

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Patologia

Camila Pereira Almeida

**MARCADORES DE APOPTOSE EM CÉLULAS DA GRANULOSA  
HUMANAS E SUA CORRELAÇÃO COM PARAMETROS CLÍNICOS  
DE PACIENTES SUBMETIDAS A HIPERESTIMULAÇÃO OVARIANA  
CONTROLADA**

Belo Horizonte

2019

Camila Pereira Almeida

**Marcadores de apoptose em células da granulosa humanas e sua correlação com parâmetros clínicos de pacientes submetidas a hiperestimulação ovariana controlada**

**Versão final**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Patologia – Área de concentração em Patologia Investigativa.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Helen Lima Del Puerto

Co-orientadores: Prof. Dr. Fernando Marcos dos Reis

Prof. Dr. Enio Ferreira

Belo Horizonte

2019

Almeida, Camila Pereira.

AL447m Marcadores de Apoptose em células da granulosa humanas e sua correlação com parâmetros clínicos de pacientes submetidas a hiperestimulação ovariana controlada [manuscrito]. / Camila Pereira Almeida. -- Belo Horizonte: 2019.

72f.: il.

Orientador (a): Helen Lima del Puerto.

Coorientador (a): Fernando Marcos dos Reis; Enio Ferreira.

Área de concentração: Patologia Investigativa.

Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Apoptose. 2. Caspase 3. 3. Caspase 8. 4. Células da Granulosa. 5. Indução da Ovulação. 6. Dissertação Acadêmica. I. Puerto, Helen Lima del. II. Reis, Fernando Marcos dos. III. Ferreira, Enio. IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. V. Título.

NLM: QU 375



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

UFMG

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA  
**CAMILA PEREIRA ALMEIDA**

Realizou-se, no dia 21 de fevereiro de 2019, às 14:00 horas, C3 - Sala de reuniões - Departamento de Patologia, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada *MARCADORES DE APOPTOSE EM CÉLULAS DA GRANULOSA HUMANAS E SUA CORRELAÇÃO COM PARAMETROS CLÍNICOS DE PACIENTES SUBMETIDAS A HIPERESTIMULAÇÃO OVARIANA CONTROLADA*, apresentada por CAMILA PEREIRA ALMEIDA, número de registro 2017668146, graduada no curso de BIOMEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Helen Lima Del Puerto - Orientador (UFMG), Prof(a). Fernando Marcos dos Reis (UFMG), Prof(a). Enio Ferreira (UFMG), Prof(a). Marcia Cristina Franca Ferreira (UFMG), Prof(a). Milene de Alvarenga Rachid (UFMG).

A Comissão considerou a dissertação:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 21 de fevereiro de 2019.

Prof(a). Helen Lima Del Puerto ( Doutor )

Prof(a). Fernando Marcos dos Reis ( Doutor )

Prof(a). Enio Ferreira ( Doutor )

Prof(a). Marcia Cristina Franca Ferreira ( Doutora )

Prof(a). Milene de Alvarenga Rachid ( Doutor )

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por sempre acreditarem em mim e nos meus sonhos, e terem dado todo suporte para que eu pudesse trilhar meu caminho, e à minha irmã, por ser minha melhor amiga acima de tudo. Amo vocês incondicionalmente, essa vitória é nossa.

À minha queridíssima orientadora Helen Lima del Puerto, por me fazer reaprender o amor pela pesquisa e me dar uma das oportunidades mais importantes da minha vida, além de ser um modelo de ser humano, mãe, profissional e professora. O seu carinho como orientadora é a prova de que é possível se fazer ciência de uma forma mais humana.

Ao meu Co-orientador Enio Ferreira, pelas contribuições e discussões que tanto agregaram ao trabalho, pelo exemplo de professor e orientador a ser seguido, e também pela companhia no almoço, pelas caronas e a amizade construída ao longo do caminho.

Ao meu Co-orientador Fernando Marcos dos Reis, pelas contribuições inestimáveis ao trabalho, pela experiência e sabedoria compartilhadas e por me receber com tanto carinho em seu grupo de pesquisa e seu laboratório.

Aos amados amigos e companheiros pós-graduandos do laboratório Barbara Andrade, Bruna Lima, Emerson Soares e Felipe Souza, pela amizade, carinho, suporte, brincadeiras e até mesmo pelo deboche nosso de cada dia. Vocês tornaram os dias no laboratório infinitamente mais agradáveis.

Aos alunos, amigos e agregados do Laboratório do Comportamento Celular, por compartilharem da rotina e terem dado a oportunidade de dividir um pouco do conhecimento que adquiri ao longo dos anos.

Aos colaboradores Marcia França e Camila Oliveira, juntamente com toda equipe da clínica de reprodução particular, pela oportunidade e cuja contribuição foi a base para a realização deste trabalho, e ao professor Geovanni Cassali, por disponibilizar a estrutura do Laboratório de Patologia Comparada

A todos os professores e profissionais que em algum momento contribuíram para minha formação acadêmica e pessoal.

A todas as pacientes, gratidão na contribuição do meu trabalho.

Muitíssimo obrigada!

**Esse trabalho foi realizado no Laboratório do Comportamento Celular do Departamento de Patologia Geral – ICB / UFMG, com apoio financeiro do CNPq, FAPEMIG e CAPES.**

## RESUMO

A qualidade oocitária depende das interações dos oócitos com as células da granulosa que os cercam. As células da granulosa são essenciais para um processo bem regulado de maturação oocitária, devido a sua produção de hormônios esteroides e não-esteroides, e fatores de crescimento, além de terem um papel crucial na atresia folicular. Aliado a isso, o aumento nas taxas de apoptose nas células da granulosa humana parecem ter efeito negativo na concepção e taxas de gravidez em programas de fertilização *in vitro*. Assim, o presente trabalho investigou a correlação clínica da expressão proteica de pró caspase-3 e caspase-3 clivada, assim como da expressão gênica de genes envolvidos na cascata de apoptose, em células da granulosa de pacientes submetidas a hiperestimulação ovariana controlada. Foram coletadas células da granulosa de 35 pacientes em tratamento de infertilidade ou com fins de preservação de fertilidade, e as células foram separadas do líquido folicular para expressão de pró caspase-3 e caspase-3 clivada por imunocitoquímica (ICQ), e expressão de genes indutores (BAX, CASPASE 8 e CASPASE 3) e inibidores (BCL2) da apoptose por RT-RTPCRq. Os resultados demonstraram correlações positivas entre a marcação de caspase-3 clivada com a duração do protocolo de indução de ovulação ( $r = 0.445$ ,  $p < 0.05$ ), assim como também da expressão gênica de CASPASE 3 e CASPASE 8 ( $r = 0.462$ ,  $p < 0.05$ ;  $r = 0.420$ ,  $p < 0.05$ ; respectivamente). Adicionalmente, foi observado diferença entre a expressão ICQ de pró caspase-3 e caspase-3 clivada nas células da granulosa ( $p < 0.0001$ ) e uma correlação positiva entre a marcação de pró-caspase-3 com a proporção de oócitos maduros coletados ( $r = 0.427$ ,  $p < 0.05$ ). Portanto, o presente estudo demonstrou que, pacientes submetidas a um tempo maior no protocolo para indução de ovulação apresentam maior proporção de apoptose em células da granulosa humana, e esse evento pode estar relacionado a dois fatores distintos: i) um tempo mais longo de indução de ovulação leva a ativação da apoptose em células da granulosa; ii) um índice apoptótico maior em células da granulosa proporciona um tempo maior para indução da ovulação. Entretanto, a expressão de pró-caspase-3 em células da granulosa humana relaciona-se a uma maior porcentagem de oócitos maduros, indicando que a expressão de pró-caspase-3 pode estar envolvida a uma melhor atividade fisiológica das células da granulosa humana, sendo expressa de forma constitutiva nessas células durante a foliculogênese.

**PALAVRAS-CHAVE:** Apoptose; Caspase-3; Caspase-8; Células da granulosa humana; Hiperestimulação ovariana controlada

## ABSTRACT

The quality of oocytes depends on interactions with surrounding granulosa cells. Granulosa cells are essential in normal follicular maturation process since they produce steroidal hormones and growth factors, and they play a crucial role in follicular atresia. An increase of granulosa cells apoptosis appears to have a negative effect on conception and pregnancy rates in IVF programs. Thus, this study evaluated the clinical correlation of pro caspase-3, cleaved caspase-3 and other apoptosis related genes expression in human granulosa cells of patients undergoing controlled ovarian stimulation. We enrolled prospectively 35 IVF patients referred to a private clinic for couple infertility treatment and women fertility preservation. Luteinized granulosa cells were isolated from follicular fluid, their expression of pro caspase-3 and cleaved caspase-3 was assessed by immunostaining of cellblock sections and the gene expression of apoptosis inducers (CASPASE 3, CASPASE 8 and BAX) and inhibitor (BCL2) was quantified by real-time polymerase chain reaction. Cleaved caspase-3 correlated positively with the length of COS ( $r = 0.445$ ,  $p < 0.05$ ) and the length of infertility ( $r = 0.476$ ,  $p < 0.05$ ). Gene expression of CASPASE 3 and CASPASE 8 also correlated directly with the length of COS ( $r = 0.462$ ,  $p < 0.05$ ;  $r = 0.420$ ,  $p < 0.05$ ; respectively). There was a major difference in the expression of pro caspase 3 and cleaved caspase 3 in granulosa cells ( $p < 0.0001$ ), associated with a positive correlation of pro caspase 3 expression and the proportion of mature oocytes collected ( $r = 0.427$ ,  $p < 0.05$ ). Therefore, the present study demonstrated that patients submitted to control ovarian stimulation (COS) protocol for a longer period present a higher proportion of apoptosis in granulosa cells, and this event may be related to the time period needed to COS that triggers apoptosis in granulosa cells; or the higher proportion of apoptosis in granulosa cells is the cause for a longer time of COS in these patients. These previous findings suggest that pro caspase 3 is constitutively expressed in human granulosa cells, underling it's role not as a cell death marker, but of physiological granulosa cell function. Moreover, the activation of caspase 3 in granulosa cells is associated with a longer COS in IVF protocols.

**KEYWORDS:** Apoptosis; Caspase 3; Caspase 8; Controlled ovarian stimulation; Granulosa cells.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Anticorpos primários, fabricantes e padronização utilizadas no estudo imunocitoquímico. ....	32
<b>Tabela 2:</b> Sequência dos <i>Primers</i> utilizados na PCR em tempo real. ....	33
<b>Tabela 3:</b> Características clínicas das pacientes participantes do estudo e resultados da hiperestimulação ovariana controlada e dos procedimentos de fertilização <i>in vitro</i> realizados .....	36
<b>Tabela 4:</b> Expressão relativa dos genes envolvidos nas vias da apoptose em amostras de pacientes submetidas a HOC. ....	45

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Interações parácrinas e autócrinas entre células da teca, células da granulosa e o oócito.....	19
<b>Figura 2:</b> Representação esquemática de folículo antral.....	21
<b>Figura 3:</b> Modelo esquemático de mecanismos de sobrevivência e apoptose em células da granulosa em um folículo saudável e um folículo atrésico..	22
<b>Figura 4:</b> Gráfico de distribuição das indicações de hiperestimulação ovariana controlada entre as pacientes em estudo .....	35
<b>Figura 5:</b> Fotomicrografia de <i>cellblock</i> contendo células da granulosa humanas. Hematoxilina e Eosina..	38
<b>Figura 6:</b> Fotomicrografia de <i>cellblock</i> contendo fragmentos de epitélio de tuba uterina e epitélio vaginal. Hematoxilina e Eosina.....	39
<b>Figura 7:</b> Fotomicrografia de <i>cellblock</i> de aspirado folicular humano. Imunocitoquímica para $\alpha$ -inibina.....	40
<b>Figura 8:</b> Marcação imunocitoquímica de caspase-3 clivada e pró-caspase-3 em células da granulosa humana..	42
<b>Figura 9:</b> Relação da expressão de caspase-3 com parâmetros clínicos das pacientes que passaram pelo protocolo de HOC. ....	43
<b>Figura 10:</b> Curvas de <i>Melting</i> dos genes alvos amplificados.....	44
<b>Figura 11:</b> Correlação da expressão genica de caspase-3 e caspase-8 com a duração do protocolo de indução de ovulação .....	45
<b>Figura 12:</b> Expressão relativa dos genes-alvo da apoptose.....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A: Androstenediona

AMH: Hormônio antimulleriano

Apaf-1: Fator de ativação de proteases pró-apoptóticas

Bcl-2: B-cell lymphoma protein 2

BMP: Proteína óssea morfogenética

cDNA: DNA complementar

CGs: Células da granulosa

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

DAB: 3'3-diaminobenzidina

DNase: Desoxirribonuclease

EGF: Fator de crescimento epidérmico

EGFR: Receptor de fator de crescimento epidérmico

E: Estradiol

FAPEMIG: Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais

FGF: Fator de crescimento fibroblástico

FSH: Hormônio folículo estimulante

FIV: Fertilização *in vitro*

FOXO2: proteína *forkhead box* L2

GDF: Fator de crescimento e diferenciação;

