the stemness factor SOX2 nuclear immunolocalization did not correlate with the number of oocytes and its maturation and had no impact on clinical parameters of patients undergoing COS. Interestingly, SOX2 protein is widely expressed in human luteinized granulosa cells. No significant clinical correlation was found between SOX2 and Alpha-inhibin protein and gene expression.

Keywords: Alpha-inhibin; FIV, Human Granulosa Cells; SOX2; Oocytes; Stem cells.

INTRODUCTION

Granulosa cells (GCs) play an essential role in oocyte maturation *in vivo* and *in vitro*, and dysfunction in granulosa cells can contribute to abnormal folliculogenesis and steroidogenesis. The benefits of the presence of these cells during this stage can be attributed to the formation of a favorable microenvironment (biochemical and metabolic) around the oocyte since they produce steroid hormones and growth factors and play a crucial role in follicular atresia [1].

Inhibins are glycoproteins of the TGF β growth factor family, produced by several cell types in various tissues and organs with significant production and secretion by the granulosa cells of growing follicles and the corpus luteum in the ovary [2]. In women, the primary source of Inibina B is the granulosa cells of growing follicles, which becomes a marker of follicular activity and ovarian reserve, with high levels in the follicular phase of the menstrual cycle, as well as deficient levels in post-menopause. Inhibin A is secreted mainly by the corpus luteum and the placenta and can be used to diagnose various placental disorders [3].

Experimentally, GCs have shown to be a population of multipotent cells, which have been differentiated into neuronal cells, chondrocytes, and osteoblasts *in vitro* in the presence of leukemia inhibiting factor (LIF) or follicle-stimulating hormone (FSH), suggesting that they are formed from cells in various stages differentiation [4]. Transcription factors also play a critical role in regulating gene expression programs that establish and maintain specific cellular states in humans. Their deregulation can lead to a wide range of diseases [5]. SOX transcription factors are a conserved group of transcriptional regulators that mediate DNA binding by a highly conserved domain of the HMG (High Mobility Group) group [6].

Numerous pieces of evidence have recently demonstrated that SOX transcription factors critically control cell fate and differentiation in the primary developmental processes. Their positive or negative regulation can be necessary for the maturation of different cell types [7]. The SOX2 transcription factor is expressed in a series of stem cell subtypes, having a fundamental role in regulating the characteristics of stem cells, being necessary in various stages of embryonic development, and influencing cell fate and differentiation [8].

We can observe in the literature that the differentiation of granulosa cells is an important phenomenon for their function, being indispensable for oocyte maturation [9]. Within this context, the present study evaluated the gene and protein expression of SOX2 and Alpha-Inhibin in luteinized human granulosa cells from patients undergoing controlled ovarian stimulation (COS) and its correlation with the total number of oocytes, number of mature oocytes collected, among other clinical parameters.

MATERIALS AND METHODS

Ethical approval

The Research Ethics Committee approved this study of Universidade Federal de Minas Gerais under protocol No 1.979.648, version 2. The participants signed informed consent before being enrolled.

Controlled ovarian stimulation (COS), follicular aspiration, LGCs cells separation, and cell block

Sample of follicular fluid (FF) was collected from 32 patients who underwent controlled ovarian stimulation (COS) in a private clinic. According to the protocol standardized by the Clinic and specifically for each patient, COS and follicular aspiration were performed according to age, antral follicular count, and baseline FSH levels [10]. Separation of luteinized granulosa cells (LGCs) from follicular aspiration and cellblock were performed in the Laboratório do Comportamento Celular (LCC-ICB-UFMG), as previously described [10].