GnRH: Hormônio liberador de gonadotrofinas

hCG: Gonadotrofina coriônica humana

HGF: Fator de crescimento do hepatócito

HOC: Hiperestimulação ovariana controlada

ICQ: Imunocitoquímica

ICSI: Injeção intracitoplasmática de espermatozoides

IGF: Fatores de crescimento tipo insulina

KGF: Fator de crescimento derivado de queratinócitos

KL: Ligante Kit

LF: Líquido folicular

LH: Hormônio luteinizante

MII: Metáfase II

mTORC1: Alvo mamífero do complexo de rapamicina 1

OMS: Organização Mundial de Saúde

RA: Ácido retinóico

PCR: Reação em cadeia da polimerase

ROS: Espécies reativas de oxigênio

Rpm: Rotações por minuto

RT: Transcrição reversa

SBF: Soro bovino fetal

S26: Subunidade da proteína ribossomal

TGF: Fator de crescimento transformador

TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral alfa

U: Unidades

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	15
2.1. APOPTOSE .....	15
2.1.1. CASPASE 3 .....	17
2.2. CÉLULAS DA GRANULOSA.....	18
2.2.1. REGULAÇÃO DA FOLICULOGÊNESE E ATRESIA.....	19
2.3. HIPERESTIMULAÇÃO OVARIANA CONTROLADA (HOC) .....	22
2.3.1. INTERFERÊNCIA DA APOPTOSE EM PROCEDIMENTOS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA .....	23
3. JUSTIFICATIVA .....	24
4. HIPÓTESE .....	25
5. OBJETIVOS.....	26
5.1. OBJETIVO GERAL .....	26
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	26
6. MATERIAIS E MÉTODOS .....	27
6.1. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	27
6.2. O EXPERIMENTO.....	27
6.3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO.....	27
6.4. HIPERESTIMULAÇÃO OVARIANA CONTROLADA, ASPIRAÇÃO DE FOLÍCULOS E FERTILIZAÇÃO IN VITRO.....	27
6.5. PARÂMETROS CLÍNICOS .....	29
6.6. SEPARAÇÃO DO LÍQUIDO FOLICULAR E DAS CÉLULAS DA GRANULOSA.....	29
6.7. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO – <i>CELLBLOCK</i> – DAS CÉLULAS DA GRANULOSA.....	30
6.8. IMUNOCITOQUÍMICA PARA $\alpha$ -INIBINA, PRÓ-CASPASE-3 E CASPASE-3 CLIVADA.....	31
6.9. EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL E TRANSCRIÇÃO REVERSA.....	32
6.10. OLIGONUCLEOTÍDEOS ESPECÍFICOS .....	33
6.11. REALIZAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL.....	33
6.12. COLETA E ANÁLISE DE DADOS .....	34
6.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
7. RESULTADOS .....	35

<b>7.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DAS PACIENTES EM ESTUDO, PARÂMETROS DA HOC E RESULTADOS DA FIV .....</b>	<b>35</b>
<b>7.2. CELLBLOCK DAS CÉLULAS DA GRANULOSA E IMUNOCITOQUÍMICA PARA <math>\alpha</math>-INIBINA.....</b>	<b>36</b>
<b>7.3. EXPRESSÃO IMUNOCITOQUÍMICA DE CASPASE-3 CLIVADA E PRÓ-CASPASE-3 EM CÉLULAS DA GRANULOSA E SUA CORRELAÇÃO CLÍNICA</b>	<b>41</b>
<b>7.4. EXPRESSÃO DE GENES-ALVO PARA APOPTOSE E SUA CORRELAÇÃO CLÍNICA.....</b>	<b>43</b>
<b>8. DISCUSSÃO.....</b>	<b>47</b>
<b>9. CONCLUSÕES .....</b>	<b>50</b>
<b>10. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>51</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>53</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>57</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>57</b>
<b>ANEXO B.....</b>	<b>61</b>
<b>ANEXO C.....</b>	<b>63</b>
<b>ANEXO D.....</b>	<b>67</b>
<b>ANEXO E.....</b>	<b>74</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Infertilidade é definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como a incapacidade de um casal em alcançar a concepção ou levar uma concepção a termo após um ano ou mais de relações sexuais regulares, sem proteção contraceptiva (LEAVER, 2016). São muitas as causas de infertilidade, atingindo cerca de 10-15% dos casais, podendo afetar a mulher, o homem ou ambos, sendo assim uma questão com grande impacto na saúde psicológica do casal (ZHANG et al., 2016). A estimulação ovariana é aplicada durante o manejo da infertilidade, para indução de ovulação em pacientes anovulatórias, e é utilizada isoladamente ou em conjunto com inseminação intrauterina e outras tecnologias de reprodução assistida (CHAUBE et al., 2014).

As células da granulosa (CGs) têm um importante papel na maturação oocitária *in vivo e in vitro*, e os benefícios da presença dessas células durante a foliculogênese podem ser atribuídos à formação de um microambiente favorável (bioquímico e metabólico) ao redor do oócito, uma vez que produzem hormônios esteroides e fatores de crescimento, além de desempenhar um papel crucial na atresia folicular (HENNET; COMBELLES, 2012).

A apoptose é um processo contínuo em todas as fases do desenvolvimento ovariano e folicular, participa da depleção das células germinativas do ovário no desenvolvimento embrionário e fetal, na atresia folicular durante a vida reprodutiva, e é responsável pela degeneração do corpo lúteo. No entanto, a apoptose das CGs parece ter um efeito negativo nas taxas de gravidez em programas de fertilização *in vitro* (FIV), uma vez que a maior incidência de apoptose em CGs tem sido associada a uma maior incidência de folículos vazios, menos oócitos recuperados e menor qualidade de oócitos e embriões. Além disso, diferentes protocolos de estimulação ovariana afetam diferentemente a incidência de apoptose nas células da granulosa (ALMEIDA et al., 2018; JANČAR et al., 2007).

Diversos estudos buscam demonstrar uma correlação clínica da expressão de marcadores apoptóticos em células da granulosa humanas, sendo a caspase-3 uma das principais moléculas avaliadas. Atualmente não há um consenso sobre o exato papel da apoptose e da caspase-3 como preditores da qualidade oocitária, já que diferentes trabalhos apresentaram resultados divergentes sobre a correlação da expressão de marcadores apoptóticos nas CGs e os resultados de procedimentos de FIV ou da qualidade dos oócitos coletados (ALMEIDA et al., 2018;

CLAVERO et al., 2003; GLAMOČLIJA et al., 2005; JANČAR et al., 2007; KANEKO et al., 2000; LEE et al., 2001; LOBACH et al., 2017; NAKAHARA et al., 1997; OOSTERHUIS et al., 1998; SUH et al., 2002).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. APOPTOSE

A apoptose foi primariamente descrita em 1972, como sendo um tipo de morte celular morfológicamente distinto do que já havia sido observado até então (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972), e passou a ser reconhecida como uma forma de morte celular “programada” por envolver a eliminação geneticamente determinada de células. Sendo assim, a apoptose é responsável por manter a homeostase em organismos multicelulares através do balanço entre proliferação e morte celular (RIEDL; SHI, 2004). Esse fenômeno ocorre normalmente durante o desenvolvimento embrionário e organogênese, e também durante a vida adulta, na renovação de células epiteliais, na involução de estruturas e órgãos por privação de fatores de crescimento, hormônios ou na senilidade, e até mesmo na involução de tumores (ELMORE, 2007; LI; YUAN, 2008).

Morfológicamente, a apoptose é caracterizada pela fragmentação do DNA, condensação citoplasmática, picnose nuclear, formação de projeções na membrana citoplasmática (*blebbing*), colapso do citoesqueleto e finalmente a formação dos corpos apoptóticos, que são prontamente fagocitados por macrófagos ou células vizinhas, sem ativação da resposta imune (LI; YUAN, 2008).

Os mecanismos e vias bioquímicas de ativação da apoptose são extremamente complexos, envolvendo cascatas de sinalização molecular dependentes de energia. As principais vias de ativação da apoptose são a via extrínseca (receptores de morte) e intrínseca (mitocondrial), sendo que ambas estão conectadas, e portanto, moléculas de uma via podem influenciar a outra, e ambas convergem para a mesma cascata terminal de execução: a clivagem da pró-caspase-3 em caspase-3, com conseqüente fragmentação do DNA (IGNEY; KRAMMER, 2002).

A via extrínseca envolve interações mediadas por receptores de morte transmembrana, membros da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF), e possuem um domínio

citoplasmático denominado “domínio de morte”, responsável por transmitir o sinal extracelular de morte da superfície celular para as cascatas de sinalização intracelular. Os principais receptores de morte descritos são o receptor Fas (FasR) e o receptor TNFR1, que quando ativados por seus respectivos ligantes (FasL e TNF- $\alpha$ ), ativam uma série de intermediários que resultam na ativação da pró-caspase-8 em caspase-8, uma molécula iniciadora do processo de apoptose (ELMORE, 2007).

Já a via intrínseca pode ser iniciada por diversos estímulos, como ausência de hormônios, fatores de crescimento e citocinas (perda da supressão da apoptose), ou danos celulares diretos (radiação, toxinas, hipóxia, radicais livres e infecções virais), todos eles resultando em alterações na membrana mitocondrial. Essas alterações resultam em uma maior permeabilidade da mitocôndria e consequente liberação de diversas proteínas pró-apoptóticas para o citoplasma, sendo uma das principais o citocromo c, que juntamente com o fator de ativação de apoptose 1 (Apaf-1) forma o apoptossomo, ativando a caspase-9 e a via mitocondrial de morte dependente de caspase (ELMORE, 2007; GRÜTTER, 2000).

Tanto a via extrínseca quanto a intrínseca terminam na ativação das vias efetoras da apoptose, iniciada pela ativação das caspases efetoras que por sua vez ativam endonucleases responsáveis por degradar o material genético, e proteases que degradam proteínas nucleares e do citoesqueleto. Essa degradação dos componentes celulares é o que dá origem as alterações morfológicas e bioquímicas observadas nas células apoptóticas (LI; YUAN, 2008).

A regulação e a execução da apoptose são atribuídas principalmente a duas grandes famílias: a Bcl-2 e as Caspases (ADAMS, 2003). A família Bcl-2 está subdividida em dois grupos: pró-apoptóticas (Bax, Bad, Bid, Bcl-xS, Bak, Box, Bik, Blk, Bim, Hrk, BNIP3), localizadas principalmente na membrana externa da mitocôndria; e anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xl, A1, Mcl-1), localizadas no envelope nuclear e no retículo endoplasmático (WANG; YOULE, 2009). A Bax está diretamente relacionada com a atresia oocitária (JURISICOVA; ACTON, 2004). A homeostase é mantida pelo controle da quantidade de proteínas pró-apoptóticas e antiapoptóticas presentes e/ou ativadas no citoplasma (FRANTZ et al., 2006; YANG; RAJAMAHENDRAN, 2002). Estas proteínas estão ligadas às mudanças na permeabilidade da membrana mitocondrial, porém também podem estar envolvidas na ativação das caspases. A proteína Bcl-2 inibe a apoptose diretamente bloqueando as caspases e, indiretamente,

impedindo a liberação de citocromo c. Essa é uma importante proteína que participa da ativação da apoptose via alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial (MIGNOTTE; VAYSSIERE, 1998).

As caspases são proteases que utilizam a cisteína como grupo nucleofílico na clivagem de substratos, desencadeando a apoptose (CHANG; YANG, 2000; GRÜTTER, 2000). Essas proteases são sintetizadas como precursores inativos (pró-caspases) e são ativadas (caspases) somente quando a célula recebe sinal de morte (LI; YUAN, 2008). São classificadas como caspases iniciadoras (caspases 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11 e 12) e caspases efetoras (caspases 3, 6 e 7), e após a ativação das caspases efetoras o mecanismo de ativação da apoptose torna-se irreversível (LI; YUAN, 2008).

### 2.1.1. CASPASE 3

A caspase-3 é considerada a mais importante caspase efetora, e pode ser ativada por qualquer caspase iniciadora (caspases 8, 9 ou 10). Ela ativa especificamente a DNase ativada por caspase (CAD), uma endonuclease responsável pela degradação internucleossômica do DNA e condensação da cromatina. Além disso, a caspase-3 também induz a reorganização do citoesqueleto e desintegração da célula em corpos apoptóticos (ELMORE, 2007). A ativação da caspase-3 é um dos últimos eventos da morte celular, sendo considerado um “ponto de não-retorno”. No citoplasma, assim como outras caspases, a caspase-3 existe na forma de uma pró-enzima que é clivada em duas subunidades que se dimerizam, formando assim a enzima ativa. Por ser uma caspase efetora, a pró-enzima da caspase-3 não possui nenhuma atividade até ser clivada pelas caspases iniciadoras, evitando que uma desregulação na produção de caspase-3 leve à morte indiscriminada de células (WALTERS et al., 2009).