SOX2 and alpha inhibin immunocytochemistry luteinized human granulosa cell

Cell block sections were processed for immunocytochemistry using the peroxidase method with a polymerized secondary antibody (Novolink Polymer Detection System; Leica Biosystems, UK) for alpha-inhibin; and avidin-biotin-peroxidase for SOX2 identification (ABC Kit – Vector Laboratories, San Francisco, CA, USA). Antigen retrieval was performed by humid heating (water bath at 98 °C) with Target Retrieval Solution Citrate pH 6.0 (Dako Cytomation, Cat. No. S2369, Glostrup, Denmark). To block endogenous peroxidases, sections were incubated twice for 5 min in Peroxidase Blockade Solution (Novolink Polymer Detection System). Slides were incubated for 15 min with Protein Block Solution (Novolink Polymer Detection System). Sections were incubated with primary antibodies (anti-alpha-inhibin from Abcam, monoclonal, diluted 1:100; and anti-SOX2 from RD Systems, polyclonal, diluted 1:50) for 16 h at room temperature, followed by the secondary antibody, diaminobenzidine (Dako, Cat. No. K3468) and hematoxylin counter-staining. Alpha-inhibin was evaluated as a functional marker of LGC. Negative controls had the primary antibody replaced by antibody diluent (Dako, Cat. No. S0809).

All analyses were performed by light microscopy at 400X magnification. Images were captured using an Olympus BX_40 camera (Olympus Company, Shinjuku, Tokyo, Japan) and Spot Basic imaging software for microscopy (Spot Imaging, Diagnostic Instruments, Inc.). Images were analyzed using ImageJ (SciJava) [11], and positive cells were manually counted using ImageJ cell counter plug-in. Counting was performed by a single observer, out of 500 LGC scattered in the preparation from each cell block section [12] with the assistance of a

grid. Briefly, using ImageJ grid plug-in, six sections were defined in the images. The upper left, middle bottom, and upper right sections were selected to perform the counting until the 500 cells were analyzed.

RNA isolation, cDNA synthesis, and real-time PCR

Total RNA was isolated from human LGCs using 1 mL of TRI Reagent (Sigma- Aldrich, Cat. No. T9424, St. Louis, USA) according to the manufacturer's protocol. First-strand complementary DNA (cDNA) was synthesized from 1 µg of RNA treated with DNase I (Invitrogen, Cat. No. 18047019, Carlsbad, CA) using the SuperScript III reverse transcriptase kit (Invitrogen, Cat. No. 18080093) with random hexamer primers. Real-time PCR was carried out in an ABI Prism Applied Biosystems StepOne™ (Applied Biosystems, Foster City, CA), using Power Sybr®Green Master Mix Kit (Invitrogen, Cat. No. 4368577). The PCR parameters were: Stage 1: 52°C for 2 min; Stage 2: 95°C for 10 min; Stage 3: 45 cycles at 95°C for 15s, 55°C for 30s; Stage 4: Melt curve – 95°C for 30 s and 60°C for 1 min.

The primers used for SOX2, alpha-inhibin and S26 are, respectively (5'- 3'): SOX2Fw CCATCACCCACAGCAAAT; SOX2Rev GAAGTCCAGGATCTCTCTCA; Alpha-InFw ACTGCCACAGAGTAGCACTGAACA; Alpha-InRev AGTGGAAGATGAAACTGG GAGGGGT; HsS26Fw TGTGCTTCCCAAGCTGTATGTGAA HsS26Rev CGATTCCCTGACTACTTTGCTGTGAA. Primers were designed from sequences on GenBank, using the Blast program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>) and analyzed using the program from the Integrated DNA Technologies website (<http://www.idtdna.com>).

Statistical analysis

For statistical analysis, the GraphPad Prism version 8.0 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) was used. The variables' normality of the data was verified using the D'Agostino-Pearson test. Linear correlations were assessed using Spearman's correlation coefficient, using $p < 0.05$ as the significance limit. The deltaCT expressed the normalized results, and relative gene expression was defined as $1/\text{deltaCt}$ [13][14].

RESULTS

Immunocytochemistry for alpha-inhibin and SOX2

Positive immunostaining for alpha-inhibin and SOX2 was found in human luteinized GCs, identified by dark brown staining with differentiated intensity. Small cells with no defined cell pattern, inflammatory cells and red blood cells were excluded from the count. The immunocytochemistry analysis of alpha-inhibin was performed following the cytoplasmic staining pattern, counted and analyzed by a single observer, using the absent, weak / moderate and strong staining score (Figure 1). The immunocytochemistry analysis of SOX2 was carried out following the nuclear staining pattern, counted and analyzed by a single observer, using the absent, weak / moderate and strong staining score (Figure 2).

Positive cytoplasmic staining with alpha-inhibin in human luteinized GCs was observed in all cases, with an average of 66% (40.6% showing strong staining, 25.7% with weak and moderate staining and 33.4% with staining negative). Nuclear staining positive for SOX2 in human luteinized GCs was observed in all cases, in most cells (mean percentage of 95%), predominantly cells with strong staining (mean rate of 64.2%) (Table 1).

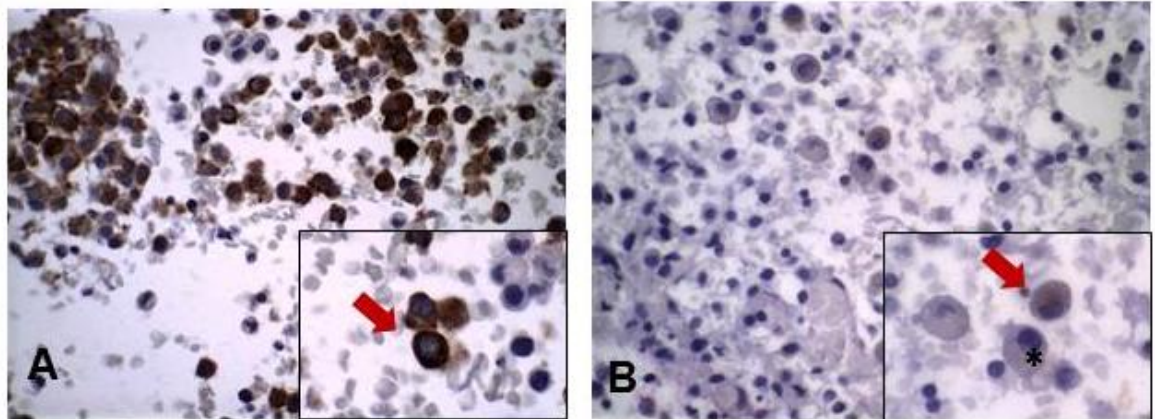


Figure 1. Immunostaining for alpha-inhibin in human luteinized granulosa cells (LGC). **A.** Light photomicrographs of cell block containing LGC cytoplasmic immunostained for alpha-inhibin (red arrow). Insert details of cytoplasmic staining of alpha-inhibin in LGC. **B.** Light photomicrographs of cell block containing LGC stained for alpha-inhibin (red arrows). Insert details of weak cytoplasmic staining of alpha-inhibin in LGC. 60X.