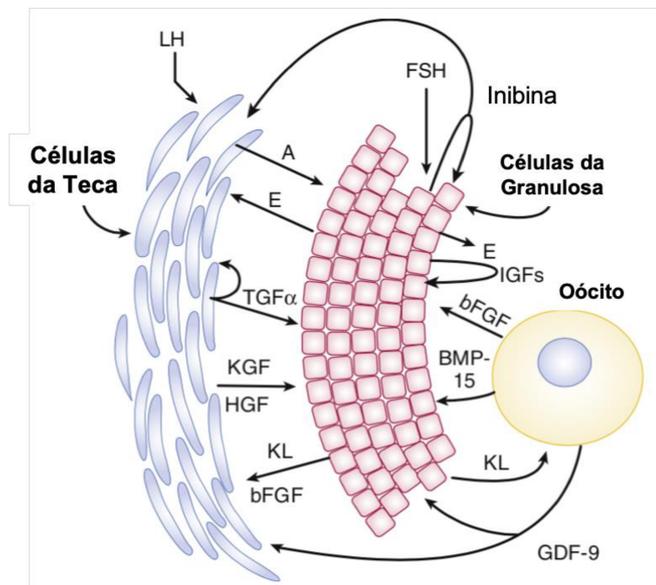
Apesar de ser uma proteína chave na execução da apoptose, evidências indicam que a caspase-3 possua outras funções vitais não relacionadas à apoptose, como desenvolvimento embrionário, diferenciação de neurônios, disfunção de sinapses, desordens neurológicas (doenças de Parkinson e Alzheimer), regulação da hematopoiese, renovação de células senescentes e ainda algumas disfunções cardíacas e autoimunes (AMELIO; CAVALLUCCI; CECCONI, 2009; KHALILZADEH et al., 2018; SHALINI et al., 2015).

## 2.2. CÉLULAS DA GRANULOSA

Células da granulosa (CGs) são células somáticas derivadas das células do epitélio celomático que formam a crista gonadal, e dão suporte para o desenvolvimento dos gametas femininos nos ovários. Elas são as únicas células somáticas que interagem diretamente com o oócito, formando uma monocamada ao redor da oogônia no folículo primordial e futuramente constituindo as várias camadas do *cumulus oophorus* que circundam o oócito no folículo pré ovulatório. Em todos os seus estágios de diferenciação as CGs são componentes críticos para a nutrição e maturação do gameta feminino, criando o ambiente metabólico e hormonal necessário para sincronizar a receptividade uterina com a liberação dos oócitos maduros e sustentar os primeiros estágios da gravidez (BAUMGARTEN; STOCCO, 2018).

Os múltiplos componentes celulares dos folículos interagem de forma muito bem integrada para secretar hormônios esteroides e não esteroides, controlando o desenvolvimento oocitário, sendo a interação células da granulosa-oócito de extrema relevância (Figura 1). A sinalização bidirecional entre as CGs e o oócito, via interações parácrinas, regula o crescimento dos folículos primordiais, dos quais um folículo antral dominante será selecionado para ovulação de um oócito maduro e o restante dos folículos será eliminado por apoptose, no processo de atresia (DUMESIC et al., 2015; STRAUSS; WILLIAMS, 2014). Essa sinalização bidirecional se altera ao longo da foliculogênese para sincronizar o desenvolvimento do folículo com a maturação oocitária, e caso esses mecanismos sejam perturbados pode haver danos moleculares nas CGs, levando à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) ou a mutações mitocondriais, alterando assim o microambiente folicular e prejudicando o oócito. Por isso, a regulação da foliculogênese e da atresia pelas CGs é essencial para uma boa qualidade oocitária.

**Figura 1:** Interações parácrinas e autócrinas entre células da teca, células da granulosa e o oócito. A, androstenediona; BMP, proteína óssea morfogenética; E, estradiol; FGF, fator de crescimento fibroblástico; FSH, hormônio foliculo estimulante; GDF, fator de crescimento e diferenciação; HGF, fator de crescimento do hepatócito; IGF, fatores de crescimento tipo insulina; KGF, fator de crescimento derivado de queratinócitos; KL, ligante Kit; LH, hormônio luteinizante; TGF, fator de crescimento transformador.



Adaptado de Strauss e Willians, 2014

### 2.2.1. REGULAÇÃO DA FOLICULOGÊNESE E ATRESIA

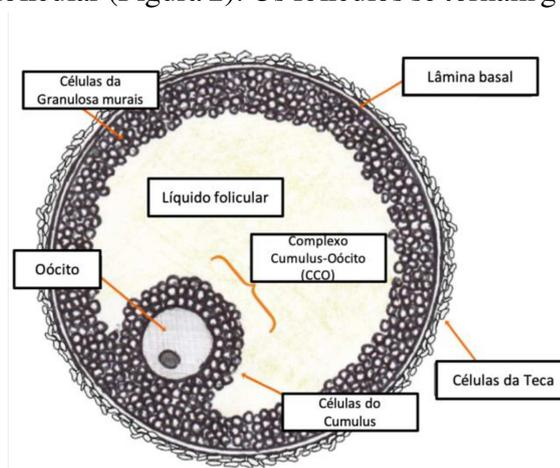
O desenvolvimento dos folículos ovarianos é um processo regulado por diversos fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos que atuam coordenadamente para selecionar os folículos que serão ovulados, sendo que mais de 99% de todos os folículos ovarianos não atingem o estágio pré ovulatório e são eliminados por um processo degenerativo fisiológico, chamado atresia. Fatores produzidos e secretados pelas CGs, como hormônios esteroides e não esteroides, fatores de crescimento e diferenciação celular e citocinas, demonstraram ser essenciais para a sobrevivência, crescimento e proliferação das CGs e conseqüentemente dos folículos. Além disso, as CGs são o primeiro tipo celular a entrar em apoptose nos folículos atréticos, indicando seu papel não só na regulação do crescimento folicular, como também do processo de atresia (MATSUDA et al., 2012).

O papel das CGs na regulação da foliculogênese em humanos começa já na vida intrauterina com o início da produção de ácido retinóico (RA) pelas pré células da granulosa, induzindo grupos de oogônias a entrarem em meiose, tornando-se oócitos. Posteriormente, os oócitos são circundados por um epitélio simples de pré células da granulosa escamosas, formando os

folículos primordiais – as unidades funcionais básicas do ovário (BAUMGARTEN; STOCCO, 2018). Após a puberdade, um número de folículos primordiais inicia seu crescimento a cada ciclo menstrual, tornando-se folículos primários. As pré CGs escamosas tornam-se cúbicas e se proliferam, estimuladas por fatores ovarianos e oocitários, como a ativação do fator de transcrição *forkhead box L2* (FOXL2), do complexo de proteínas Alvo mamífero do complexo de rapamicina 1 (mTORC1) e a interação entre o receptor Kit presente na superfície do oócito e seu ligante (Kit-L), expresso pelas CGs (BAUMGARTEN; STOCCO, 2018).

Subsequentemente, os folículos evoluem para folículos secundários, com o crescimento da camada de células da teca ao redor das camadas de CGs, que começam a expressar receptores de hormônio folículo estimulante (FSH), estradiol e andrógenos. Estimuladas pelo hormônio luteinizante (LH), as células da teca iniciam a síntese de andrógenos que serão convertidos em estradiol pelas CGs no folículo antral (BAUMGARTEN; STOCCO, 2018; STRAUSS; WILLIAMS, 2014). Durante a transição para folículo antral, estimuladas por fatores derivados do oócito (Fator de Crescimento e Diferenciação 9 (GDF-9) e Proteína Morfogenética Óssea 15 (BMP-15)), as CGs produzem diversos fatores autócrinos e parácrinos, como Kit-L, ativinas, inibinas, hormônio antimulleriano (AMH) e Fator do Crescimento Transformador- $\alpha$  (TGF $\alpha$ ) – que coordenam o crescimento do oócito, a proliferação das CGs e diferenciação das células da teca (DUMESIC et al., 2015).

Já na fase antral são estabelecidos compartimentos distintos no folículo: o oócito, circundado por CGs que formam a corona radiata e o *cumulus oophorus*, as CGs murais que revestem internamente o folículo e são separadas das células da teca pela membrana basal, e o antro preenchido pelo líquido folicular (Figura 2). Os folículos se tornam gonadotrofina-dependentes,



onde o FSH e o LH estabelecem os mecanismos primários que controlam a seleção e dominância dos folículos, através dos eixos de *feedback* entre hipotálamo-hipófise-ovário (HENNET; COMBELLES, 2012). O FSH é o principal hormônio que nesse momento controla o crescimento folicular, resultando na produção e secreção de estradiol e inibina pelas CGs dos folículos maiores e dominantes. Estradiol e inibina atuam no eixo hipotálamo-hipófise e levam a diminuição da secreção de FSH (*feedback* negativo ovariano), para que o crescimento dos folículos não-dominantes seja suprimido. Nesse momento, as CGs do folículo dominante adquirem receptores de LH, transferindo os últimos estágios da maturação folicular à presença do LH, quando o pico desse hormônio finalmente resulta na ovulação (MATSUDA et al., 2012; STRAUSS; WILLIAMS, 2014)

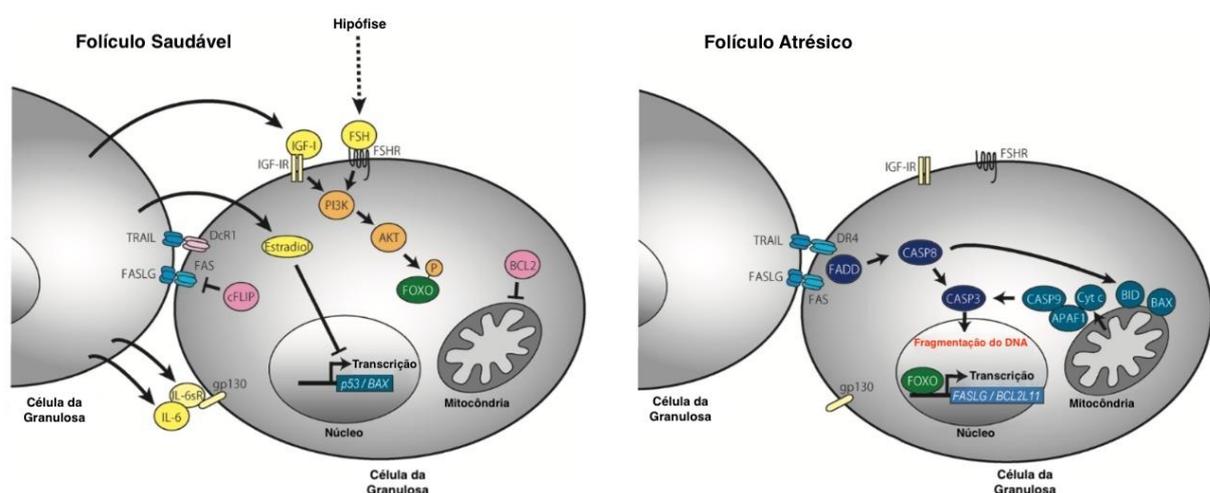
**Figura 2:** Representação esquemática de folículo antral.

Adaptado de Hennet e Combelles, 2012.

Apesar de a atresia poder ocorrer em qualquer fase do desenvolvimento folicular a fase antral é a de maior incidência do processo, onde a maioria dos folículos são descartados por apoptose e pouquíssimos são selecionados para a ovulação (HIRSHFIELD, 1991). A atresia ocorre principalmente como um reflexo da ausência de fatores tróficos essenciais em momentos críticos da formação ou maturação folicular, como o FSH, estradiol, fator de crescimento semelhante à insulina (IGFs) e outros fatores de crescimento. Em ovários fetais, a morte por apoptose é primariamente responsável pela eliminação das células germinativas e após o nascimento tanto o oócito quanto as CGs estão envolvidos na apoptose. Porém, nos folículos em crescimento são as CGs que sofrem as primeiras mudanças que levam à atresia, recebendo assim a função de iniciadoras da morte por atresia (BAUMGARTEN; STOCCO, 2018; CHAUBE et al., 2005; CHUN et al., 1996; HENNET; COMBELLES, 2012; MARKSTRÖM et al., 2002). Nos estágios iniciais de atresia folicular, as CGs em apoptose surgem e aumentam seu número gradualmente (enquanto não existem indícios de apoptose no oócito ou nas células da teca), até que a maioria das CGs estejam em apoptose em folículos atrésicos mais avançados, onde há a disruptura quase total das camadas de CGs, que se desprendem umas das outras invadindo o espaço antral, e esses folículos são então eliminados (MATSUDA et al., 2012). Dessa forma, não são observadas CGs em apoptose em folículos saudáveis, sendo que folículos com CGs menos responsivas aos fatores de sobrevivência ou na ausência deles, são destinados a morte por atresia.

A ausência de fatores promotores de sobrevivência ou a ativação de receptores de morte são as principais causas de apoptose e ambas contribuem para a iniciação da atresia pelas CGs, induzindo diferentes vias de sinalização intracelular que resultam no denominador comum da apoptose: a ativação da caspase-3 e subsequente fragmentação internucleossômica do DNA (Figura 3). Assim, a apoptose nas CGs ocorre predominantemente através de sinalizações dependentes de caspases, sendo que as sinalizações específicas do processo dependem do estágio de desenvolvimento do folículo e a origem de um estímulo intrínseco ou extrínseco. A expressão adequada de receptores específicos durante a foliculogênese garante a produção e secreção de fatores autócrinos e parácrinos que garantem a sobrevivência das CGs e consequentemente dos folículos, sendo que o balanço entre esses fatores de sobrevivência e sinais apoptóticos extra e intracelulares irá determinar o destino dos folículos (MATSUDA et al., 2012; REGAN et al., 2018a; STRAUSS; WILLIAMS, 2014).