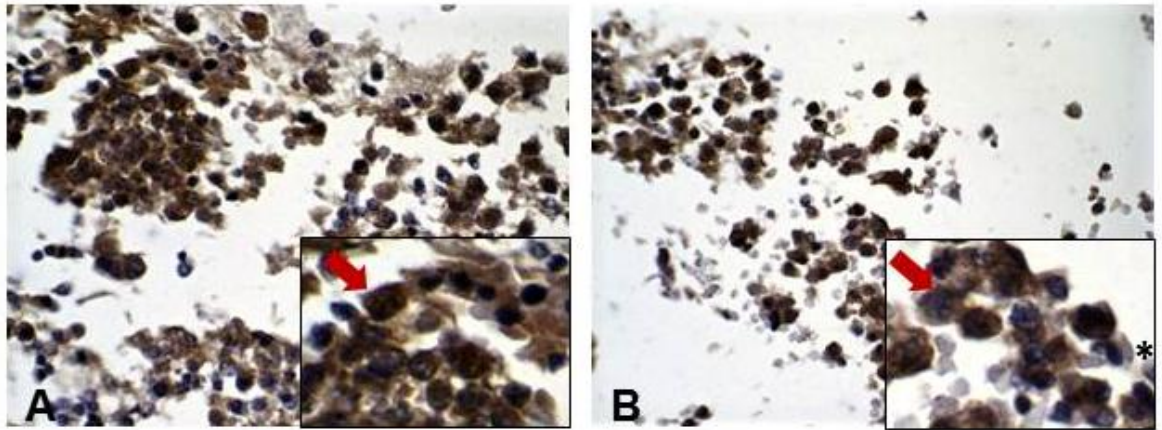


Figure 2: Immunostaining for SOX2 in human luteinized granulosa cells (LGC). A. Light photomicrographs of cell block containing LGC cytoplasmic and nuclear immunostained for SOX2 (red arrow). Insert details of cytoplasmic and nuclear strong staining SOX2 in LGC. B. Light photomicrographs of cell block containing LGC stained for SOX2. Insert details of weak nuclear staining (red arrows) and negative staining (asterisk) of SOX2 LGC. 60X.

Table 1: Score average percentage of human luteinized granulosa cells staining for SOX2 and alpha-Inhibin.

| SCORE | Strong | Weak/Moderate | Absent |
|---------------|--------|---------------|--------|
| SOX2 | 64.2% | 30.5% | 5.1% |
| Alpha-Inhibin | 40.6% | 25.7% | 33.4% |

Alpha-inhibin and SOX2 mRNA expression

Alpha-inhibin and SOX2 mRNA expression was evaluated from 27 out of 32 patients enrolled in this investigation. Alpha-inhibin mRNA expression was present in all cases. However, SOX2 mRNA expression was not detected in all cases; it was detected in 20 out of 27 patients (26%). No significant clinical correlation was found between Alpha-inhibin and SOX2 gene expression, such as the number of oocytes retrieved and mature oocytes. No significant correlation was found between SOX2 gene expression and alpha-inhibin gene and protein expression.

DISCUSSION

Human granulosa cells differentiation is an important phenomenon for their function, indispensable for their physiological activity and consequently oocyte maturation [15].

The interest in investigating the potential of human GC's stem cells has grown due to the advancement of regenerative medicine and also because it is an accessible source of stem cells, seen by the ease of collecting ovarian follicles obtained during the collection of oocytes from women subjected to assisted reproduction techniques and are usually discarded after follicular puncture and separation of oocytes from the follicular fluid. Recent research has described the expression of stem cell markers in GCs, including OCT-4, Nanog, and SOX2, as well as the ability to transdifferentiate CGs in vitro [16].

SOX2 protein, an important transcription factor for embryonic stem cell self-renewal and pluripotency, has been studied as a marker associated with chemoresistance and poor prognosis in several types of cancer, including epithelial ovarian cancer. However, little is known about the functions and characteristics of the SOX2 protein in the human ovary, especially in human granulosa cells, and the impact and participation of this protein in folliculogenesis and oocyte maturation [17].

The stem cell marker SOX2 expression has been described in human ovarian cancer tissue and human granulosa cells cultured and treated in vitro with LIF medium [18]. In the present study, the protein and mRNA expression of SOX2 in human granulosa cells of patients undergoing controlled ovarian stimulation (COS) and its correlation with the clinical outcome of infertility treatment is evaluated for the first time. Results indicated the correlation of SOX2 gene expression with the percentage of mature oocytes in about 38% of cases ($r: 0.3891$). Therefore, results did not indicate a correlation of SOX2 protein expression with the number of oocytes collected and the oocytes maturation state. Although the limitations of the present study concerning the number of patients included in the study, the significant protein expression of SOX2 was described for the first time in luteinized human granulosa cells (95% of the cells).

SOX2, OCT4, and Nanog are important transcription factors that maintain the self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells, involved in maintaining stem cells in a pluripotent state. The increase in nuclear reactivity is suggestive of embryonic de-differentiation and acquisition of stem cells [19]. The present data, showing that stemness factor SOX2 is widely expressed in human luteinized granulosa cells from women undergoing controlled ovarian stimulation, opens up a window to human granulosa cells in regenerative medicine as an important source of cells with stem cells characteristics.