**Figura 3:** Modelo esquemático de mecanismos de sobrevivência e apoptose em células da granulosa em um folículo saudável e um folículo atresico. AKT, proteína quinase B; APAF1, fator de ativação de apoptose; cFLIP, proteína celular inibitória de FLICE; Cyt c, citocromo C; DcR1, receptor decoy 1; DR4, receptor de morte 4; FADD, proteína associada a Faz com domínio de morte; FASLG, ligante de FAS; FOXO, fator de transcrição forkhead; FSH, hormônio foliculo estimulante; FSHR, receptor do hormônio foliculo estimulante; gp130, glicoproteína 130; IL-6, interleucina 6; IL-6sR, receptor de interleucina 6; IGF-I, fator de crescimento tipo insulina; IGF-IR, receptor do fator de crescimento tipo insulina; P, grupo fosfato; PI3K, fosfoinositídeo 3 quinase.



Adaptado de MATSUDA et al., 2012

### 2.3. HIPERESTIMULAÇÃO OVARIANA CONTROLADA (HOC)

A HOC representa a base dos procedimentos de reprodução assistida, pois é a etapa do tratamento que induz a produção dos oócitos que serão fertilizados *in vivo* (coito programado e

inseminação intrauterina) ou coletados, através de uma aspiração folicular, para serem fertilizados por técnicas *in vitro* (fertilização *in vitro* (FIV) e injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI). O objetivo da HOC é a obtenção de um número satisfatório de oócitos que sejam capazes de produzir embriões de boa qualidade, aumentando assim as chances de implantação e nascimentos vivos (LOBACH et al., 2017).

Os diferentes protocolos existentes de HOC baseiam-se no uso de medicamentos hormonais que irão induzir o crescimento e amadurecimento dos folículos ovarianos, sendo a indicação de cada um deles individualizada, considerando-se diversos fatores como a idade da paciente, marcadores de reserva ovariana, duração e causas de infertilidade entre outros. Assim, não há um consenso sobre qual protocolo de HOC é mais apropriado nos serviços de reprodução assistida, já que cada um deles possui seus próprios benefícios, e as respostas da utilização de um mesmo protocolo podem variar entre as pacientes (KANEKO et al., 2000).

Além de permitir a obtenção de um maior número de oócitos por ciclo, os protocolos de HOC também tornam possível o acesso a um material de grande valor para a pesquisa em medicina reprodutiva: o líquido folicular e as células da granulosa (músculos e do *cumulus oophorus*). Considerando-se a obtenção mais difícil de amostras de tecido ovariano para avaliação dos fenômenos que regulam a foliculogênese, o líquido folicular e as CGs provenientes de aspirações foliculares, e que normalmente seriam descartados nos serviços de reprodução assistida, têm sido extensivamente utilizados na pesquisa, permitindo elucidar diversos mecanismos acerca da maturação folicular e oocitária.

### 2.3.1. INTERFERÊNCIA DA APOPTOSE EM PROCEDIMENTOS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA

A probabilidade de obtenção de bons resultados em programas de reprodução assistida - ou seja, a ocorrência de gravidez e nascimento vivo – está diretamente relacionada a qualidade dos gametas utilizados para gerar os embriões. E para que seja produzido um oócito maduro e de qualidade durante a foliculogênese é necessário que o processo de crescimento e maturação folicular seja muito bem regulado. Na medicina reprodutiva, a avaliação da qualidade oocitária é restrita a técnicas não-invasivas, como análises morfológicas e morfométricas, tornando o estudo do microambiente que cerca o oócito extremamente relevante para melhor compreender

os fatores que podem contribuir para a maturação e qualidade oocitária, e conseqüentemente permitir melhorias nos protocolos de estimulação ovariana usados em tratamentos de infertilidade (ALMEIDA et al., 2018; WALLACE et al., 2012).

Por muito tempo acreditou-se que a maior ocorrência de apoptose em CGs durante tratamentos de FIV estivesse relacionado com um resultado negativo no tratamento, mas, no entanto, essa visão tem sido questionada nos últimos anos devido a existência de resultados conflitantes e muitas vezes inconclusivos na literatura. A incidência de apoptose em CGs já foi correlacionada com diversos parâmetros clínicos, e os trabalhos iniciais sobre o assunto demonstraram correlações negativas entre a ocorrência de apoptose em CGs com o número de oócitos coletados, com a qualidade dos embriões, com taxas de fertilização e gravidez, além de encontrarem maior incidência de apoptose em oócitos não fertilizados e em pacientes mais velhas (KEEFE et al., 1995; LEE et al., 2001; LEVRAN et al., 1991; LIM; TSAKOK, 1997; NAKAHARA et al., 1997; OOSTERHUIS et al., 1998; SEIFER et al., 1996). Entretanto, utilizando metodologias mais avançadas, trabalhos mais recentes não foram capazes de encontrar correlações semelhantes (CLAVERO et al., 2003; JANČAR et al., 2007; REGAN et al., 2018b). Dessa forma, ainda não há um consenso sobre a influência da apoptose sobre os possíveis resultados dos programas de reprodução assistida (ALMEIDA et al., 2018; REGAN et al., 2018a).

### 3. JUSTIFICATIVA

Nos serviços de reprodução humana assistida, o estudo do ambiente que cerca o oócito, como as células da granulosa, *cumulus oophorus* e do líquido folicular, podem fornecer pistas importantes sobre a qualidade do mesmo, já que a avaliação direta do oócito é muito limitada pela necessidade de submetê-lo apenas a técnicas não invasivas (tais como análise morfológica e morfométrica) a fim de preservá-lo. Portanto, buscam-se indicadores da qualidade funcional do oócito no líquido folicular e nas células da granulosa que o circundam com o objetivo de melhorar os protocolos de estimulação ovariana, e as taxas de gravidez das pacientes em tratamento. Podemos observar na literatura que não há consenso sobre a ocorrência da apoptose nas células da granulosa humana e sua relação com a foliculogênese induzida nos protocolos de HOC, e seu impacto na quantidade de folículos ovarianos, quantidade de oócitos

recuperados, maturação e qualidade dos oócitos recuperados, qualidade embrionária e taxas de gravidez. Portanto, o presente trabalho justifica-se pela necessidade de mais pesquisas que contribuam para elucidar a relevância e os impactos da apoptose em células da granulosa humana nos desfechos dos protocolos de HOC no tratamento da infertilidade.

#### 4. HIPÓTESE

Um maior índice de apoptose nas células da granulosa de pacientes submetidas a HOC pode estar associado a uma menor quantidade de folículos ovarianos, menor quantidade de oócitos coletados, assim como menor quantidade de oócitos maduros.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o significado clínico da expressão de marcadores da apoptose nas células da granulosa provenientes da punção folicular de mulheres submetidas a hiperestimulação ovariana controlada (HOC).

### 5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Correlacionar a expressão gênica de BAX, BCL2, CASPASE8 e CASPASE3, e proteica de pró caspase-3, caspase-3 clivada em células da granulosa com a resposta à indução da ovulação pelas pacientes, avaliada por meio dos seguintes parâmetros:

- Contagem de folículos antrais ao ultrassonografia;
- Protocolo de hiperestimulação ovariana controlada;
- Quantidade de oócitos coletados;
- Quantidade de oócitos maduros obtidos e de oócitos fertilizados;
- Quantidade de embriões viáveis.

- Correlacionar a expressão gênica de BAX, BCL2, CASPASE8 e CASPASE3 com a expressão proteica de pró caspase-3, caspase-3 clivada em células da granulosa.

## 6. MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.1. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob o parecer de número 1.979.648 (Anexo A).

### 6.2. O EXPERIMENTO

Trata-se de um estudo prospectivo, comparativo, envolvendo a coleta de líquido folicular e de células da granulosa humana. Todas as pacientes convidadas a participarem da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B) antes da inclusão no estudo.

### 6.3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram consideradas elegíveis para participar do estudo todas as pacientes admitidas para a realização de congelamento de oócitos, fertilização in vitro (FIV) e injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI). Foram incluídos os dados de pacientes admitidas para o tratamento de infertilidade em uma clínica particular de Belo Horizonte, MG, que foram submetidas ao mesmo protocolo de hiperestimulação 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 a desistência e revogação do consentimento da paciente em participar da pesquisa, em quaisquer etapas do trabalho, e pacientes positivas para doenças infectocontagiosas.

### 6.4. HIPERESTIMULAÇÃO OVARIANA CONTROLADA, ASPIRAÇÃO DE FOLÍCULOS E FERTILIZAÇÃO IN VITRO

As pacientes participantes desse estudo, passaram previamente por hiperestimulação ovariana controlada (HOC), conforme Protocolo Antagonista do serviço já padronizado pela clínica de reprodução particular, realizado por colaboradores nesse estudo.

Para tal procedimento, é realizado o ultrassom basal no 1º ou 2º dia da menstruação com objetivo de comprovar a ausência de cistos ovarianos. Em seguida, administra-se a

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) de acordo com avaliação clínica de cada paciente. A critério clínico, opta-se pela associação do Letrozol, na dosagem de 2,5 a 5 mg ao dia, durante 5 dias, iniciado entre o primeiro e o terceiro dia do ciclo. O primeiro ultrassom é realizado no 5º/6º dia da estimulação e, confirmada a presença de pelo menos 1 folículo com mais de 13 mm 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. Segundo avaliação médica, opta-se substituir o hCG pelo GnRHa para a maturação oocitária, havendo risco para o desenvolvimento da Síndrome de Hiperestimulação Ovariana. Nesses casos, todos os embriões são criopreservados e não há transferência de embriões. A punção ovariana para coleta dos oócitos é realizada 34 a 36 horas após a administração de hCG/GnRHa.

A aspiração dos folículos é feita utilizando uma agulha de aspiração folicular de calibre 17 conectada a uma sonda de ultrassom transvaginal com uma pressão negativa de 100 mm Hg cerca de 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 sêmen 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 pela confirmação da 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 do serviço. É administrado progesterona por via vaginal na dose de 600mg/dia para suporte de fase lútea desde o dia da transferência de embriões até a confirmação da gravidez, com  $\beta$ -hCG sérico acima de 25 U, duas semanas após a transferência.

## **6.5. PARÂMETROS CLÍNICOS**

Para realizar a correlação da expressão de caspase-3 e de outros marcadores apoptóticos com os parâmetros clínicos e resultados da HOC, foram coletadas junto à clínica de reprodução particular as seguintes informações clínicas das pacientes avaliadas:

- Idade (anos)
- Duração da infertilidade (anos)
- Número de tentativas prévias de HOC/FIV
- Contagem de folículos antrais
- Dose de gonadotrofinas utilizadas na HOC (IU)
- Duração do protocolo de HOC (dias)
- Número de oócitos coletados
- Número de oócitos maduros (MII) coletados
- Proporção de oócitos maduros (%)
- Número de oócitos fertilizados
- Taxa de fertilização (%)
- Número de embriões viáveis
- Número de embriões transferidos

Todos esses parâmetros foram correlacionados com os resultados de expressão proteica e gênica.

## **6.6. SEPARAÇÃO DO LÍQUIDO FOLICULAR E DAS CÉLULAS DA GRANULOSA**

A separação do líquido folicular (LF) e o isolamento das células da granulosa (CG) foi feito de acordo com protocolo padronizado pelo Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, com algumas modificações (CAMPOS et al. 2012).

Após a identificação dos oócitos pela equipe de embriologia da clínica de reprodução particular, 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 todo o material foi transportado em gelo para o Laboratório do Comportamento Celular (LCC), no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da 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 com uma micropipeta de 1000  $\mu$ L e transferidos para outra placa de 100 mm contendo de 2-5 ml de 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* de CG depositados na segunda placa de petri contendo PBS foram coletados novamente com uma micropipeta de 1000  $\mu$ L e 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. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* de CG e hemácias foram ressuspendidos 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) previamente montadas em Falcons de 15 mL, 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 ressuspendidos 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. A um dos *pellets* foi adicionado 500  $\mu$ L de TRI Reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e o tubo foi congelado até o momento da extração de RNA. O segundo *pellet* foi utilizado para realização do *cellblock*.

## **6.7. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO – CELLBLOCK – DAS CÉLULAS DA GRANULOSA**

Após a separação, os *pellets* de células da granulosa passaram por fixação e desidratação para serem emblocados em parafina.

O PBS sobrenadante da última centrifugação foi descartado e pipetou-se 200 µL de álcool 80° nos *pellets*, deixando agir por 1 min; acrescentou-se 800 µL de formol 10% tamponado e os *pellets* foram fixados por 24 horas. Após a fixação, o excesso dos sobrenadantes foi descartado e os *pellets* foram cuidadosamente coletados com uma agulha e depositados em papel filtro. Os *pellets* foram corados com duas gotas de eosina para facilitar sua identificação e os papéis filtro depositados em cassetes e devidamente identificados. Os cassetes foram reservados em álcool 70° por até duas semanas até o processamento pela técnica rotineira de inclusão em parafina, a partir do qual foram obtidas secções histológicas de 4µm, coradas então pelas técnicas de hematoxilina-eosina e imunocitoquímica para análise em microscopia óptica (PROPHET et al., 1992).

#### **6.8. IMUNOCITOQUÍMICA PARA $\alpha$ -INIBINA, PRÓ-CASPASE-3 E CASPASE-3 CLIVADA**

Foi realizada a imunocitoquímica para  $\alpha$ -inibina para identificação das CGs e, em seguida foi realizada a marcação de pró caspase-3 e caspase-3 clivada.