CONCLUSION

The correlation between SOX2 protein and gene expression with clinical data and IVF outcomes from women undergoing controlled ovarian stimulation was not significant. However, the transcription factor SOX2 was found to be widely expressed in human luteinized granulosa cells.

REFERENCES

1. Hennet ML, Combelles CM. The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation. *Int J Dev Biol.* 2012;56(10-12):819-31. doi: 10.1387/ijdb.120133cc. PMID: 23417404.
2. Phupong, V, Paiwattananupant K , Honsawek S. Inhibin A levels and severity of preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet* 280, 183–186 (2009). <https://doi.org/10.1007/s00404-008-0886-y>
3. Reis F M, Resende C . Aplicações das dosagens de inibinas em Ginecologia e Obstetrícia. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* [online]. 2009, vol.31, n.12, pp.621-625. ISSN 1806-9339. <https://doi.org/10.1590/S0100-72032009001200008>.
4. Jozkowiak M, Hutchings G, Jankowski M, Kulcenty K, Mozdziak P, Kempisty B, Spaczynski RZ, Piotrowska-Kempisty H. The Stemness of Human Ovarian Granulosa Cells and the Role of Resveratrol in the Differentiation of MSCs-A Review Based on Cellular and Molecular Knowledge. *Cells.* 2020 Jun 7;9(6):1418. doi: 10.3390/cells9061418. PMID: 32517362; PMCID: PMC7349183.
5. Kamachi Y, Kondoh H. Sox proteins: regulators of cell fate specification and differentiation. *Development.* 2013 Oct;140(20):4129-44. doi: 10.1242/dev.091793. PMID: 24086078.
6. Holmes, Z E, Hamilton D J , Hwang, T. et al. The Sox2 transcription factor binds RNA. *Nat Commun* 11, 1805 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15571-8>
7. Basu-Roy, U, Ambrosetti D, Favaro, R. et al. O fator de transcrição Sox2 é necessário para a autorrenovação dos osteoblastos. *Cell Death Differ* 17, 1345–1353 (2010). <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.57>
8. Hagey DW, Klum S, Kurtsdotter I, Zaouter C, Topcic D, Andersson O, Bergsland M, Muhr J. SOX2 regulates common and specific stem cell features in the CNS and endoderm derived organs. *PLoS Genet.* 2018 Feb 12;14(2):e1007224. doi: 10.1371/journal.pgen.1007224. PMID: 29432416; PMCID: PMC5825159.
9. Alam MH, Miyano T. Interaction between growing oocytes and granulosa cells in vitro. *Reprod Med Biol.* 2019 Aug 22; 19(1): 13-23. doi: 10.1002/rmb2.12292. PMID:

31956281; PMCID: PMC6955591.

10. Almeida CP, Silveira CO, Ferreira E, Ferreira MC, Oliveira G G, Veloso E S, Silva F H S, Coelho S S, Moraes L M, Reis F M, Del Puerto H L. Pro-caspase-3 is constitutively expressed in luteinized granulosa cells from women undergoing controlled ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Acta Histochem.* 2021 Feb;123(2):151670. doi: 10.1016/j.acthis.2020.151670. Epub 2020 Dec 25. PMID: 33360490.

11. Schneider, C., Rasband, W. & Eliceiri, K. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9, 671–675 (2012). <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>

12. Denkova R, Bourneva V, Staneva-Dobrovski L, Zvetkova E, Baleva K, Yaneva E, Nikolov B, Ivanov I, Simeonov K, Timeva T, Yankov M. In vitro effects of inhibin on apoptosis and apoptosis related proteins in human ovarian granulosa cells. *Endocr Regul.* 2004 Jun;38(2):51-5. PMID: 15497928.

13. Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262. PMID: 11846609.