O procedimento imunocitoquímico foi realizado pela técnica de reação em peroxidase com identificação a partir de anticorpo secundário polimerizado (Novolink Polymer Detection System; Leica Biosystems, Newcastle upon Tyne, UK ou LSAB2 System, HRP; Dako North America; Via Real Carpinteria, CA, USA). A recuperação antigênica ocorreu em calor úmido (banho-maria a 98°C) com Target Retrieval Solution Citrate - pH 6,0 (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark). Para bloqueio da peroxidase endógena as lâminas foram incubadas por 2 tempos de 10 minutos em Peroxidase Blockade Solution (Novolink Polymer Detection System; Leica Biosystems, Newcastle upon Tyne, UK) ou por 3 tempos de 5 minutos em solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% em álcool metílico. Para bloqueio das proteínas endógenas as lâminas foram incubadas por 20 minutos em Protein Block Solution (Novolink Polymer Detection System; Leica Biosystems, Newcastle upon Tyne, UK) ou por 1 hora em leite em pó Mólico 8% em água destilada (Nestlé). Os reagentes foram aplicados pela técnica manual, sendo o tempo de incubação do anticorpo primário de 1 hora (pró caspase-3 e caspase-3 ativada) ou 16 horas ( $\alpha$ -inibina) e do cromógeno 3'3-diaminobenzidina (Liquid DAB + Substrate Chromogen system; Dako North America, Via Real Carpinteria, CA, USA), de 3 minutos. Após a incubação no

DAB os cortes foram contracorados com 3 mergulhos em hematoxilina e lavados em água corrente por 5 minutos. Na Tabela 1 estão listados fabricantes, clones, diluição e tempo de incubação de cada anticorpo utilizado. Para controle negativo foi omitida a etapa de incubação do anticorpo primário, com sua substituição pelo diluente de anticorpo (Antibody Diluent with Background Reducing Components; Dako North America; Via Real Carpinteria, CA, USA), e para controles positivos foram usados fragmentos de testículo humano ( $\alpha$ -inibina) e timo de camundongo (pró caspase-3 e caspase-3 ativada).

Para análise da expressão de alfa-inibina, foram contabilizadas as CGs com marcação positiva em 800 CGs contadas em campos aleatórios. Para análise da expressão de pró-caspase-3 e caspase-3 clivada, foram contabilizadas as CGs com marcação positiva em 500 CGs contadas em campos aleatórios.

**Tabela 1:** Anticorpos primários, fabricantes e padronização utilizadas no estudo imunocitoquímico.

	Fabricante	Clone	Diluição	Bloqueio peroxidase	Bloqueio proteína	Anticorpo secundário
<b>Alfa-inibina</b>	Abcam	Monoclonal	1:100	Novolink	Novolink	Novolink
<b>Pró-caspase-3</b>	Neomarkers	RB-1197-P	1:400	3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Leite em pó 8%	Novolink
<b>Caspase-3 clivada</b>	Cell Signaling	Asp175	1:100	3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Leite em pó 8%	LSAB2

## 6.9. EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL E TRANSCRIÇÃO REVERSA

A expressão dos genes-alvo para apoptose (Caspase-3, Caspase-8, Bcl-2, Bax e S26) foi avaliada por PCR em tempo real após a extração de RNA total das células da granulosa.

Para a extração do RNA total o *pellet* das CG coletadas foi ressuspensão em 500  $\mu$ L de TRI Reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), utilizando-se o protocolo do fabricante sem modificações. Ao término do protocolo, o RNA total foi ressuspensão em 20  $\mu$ L de água *diethylpyrocarbonate* (H<sub>2</sub>O 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). Em

seguida, alíquotas contendo 1000 ng de RNA total foram tratadas com DNase I *Amplification grade* (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), com o objetivo de eliminar uma possível contaminação por DNA genômico. Após o tratamento com DNase as amostras de RNA foram requantificadas no *NanoDrop Lite*.

A síntese do cDNA foi realizada utilizando-se o kit SuperScript® III *First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen®), seguindo o protocolo do fabricante sem modificações.

## 6.10. OLIGONUCLEOTÍDEOS ESPECÍFICOS

Os *primers* (oligonucleotídeos) iniciadores designados para a transcrição reversa e PCR em tempo real dos genes BAX, BCL2, CASP8 e CASP3 foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Reprodução Humana do HC/UFMG (LRH-HC/UFMG), e portanto, já eram

Primers	Sequência de nucleotídeos (5'-3')	Tamanho do fragmento	Número de acesso do GenBank
<b>S26Forw</b>	TGTGCTTCCCAAGCTGTATGTGAAG	75	NM_001029.3
<b>S26Rev</b>	CGATTCCTGACTACTTTGCTGTGAA		
<b>BAXForw</b>	TCTACTTTGCCAGCAAAGTGGTGC	80	NM_138765.3
<b>BAXRev</b>	TGTCCAGCCCATGATGGTTCTGAT		
<b>BCL2Forw</b>	ATTTCCCTGCATCTCATGCCAAGGG	90	NM_000657
<b>BCL2Rev</b>	TGTGCTTTGCATTCTTGGACGAGG		
<b>CASP8Forw</b>	GGAAGCAAGAACCCATCAAG	92	XM_006712791.1
<b>CASP8Rev</b>	CTTCAGGAAGGACAGATTGC		
<b>CASP3Forw</b>	GTAGATGGTTTGAGCCTGAG	106	NM_032991.2
<b>CASP3Rev</b>	CCAGTGCGTATGGAGAAATG		

padronizados, e suas características e condições publicados pelo grupo de pesquisa (LOBACH et al., 2017). 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 S26. A sequência dos primers e suas características estão listados na Tabela 2.

**Tabela 2:** Sequência dos *Primers* utilizados na PCR em tempo real.

## 6.11. REALIZAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL

As amostras de cDNA resultantes da RT foram submetidas à PCR em tempo real realizada no equipamento de sistema de PCR em tempo real ABI PRISM® 7500 *Sequence Detection System* (Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB/UFMG),

utilizando-se o Kit SYBR *Green*® PCR Master Mix Kit (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). As amostras foram aplicadas em placas de 384 poços (ABI PRISM® 384-Well Optical Reaction Plate with Barcode, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), em duplicata, no volume final de reação de 10 µL.

### 6.12. COLETA E ANÁLISE DE DADOS

Os dados foram inseridos em uma planilha eletrônica e analisados de forma anônima, preservando sigilo sobre a identidade das pacientes, as quais foram identificadas na planilha apenas pelo número da paciente. O recrutamento das pacientes ocorreu de março a setembro de 2018.

### 6.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados clínicos e de expressão gênica e protéica foram avaliados para normalidade pelo teste de Kruskal Wallis e expressos como média  $\pm$  desvio padrão (para as variáveis de distribuição normal) ou mediana  $\pm$  intervalo interquartil.

Os resultados do RT-PCR foram obtidos como *cycle threshold* (Ct) e normalizados para  $\Delta$ Ct, que é o Ct do gene alvo menos o Ct do gene referência, S26. Visando a realização dos cálculos, as pacientes foram segmentadas em dois grupos: baixa proporção de oócitos maduros coletados (pacientes com menos de 80% de oócitos maduros do total coletado) e alta proporção de oócitos maduros coletados (pacientes com 80% ou mais de oócitos maduros do total coletado) (MANDELBAUM, 2000). A expressão relativa foi calculada usando a fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , onde  $\Delta\Delta Ct$  é o  $\Delta$ Ct das amostras de ambos os grupos menos o  $\Delta$ Ct médio do grupo baixa proporção de oócitos maduros coletados (LIVAK E SCHMITTGEN, 2001). Os grupos e os dados clínicos foram comparados usando as médias (distribuição normal) ou medianas dos valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

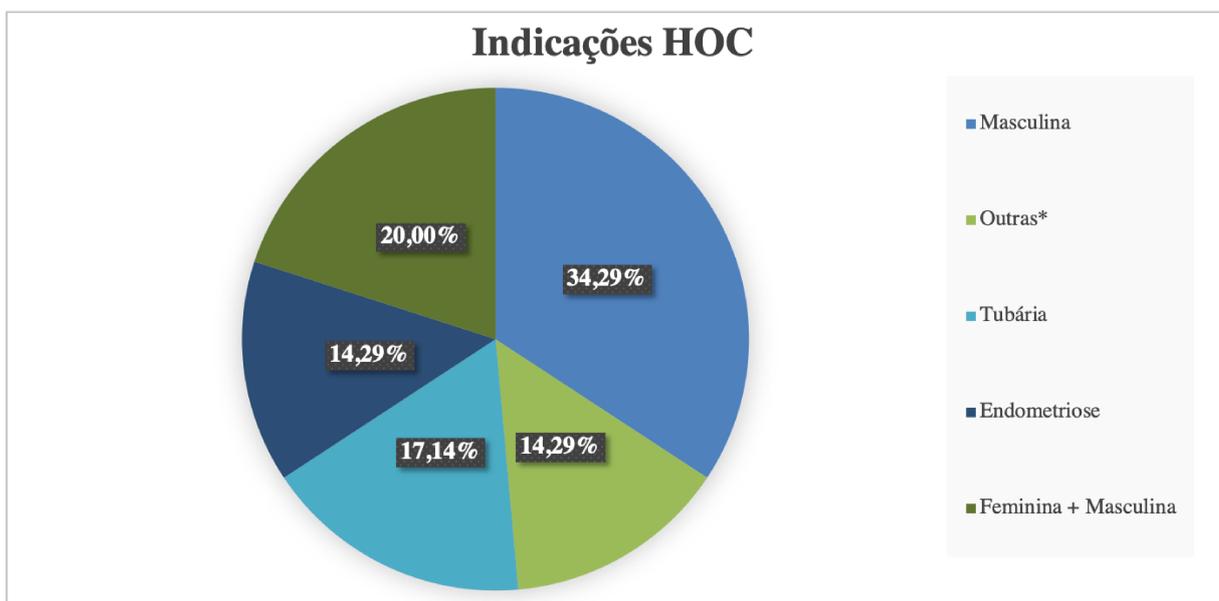
Comparações entre grupos foram realizadas por Teste T ou teste de Mann-Whitney, a correlação das variáveis foi avaliada pelo coeficiente *r* de Spearman, variáveis pareadas foram comparadas pelo teste de Wilcoxon e foi considerado significativo um  $p < 0.05$ .

## 7. RESULTADOS

### 7.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DAS PACIENTES EM ESTUDO, PARÂMETROS DA HOC E RESULTADOS DA FIV

Foram analisados os dados de 35 pacientes no período entre março e setembro de 2018. O protocolo utilizado para cada paciente foi individualizado de acordo com os parâmetros clínicos e a causa de infertilidade/indicação da HOC (Figura 4).

**Figura 4:** Gráfico de distribuição das indicações de hiperestimulação ovariana controlada entre as pacientes em estudo (n = 35). \* Casais homoafetivos, preservação de fertilidade e produção independente



As características clínicas das pacientes, parâmetros da HOC e resultados da FIV estão reunidos na Tabela 3.

	<b>Mediana</b>	<b>Quartis (Q1 - Q3)</b>
<b>Idade (anos)</b>	35	33 - 40
<b>Duração da infertilidade (anos)</b>	3	1 - 6
<b>Número de tentativas de FIV prévias</b>	0	0 - 1
<b>Contagem de folículos antrais</b>	19	8 - 27
<b>Dose de gonadotrofinas (IU)</b>	2288	1050 - 3169
<b>Duração do protocolo de HOC (dias)</b>	10	9 - 11
<b>Número de oócitos coletados</b>	13	8 - 22
<b>Número de oócitos maduros (MII) coletados</b>	11	5 - 18
<b>Proporção de oócitos maduros (%)</b>	79	67 - 91
<b>Número de oócitos fertilizados</b>	7	5 - 12
<b>Taxa de fertilização (%)</b>	83	48 - 100
<b>Número de embriões viáveis</b>	6	4 - 10
<b>Número de embriões transferidos</b>	2	2 - 3

**Tabela 3:** Características clínicas das pacientes participantes do estudo e resultados da hiperestimulação ovariana controlada e dos procedimentos de fertilização *in vitro* realizados ( $n = 35$ ).