14. Cavallo IK, Dela Cruz C, Oliveira ML, Del Puerto HL, Dias JA, Lobach VN, Casalechi M, Camargos MG, Reis AM, Santos RA, Reis FM. Angiotensin-(1-7) in human follicular fluid correlates with oocyte maturation. *Hum Reprod.* 2017 Jun 1;32(6):1318-1324. doi: 10.1093/humrep/dex072. PMID: 28402544.

15. Hagey DW, Klum S, Kurtzdotter I, Zaouter C, Topcic D, Andersson O, Bergsland M, Muhr J. SOX2 regulates common and specific stem cell features in the CNS and endoderm derived organs. *PLoS Genet.* 2018 Feb 12;14(2):e1007224. doi: 10.1371/journal.pgen.1007224. PMID: 29432416; PMCID: PMC5825159.

16. Jozkowiak M, Hutchings G, Jankowski M, Kulcenty K, Mozdziak P, Kempisty B, Spaczynski RZ, Piotrowska-Kempisty H. The Stemness of Human Ovarian Granulosa Cells and the Role of Resveratrol in the Differentiation of MSCs-A Review Based on Cellular and Molecular Knowledge. *Cells.* 2020 Jun 7;9(6):1418. doi: 10.3390/cells9061418. PMID: 32517362; PMCID: PMC7349183.

17. Wen Y, Hou Y, Huang Z, Cai J, Wang Z. SOX2 is required to maintain cancer stem

cells in ovarian cancer. *Cancer Sci.* 2017 Apr;108(4):719-731. doi: 10.1111/cas.13186. PMID: 28165651; PMCID: PMC5406610.

18. Kossowska-Tomaszczuk, K., De Geyter, C., De Geyter, M., Martin, I., Holzgreve, W., Scherberich, A. and Zhang, H. (2009), The Multipotency of Luteinizing Granulosa Cells Collected from Mature Ovarian Follicles. *STEM CELLS*, 27: 210-219. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2008>

19. PRADHAN, S; GUDDATTU, V; SOLOMON, MC. Association of the co-expression of SOX2 and Podoplanin in the progression of oral squamous cell carcinomas - an immunohistochemical study. *J. Appl. Oral Sci., Bauru* , v. 27, e20180348, 2019 . <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2018-0348>.

ANEXO B

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Apoptose celular nas células da granulosa induzida pelo citrato de clomifeno *in vitro* e o efeito protetor do estradiol. Estudo comparativo com o letrozol.

Pesquisador: Márcia Cristina França Ferreira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 64379416.1.0000.5149

Instituição Proponente: Universidade Federal de Minas Gerais

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.979.648

Apresentação do Projeto:

O citrato de clomifeno apesar de ser amplamente utilizado para indução de ovulação, seu mecanismo de ação não é totalmente elucidado, mas sabe-se que envolve um bloqueio no mecanismo de auto-regulação negativa, o que levaria a um aumento na secreção de FSH (hormônio folículo estimulante). O efeito esperado da medicação é o surgimento de um ou mais folículos dominantes, seguido de amadurecimento e ruptura, que irá resultar na liberação de um oócito maduro. Embora sejam altas as taxas de ovulação com o uso do citrato de clomifeno, as taxas de gravidez após ovulação confirmada são baixas e estão relacionadas a maiores taxas de abortamento. Acredita-se que o efeito anti estrogênico do clomifeno poderia afetar os estágios finais da foliculogênese induzindo apoptose nas células da granulosa e oócitos *in vitro* a partir de estudos extrapolados de ratos *in vivo*. A apoptose é um evento de morte celular programada na ausência de reações inflamatórias que pode estar relacionada a várias condições fisiológicas e patológicas. Estudo realizado em ratas identificou que o tratamento com citrato de clomifeno poderia induzir apoptose provavelmente nas células da granulosa e níveis reduzidos de estradiol sérico e ovariano, o que afetaria a qualidade do complexo cúmulos "oophorus" ao induzir apoptose em suas