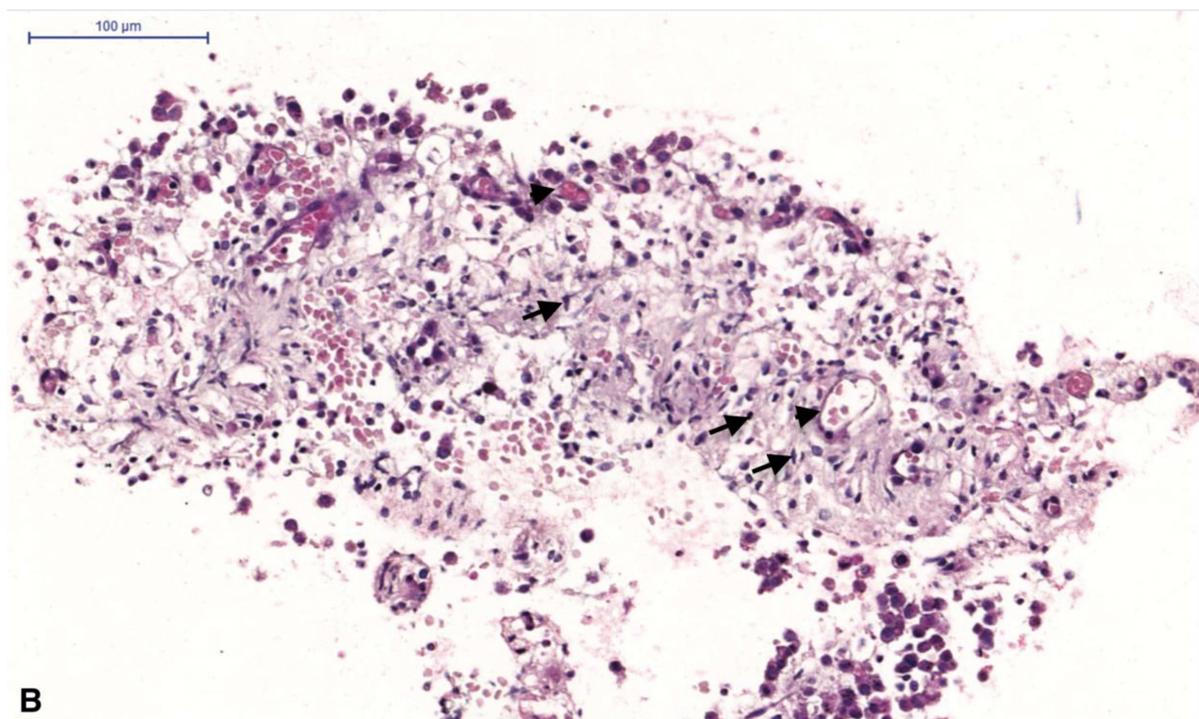
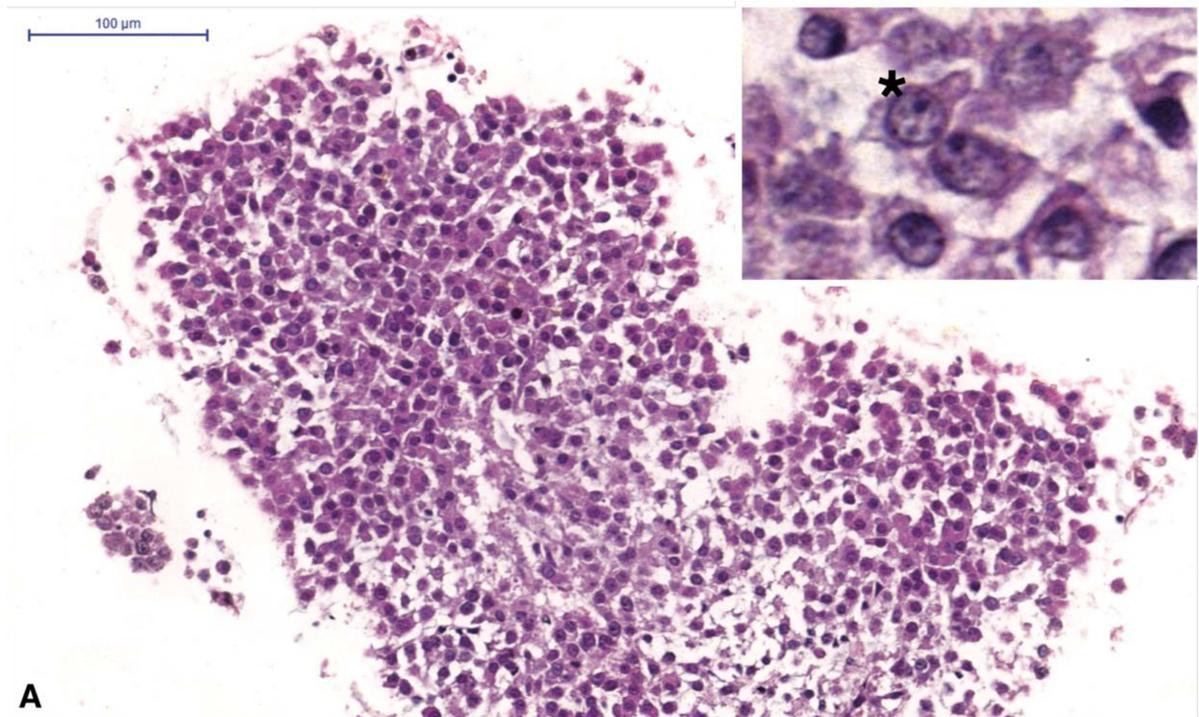
## **7.2. CELLBLOCK DAS CÉLULAS DA GRANULOSA E IMUNOCITOQUÍMICA PARA $\alpha$ -INIBINA**

A partir da análise das amostras das pacientes processadas pela metodologia de *Cellblock* e coradas em HE, foram observados agregados celulares de diferentes tamanhos, ora entremeados por filamentos finos eosinofílicos semelhantes a fibrina e conjuntos de hemácias, algumas vezes podendo ser observados polimorfonucleares. Hemácias livres e outros componentes sanguíneos são correspondentes ao sangue proveniente da punção ovariana, que é aspirado juntamente com o líquido folicular, células da granulosa e o oócito. Algumas amostras de líquido folicular possuíam maiores quantidades de sangue, devido a necessidade de repuncionar os folículos durante a coleta e, mesmo com sucessivas lavagens de PBS e a utilização do gradiente de separação Histopaque durante o processo de separação das CGs, pudemos observar que não foi

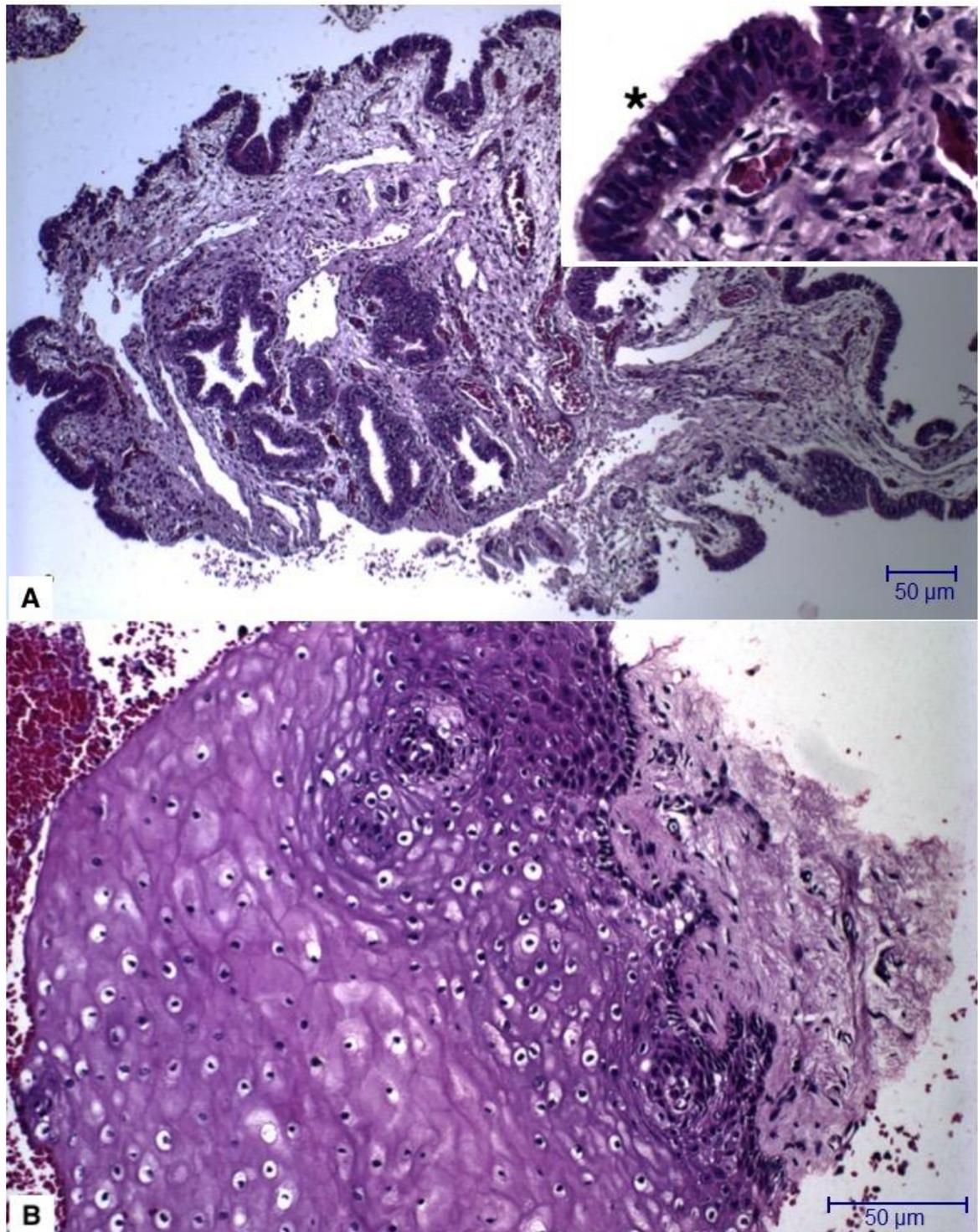
possível retirar as hemácias totalmente. Entretanto, a presença de hemácias em menor ou maior quantidade não afetou a realização da análise das amostras.

Observando os agregados celulares foi possível identificar dois tipos celulares distintos, morfológicamente compatíveis com as CGs e células estromais ovarianas. As CGs foram predominantemente identificadas como células maiores e globosas, de citoplasma amplo e eosinofílico, por vezes de aspecto granular, núcleo também globoso, amplo e basofílico, alguns com nucléolos evidentes (Figura 5A). Algumas amostras apresentaram CGs de citoplasma mais retraído e núcleos mais condensados, o que não prejudicou a identificação das mesmas por se tratarem de células de maior tamanho quando comparadas aos outros tipos celulares presentes. As CGs se encontravam aderidas umas as outras em grupos de tamanhos variáveis, denominados *clusters*, ou em alguns casos isoladas e rodeadas por hemácias. Por vezes, os *clusters* de CGs estavam associados a fragmentos de estroma ovariano, onde foi possível visualizar células pequenas e fusiformes e com núcleos mais condensados, identificadas como células estromais ovarianas, envoltas por filamentos finos eosinofílicos compatíveis com fibrina, constituindo uma matriz extracelular frouxa, além de pequenos capilares preenchidos por hemácias (Figura 5B). Além disso, também foram observadas em algumas amostras a presença de fragmentos compatíveis com epitélio vaginal e de tuba uterina (Figura 6).

**Figura 5:** Fotomicrografia de cellblock contendo células da granulosa humanas. Hematoxilina e Eosina. **(A)** Cluster de células da granulosa, apresentando citoplasma amplo e eosinofílico, por vezes de aspecto granular, núcleo também globoso, amplo e basofílico, 20X. No insert, observa-se em maior aumento a morfologia das células da granulosa, algumas com nucléolos evidentes (asteriscos), 100X. **(B)** Fragmento de estroma ovariano, contendo células estromais pequenas e fusiformes e com núcleos mais condensados (setas), envoltas por filamentos finos eosinofílicos compatíveis com fibrina, constituindo uma matriz extracelular frouxa, sendo possível observar a presença de alguns capilares (cabeça de seta). São visíveis células da granulosa esparsas na periferia do fragmento e presença multifocal de hemácias, 20X.

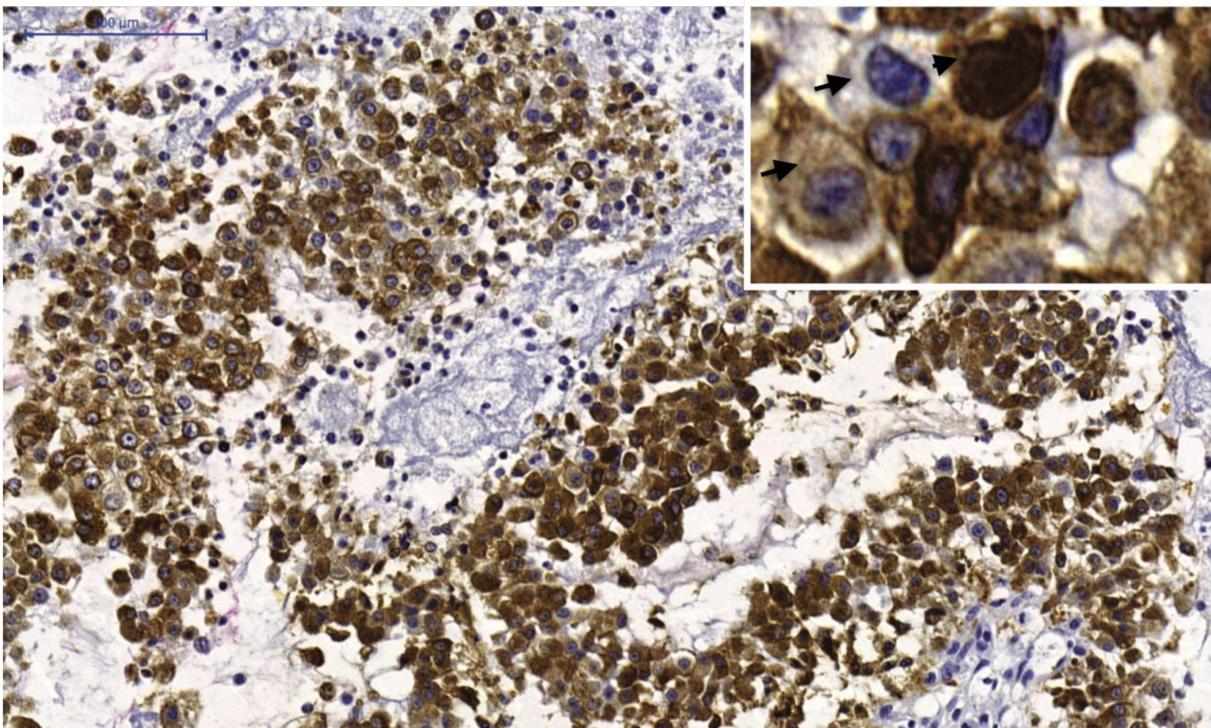


**Figura 6:** Fotomicrografia de *cellblock* contendo fragmentos de epitélio de tuba uterina e epitélio vaginal. Hematoxilina e Eosina. (A) Fragmento de tuba uterina, identificado pela presença de células cilíndricas ciliadas, 10X. No *insert*, observa-se em maior aumento a morfologia das células ciliadas (asterisco), 40X. (B) Fragmento de epitélio vaginal, identificado pela presença de epitélio escamoso estratificado não-queratinizado, 20X.