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad Sl 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 1.979.646

células após ovulação. E a suplementação de estradiol poderia proteger contra este efeito. De fato, existe a possibilidade, baseada em estudos animais, que a suplementação exógena de 17 beta estradiol possa prevenir o ambiente hipoestrogênico induzido pelo citrato de clomifeno, impedindo que a célula da granulosa entre em apoptose, o que também seria um fator de proteção contra a deterioração da qualidade oocitária. Apesar de amplamente utilizado para indução de ovulação, não está descrito na literatura se o letrozol poderia promover apoptose das células da granulosa e interferir com os estágios finais da folículo-gênese. Este estudo visa avaliar os efeitos do citrato de clomifeno, letrozol e estradiol in vitro na expressão de marcadores de apoptose pelas células da granulosa de mulheres submetidas a procedimentos de reprodução assistida.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

-Avaliar o mecanismo de apoptose nas células da granulosa induzida pelo citrato de clomifeno "in vitro".

Objetivo Secundário:

-Avaliar se o letrozol apresenta também efeito pró-apoptótico nas células da granulosa.

-Avaliar o efeito protetor do estradiol neste processo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

De acordo com as pesquisadoras, os riscos decorrem do tratamento a que se submetem para tratamento da infertilidade na clínica Fertibaby. Estes compreendem principalmente a Síndrome de Hiperestímulo Ovariano, que acontece em 1 a 2 % dos ciclos e leva ao acúmulo de líquido no abdome (ascite), distensão abdominal e desconforto respiratório. Na grande maioria dos casos, é um transtorno leve e transitório. Há ainda um pequeno risco de formação de hematomas subcutâneos durante a aplicação das gonadotrofinas, assim como infecção, que também pode acontecer durante a punção folicular (eventos muito raros). O protocolo do estudo científico aqui proposto não acrescenta nenhum risco adicional às pacientes, uma vez que utilizaremos células que recobrem o óvulo e que seriam desprezadas pelo laboratório.

Benefícios:

-Trazer informações importantes que poderão ter aplicação direta na terapêutica de pacientes inférteis.

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad S/ 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 1.979.648

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma tese de Doutorado, estudo experimental, prospectivo, comparativo, envolvendo o cultivo e tratamento de células humanas in vitro. Projeto relevante para a área de reprodução humana, tendo em vista que a infertilidade é um problema de saúde pública em todo o mundo. Apresenta financiamento próprio e orçamento estimado em R\$ 20.000,00, no entanto será solicitado auxílio financeiro ao CNPq e à Fapemig. Apresenta a Fertibaby Medicina Reprodutiva como instituição co-participante. Quanto aos aspectos éticos, apresenta TCLE com garantia do anonimato dos participantes e sigilo dos dados com utilização das informações apenas para fins de pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados:

- Carta resposta das pesquisadoras frente ao parecer anterior.
- Projeto no formato da plataforma Brasil e detalhado
- Folha de rosto devidamente preenchida e assinada pela pesquisadora e direção da Faculdade de Medicina.
- TCLE
- Parecer consubstanciado e aprovado pela Câmara do Departamento de Ginecologia e Obstetria da FMUFMG
- Termo de compromisso em cumprimento da resol. 466/2012.assinada pelas pesquisadoras

Recomendações:

Sugere-se:

- Informar no TCLE que uma cópia do termo será entregue ao participante;
- Acrescentar também no projeto detalhado, o risco da pesquisa e conste no cronograma de ambos os projetos, que os experimentos laboratoriais só serão iniciados após a aprovação do COEP.
- Corrigir erros de digitação na descrição dos riscos da pesquisa no projeto Plataforma Brasil.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, sou SMJ, pela aprovação do projeto com as devidas observações.