Com o objetivo de se confirmar a morfologia das CGs, foi realizada a imunocitoquímica para identificação da subunidade  $\alpha$  da inibina (MCCLUGGAGE, 2001). A  $\alpha$ -inibina foi identificada no citoplasma das CGs, em todas as suas variações morfológicas encontradas nas amostras, confirmando os achados morfológicos da coloração de HE (Figura 7). Foi interessante observar que as CGs apresentaram diferentes padrões de marcação para  $\alpha$ -inibina, sendo observadas células de marcação fraca, moderada e forte, além de variação no número de células marcadas entre as amostras. Essas variações de marcação de  $\alpha$ -inibina nas CGs foram computadas e correlacionadas com as variáveis em análise no estudo, havendo uma correlação positiva entre o número de CGs marcadas para  $\alpha$ -inibina e a proporção de oócitos maduros coletados (Anexo C).

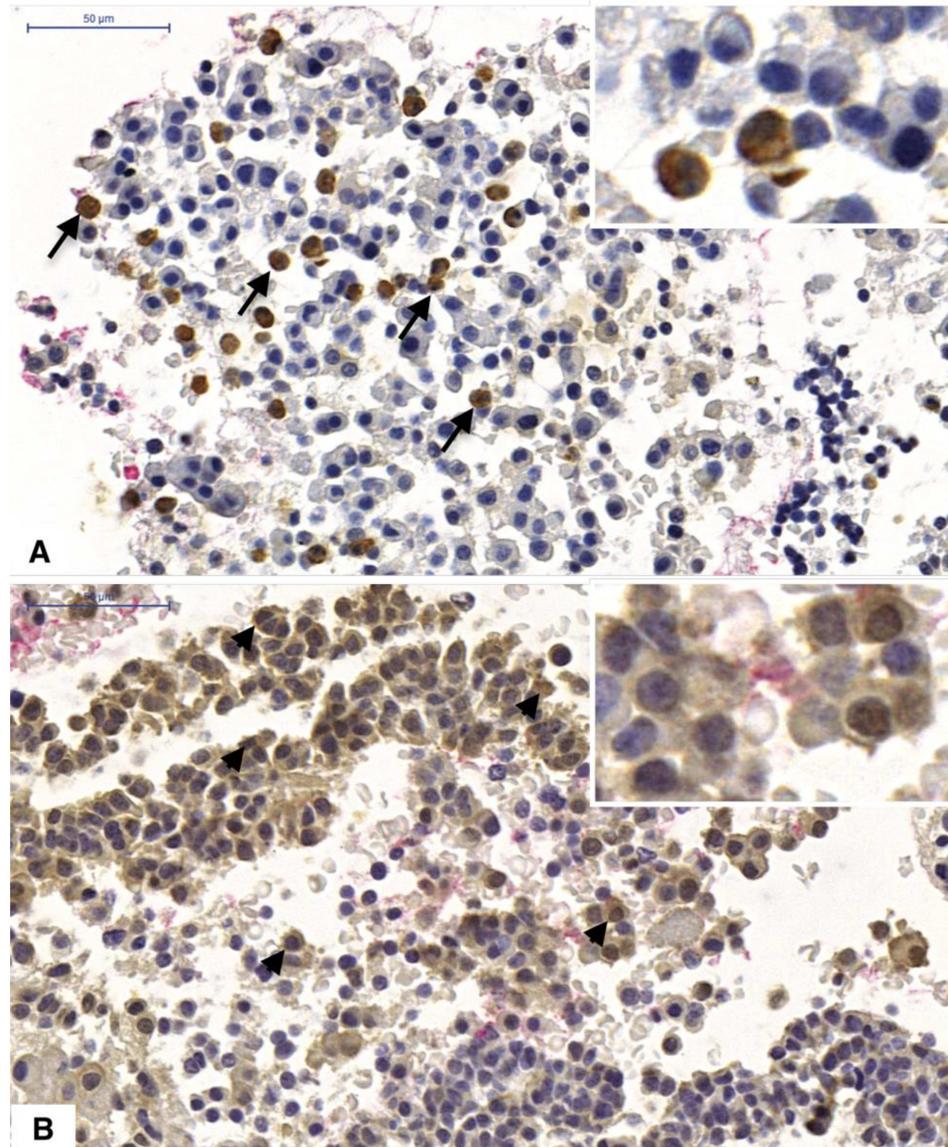
**Figura 7:** Fotomicrografia de *cellblock* de aspirado folicular humano. Imunocitoquímica para  $\alpha$ -inibina. Células da granulosa com imunomarcção citoplasmática e por vezes nuclear para  $\alpha$ -inibina, entremeadas por estruturas semelhantes a estroma ovariano, 40X. No *insert* é possível observar a morfologia compatível com células da granulosa, com marcação fraca/moderada (setas) e forte (cabeça de seta) para  $\alpha$ -inibina, 100X.



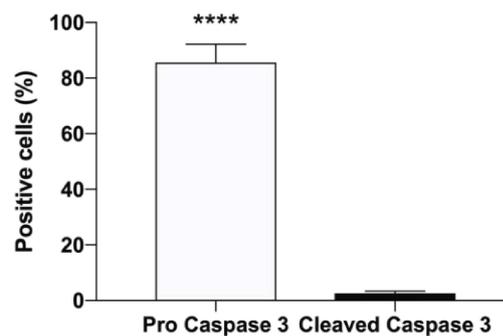
### **7.3. EXPRESSÃO IMUNOCITOQUÍMICA DE CASPASE-3 CLIVADA E PRÓ-CASPASE-3 EM CÉLULAS DA GRANULOSA E SUA CORRELAÇÃO CLÍNICA**

A expressão de caspase-3 clivada e pró-caspase-3 em CGs foi observada em todas as amostras analisadas, com um padrão de marcação predominantemente citoplasmático e por vezes nuclear (Figura 8A e 8B), sendo a mediana de CGs positivas para caspase-3 clivada de 2.6% (intervalo interquartil 1.6% - 3.4%) e para pró-caspase-3 de 85.6% (intervalo interquartil 67% - 92.2%), apresentando diferença estatística entre os marcadores com  $p < 0.0001$  (Figura 8C). Além disso, quando comparados com os parâmetros clínicos da HOC, foram encontradas correlações positivas entre o número de CGs marcadas para pró-caspase-3 e a proporção de oócitos maduros coletados ( $r = 0.427$ ;  $p < 0.05$ ), e o número de células marcadas para caspase-3 clivada e a duração do protocolo de indução de ovulação ( $r = 0.445$ ;  $p < 0.05$ ) (Figura 9).

**Figura 8:** Marcação imunocitoquímica de caspase-3 clivada e pró-caspase-3 em células da granulosa humana. (A) Fotomicrografia de *cellblock* de aspirado folicular humano. Imunocitoquímica para caspase-3 clivada. Células da granulosa com imunomarcção citoplasmática e por vezes nuclear para Caspase-3 clivada (setas), 40X. Detalhe da marcação no *insert*, 100X. (B) Fotomicrografia de *cellblock* de aspirado folicular humano. Imunocitoquímica para pró-caspase-3. Células da granulosa com imunomarcção citoplasmática e por vezes nuclear para pró-caspase-3 (cabeça de seta), 40X. Detalhe da marcação no *insert*, 100X. (C) Variação no número de células da

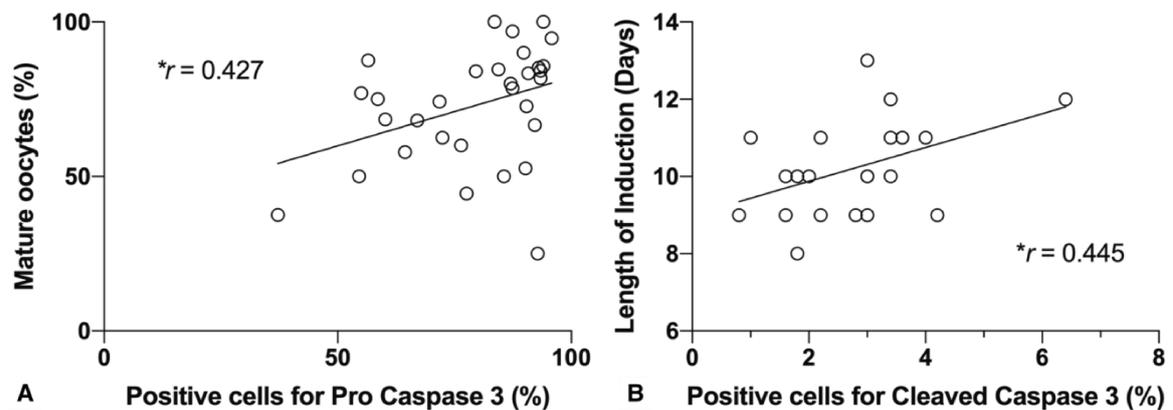


C



granulosa positivas para pró-caspase-3 e caspase-3 clivada. Dados expressos em mediana e intervalo interquartil.  $p < 0.0001$ .

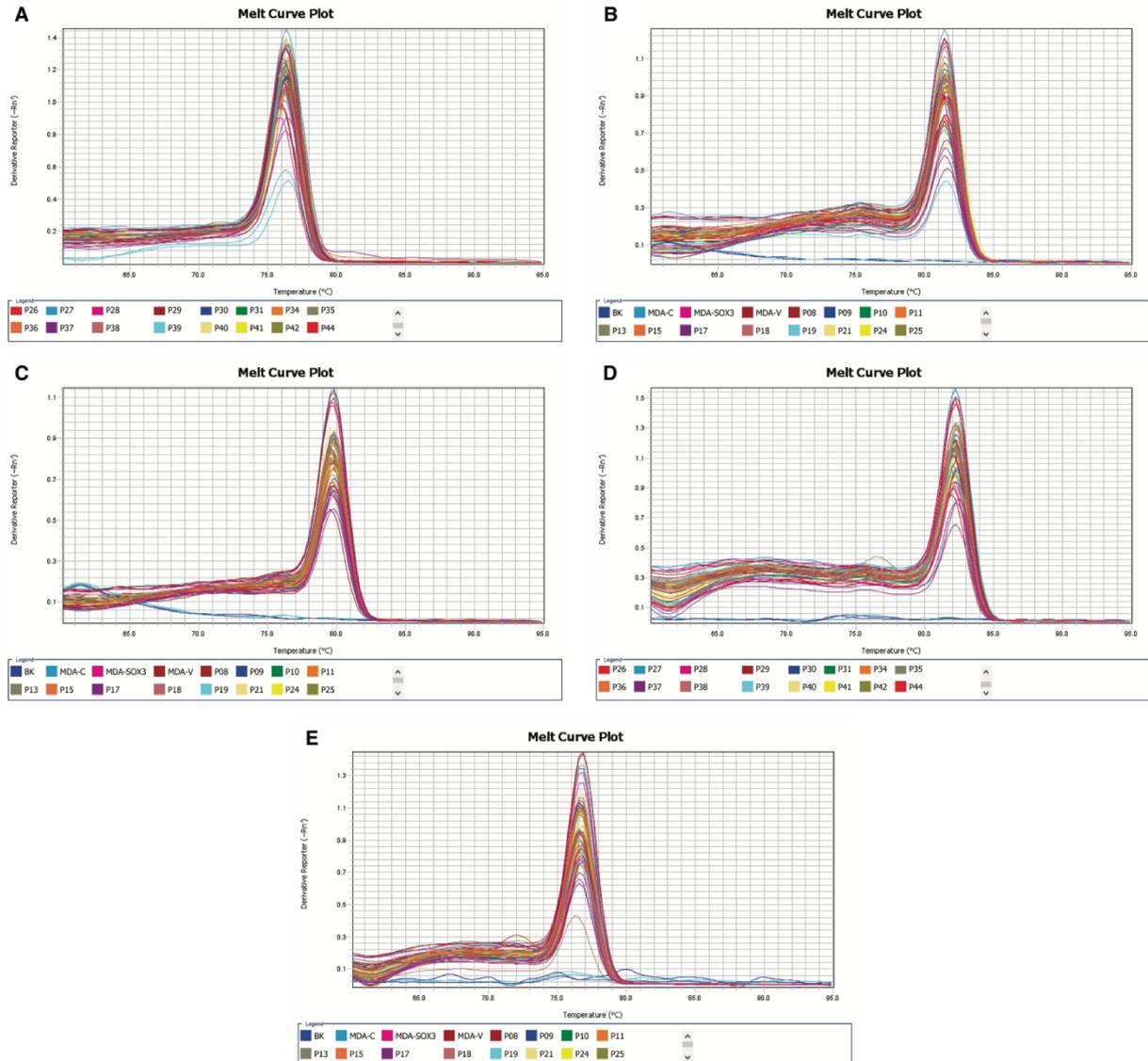
**Figura 9:** Relação da expressão de caspase-3 com parâmetros clínicos das pacientes que passaram pelo protocolo de HOC. (A) Correlação positiva entre expressão de pró-caspase-3 e a proporção de oócitos maduros coletados. (B) Correlação positiva entre expressão de caspase-3 clivada e a duração do protocolo de indução de ovulação.  $r$  = coeficiente de correlação de Spearman;  $*p < 0.05$ .