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o COEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos,6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS**



Continuação do Parecer: 1.979.648

notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|--|------------------------|------------------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_823677.pdf | 14/03/2017 11:43:39 | | Aceito |
| Outros | cartaresposta.pdf | 14/03/2017 11:43:26 | Márcia Cristina França Ferreira | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE.docx | 26/02/2017 19:35:45 | Márcia Cristina França Ferreira | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | projetocompleto.docx | 26/02/2017 19:35:23 | Márcia Cristina França Ferreira | Aceito |
| Folha de Rosto | folhaderosto.pdf | 02/02/2017 17:30:05 | Márcia Cristina França Ferreira | Aceito |
| Outros | image2.JPG | 02/02/2017 17:23:25 | Márcia Cristina França Ferreira | Aceito |
| Outros | image1.JPG | 02/02/2017 17:22:41 | Márcia Cristina França Ferreira | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | declaracaopesquisadores.pdf | 10/11/2016 18:19:20 | Márcia Cristina França Ferreira | Aceito |
| Outros | 64379416parece.pdf | 23/03/2017 11:16:05 | Vivian Resende | Aceito |
| Outros | 64379416aprovado.pdf | 23/03/2017 11:16:26 | Vivian Resende | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 23 de Março de 2017

**Assinado por:
Vivian Resende
(Coordenador)**

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad Si 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

ANEXO C

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezada Senhora,

Gostaria de convidá-la a participar de um estudo científico que irá avaliar dois medicamentos utilizados para tratamento de infertilidade, cuja finalidade é aumentar as chances de gravidez.

I. INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Esta pesquisa visa ao estudo de duas medicações que são utilizadas para induzir ovulação em pacientes que não ovulam espontaneamente: citrato de clomifeno e letrozol. Nesta pesquisa, utilizaremos as células da granulosa que são retiradas do óvulo após a coleta ovular e que seriam desprezadas pela clínica Fertibaby, para avaliar se essas medicações estão associadas a alterações celulares conhecidas como apoptose e se o estrogênio adicionado a estas células poderia impedir este processo.

II. SIGILO DOS DADOS

Todos os seus dados serão confidenciais, sua identidade não será revelada publicamente em hipótese alguma e somente os pesquisadores envolvidos neste projeto terão acesso a estas informações que serão utilizadas somente para fins de pesquisa.

III. BENEFÍCIOS DA PESQUISA

Este estudo trará informações importantes que poderão ter aplicação direta na terapêutica. O melhor conhecimento da resposta celular a estas medicações nos mostrará um caminho para aumentar as chances de gravidez.

IV. RISCOS

O estudo não acrescenta nenhum risco às pacientes, uma vez que não exerce nenhuma influência ou modificação no tratamento. Utilizaremos células que recobrem o óvulo e que seriam desprezadas pelo laboratório.

V. RESSARCIMENTO DAS DESPESAS

Não está prevista qualquer forma de remuneração para as voluntárias. Todas as despesas específicas relacionadas com o estudo são de responsabilidade dos proponentes do estudo. O estudo não acarretará nenhuma despesa extra às voluntárias.

VI. DEMAIS ESCLARECIMENTOS

Você dispõe de total liberdade para esclarecer qualquer dúvida que possa surgir durante a pesquisa. Você poderá recusar-se a participar deste estudo e/ou abandoná-lo a qualquer momento, sem precisar se justificar. A aceitação ou não da participação neste estudo não

influenciará no seu tratamento. Não será realizado qualquer tipo de manipulação, experimento ou intervenção direta com o paciente.

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu,, voluntariamente concordo que sejam utilizadas as células da granulosa e líquido folicular que, após o desnudamento dos meus óvulos, seriam desprezados pela clínica Fertibaby para viabilizar a realização da ICSI (injeção intracitoplasmática de espermatozoides), para fins de pesquisa científica na Universidade Federal de Minas Gerais. Estou ciente do exposto acima e ainda de que esta pesquisa não trará qualquer prejuízo à minha saúde ou ao tratamento.

Belo Horizonte,de.....de 20.....

Assinatura da voluntária:

Telefones para contato:

Dra. Camila Oliveira da Silveira Caires Lopes (31) 3335-9274 (Clínica Fertibaby)

Profa. Marcia Cristina França Ferreira: (31) 3409-9764 (Departamento de GOB)

Profa. Helen Lima Del Puerto: (31) 3409-2881 (Departamento de Patologia Geral)

Mestranda: Camila Almeida: (31) 98864-2813 (Departamento de Patologia Geral)