#### 7.4. EXPRESSÃO DE GENES-ALVO PARA APOPTOSE E SUA CORRELAÇÃO CLÍNICA

Foram analisadas 27 das 35 amostras coletadas, devido a baixa concentração de material genético coletado, o que impossibilitaria a realização dos ensaios. Todas as amostras analisadas demonstraram-se homogêneas para 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, e confiabilidade dos resultados das curvas de amplificação (Figura 10).

**Figura 10:** Curvas de *Melting* com picos únicos, comprovando a especificidade dos fragmentos dos genes alvos amplificados. (A) S26; (B) BAX; (C) BCL2; (D) CASP3; (E) CASP8.



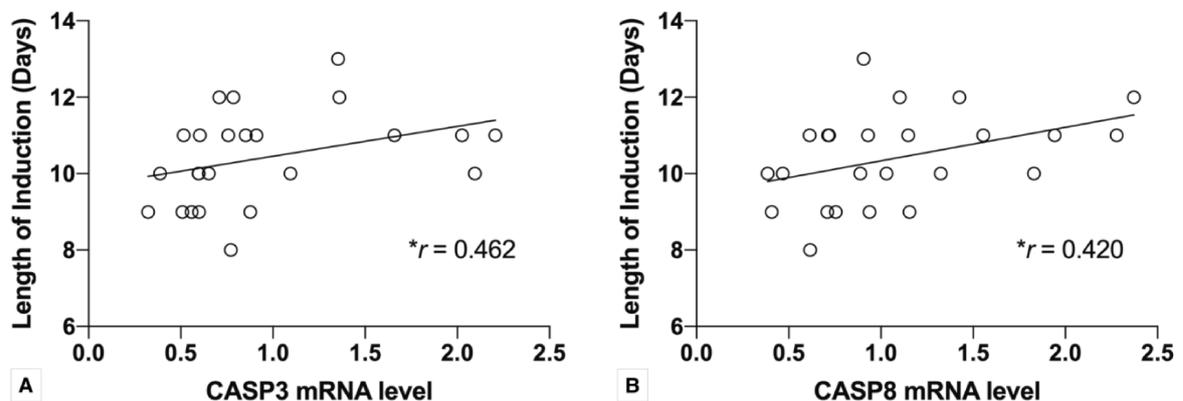
Foi observada a expressão do gene-referência S26 e dos genes-alvo BAX, BCL2, CASP3 e CASP8 nas amostras avaliadas e os valores da expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) para cada gene-alvo estão listados na Tabela 4.

**Tabela 4:** Expressão relativa dos genes envolvidos nas vias da apoptose em amostras de pacientes submetidas a HOC.

	Mediana $2^{-\Delta\Delta Ct}$	Quartis (Q1 - Q3)
<b>BAX</b>	0.9043	0.6699 – 1.397
<b>BCL2</b>	0.8933	0.6466 – 1.194
<b>CASP3</b>	0.7581	0.5900 – 1.354
<b>CASP8</b>	0.9295	0.6154 – 1.425

A expressão relativa dos genes-alvo foi então correlacionada com os parâmetros clínicos das pacientes, havendo correlações positivas entre a expressão relativa de CASP3 e CASP8 e a duração do protocolo de indução de ovulação ( $r = 0.462$ ,  $p < 0.05$ ;  $r = 0.420$ ,  $p < 0.05$  respectivamente) (Figura 11). Não foram encontradas correlações com os outros parâmetros clínicos avaliados.

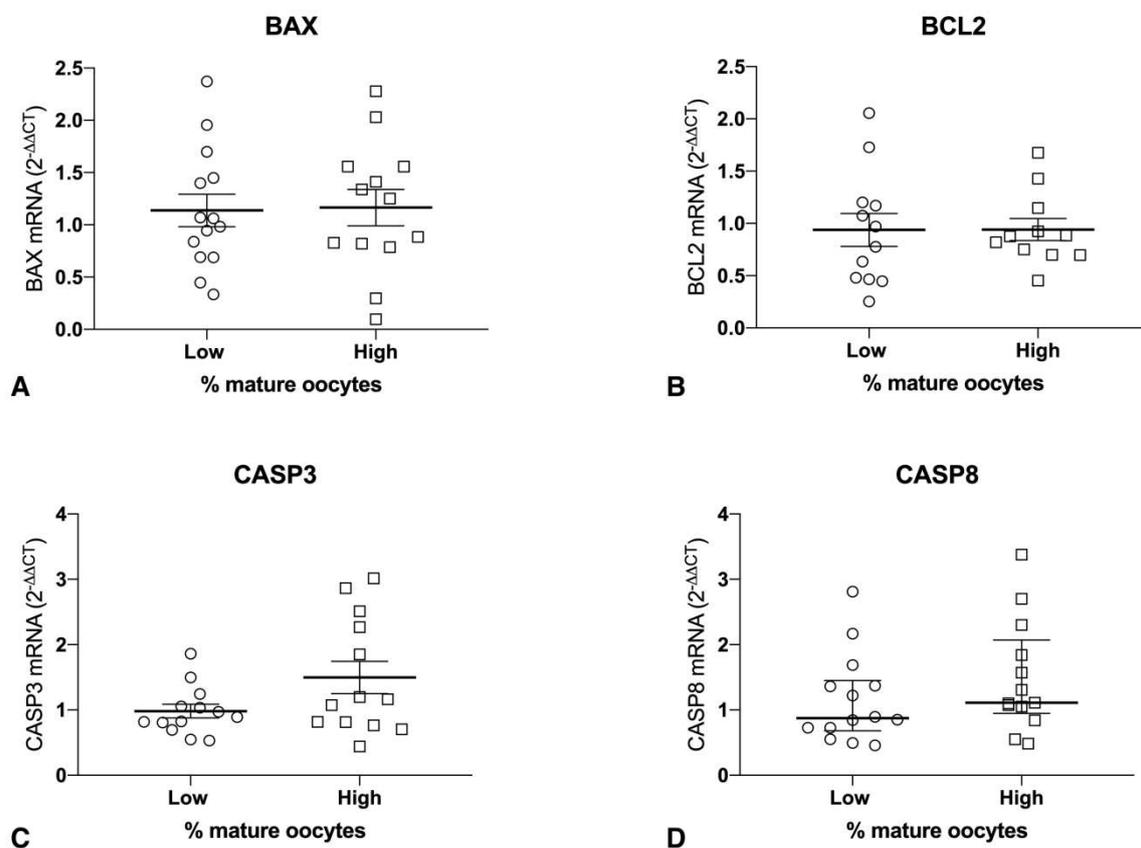
**Figura 11:** Correlação da expressão genica de caspase-3 (A) e caspase-8 (B) com a duração do protocolo de indução de ovulação.  $r$  = coeficiente de correlação de Sperman;  $*p < 0.05$ .



Buscando avaliar se é possível prever a capacidade de maturação oocitária a partir da expressão dos genes-alvo em estudo, as pacientes foram segmentadas segundo a sua proporção de oócitos maduros coletados, onde pacientes com menos de 80% de oócitos maduros coletados eram consideradas como baixa proporção de oócitos maduros, e pacientes com mais de 80% de oócitos maduros coletados foram consideradas como alta proporção de oócitos maduros (MANDELBAUM, 2000). A partir dessa segmentação, não foi observada diferença na

expressão dos genes-alvo entre os grupos de baixa proporção de oócitos maduros e alta proporção de oócitos maduros (BAX:  $p = 0.909$ ; BCL2:  $p = 0.984$ ; CASP3:  $p = 0.072$ ; CASP8:  $p = 0.302$ ), sugerindo não haver relação entre a expressão desses genes e a ocorrência de maturação oocitária (Figura 12).

**Figura 12:** Expressão relativa dos genes-alvo da apoptose BAX (A), BCL2 (B), CASP3 (C) e CASP8 (D) em pacientes com baixa proporção de oócitos maduros coletados (menos de 80%) e pacientes com alta proporção de oócitos maduros coletados (mais de 80%). Dados comparados por Teste  $t$  não pareado e expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (BAX, BCL2 e CASP3), ou pelo teste de Mann-Whitney e expressos como mediana e intervalo interquartil (CASP8). Não foram encontrados valores de  $p$  significativos.



## 8. DISCUSSÃO

O desenvolvimento e a maturação de oócitos de boa qualidade são essenciais para a obtenção de embriões saudáveis, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Logo, um estudo detalhado sobre os mecanismos que interferem nesses processos, principalmente em procedimentos de reprodução assistida, é extremamente importante para a melhoria das chances de gravidez das pacientes.

Neste estudo foram avaliadas amostras de 35 pacientes submetidas ao protocolo de HOC por diferentes causas. Estima-se que aproximadamente 35% dos casos de infertilidade sejam por causas femininas, 30% por causas masculinas e 20% uma combinação de fatores femininos e masculinos no casal (LEAVER, 2016), sendo nossa amostra considerada representativa dentro destes parâmetros. Considerando-se que algumas causas de infertilidade, como a endometriose, reduzem as chances de bons resultados na FIV (SANCHEZ et al., 2017), durante as análises houve a tentativa de se correlacionar os dados de expressão gênica e protéica com as causas de infertilidade das pacientes. No entanto, devido a um número insuficiente de pacientes representantes de cada grupo/causa de infertilidade, essa avaliação não foi possível, sendo então necessário que se amplie no futuro o número de pacientes em estudo para investigar essas correlações.

O processamento histológico das células obtidas no aspirado folicular pela técnica de *cellblock* permitiu a avaliação e identificação morfológica das células da granulosa, e, portanto, uma investigação da expressão das proteínas através da imunocitoquímica diretamente nas células da granulosa, células alvo do presente estudo. Adicionalmente, a técnica de *cellblock* permitiu a identificação de outros tipos celulares, além das CGs, no líquido folicular aspirado, tais como pequenos fragmentos de tecido/estroma ovariano, assim como epitélio vaginal e de tuba uterina. Esses fragmentos contendo outros tipos celulares além das CGs são resultado da manipulação da agulha de aspiração durante a punção folicular, e a presença destes nas amostras só foi constatada após a realização da coloração por HE. Através da marcação imunocitoquímica para  $\alpha$ -inibina foi realizada a caracterização morfológica e identificação precisa das CGs, garantindo que os dados referentes à expressão das proteínas-alvo do estudo são referentes somente às CGs. O *cellblock* demonstrou então ser uma técnica vantajosa frente às metodologias que não permitem essa identificação exata das células analisadas, como por exemplo a citometria de fluxo das células aspiradas, assim como a extração de material genético (RNA e DNA) de

aspirado folicular por RT-PCR. Esses achados evidenciam a importância de se fazer uma identificação precisa das CGs em amostras obtidas por *pool* de aspirados foliculares, já que há a possibilidade da presença de outros tipos celulares “contaminando” o material a ser estudado.

A apoptose ocorre de forma fisiológica no ovário, e é controlada primariamente pelas CGs. Seja desencadeada pela menor responsividade dos folículos aos hormônios e fatores de crescimento, levando à atresia, ou pela ovulação e participando do processo de formação do corpo lúteo, a apoptose é um fenômeno presente em todas as fases do desenvolvimento folicular (MATSUDA et al., 2012). Por ser um intermediário comum a todas as vias apoptóticas, a caspase-3 é extremamente importante principalmente por se encontrar no fim da cascata de sinalização e, quando ativada/clivada é translocada para o núcleo e induz a fragmentação do DNA. Muitos trabalhos associam maiores taxas de apoptose das CGs com piores resultados de programas de FIV devido a uma queda na qualidade oocitária (GLAMOČLIJA et al., 2005; KANEKO et al., 2000; KEEFE et al., 1995; LEE et al., 2001; LEVRAN et al., 1991; LIM; TSAKOK, 1997; LOBACH et al., 2017; NAKAHARA et al., 1997; OOSTERHUIS et al., 1998; SEIFER et al., 1996; SUH et al., 2002). A correlação positiva entre a maior marcação de caspase-3 clivada e a duração do protocolo de indução de ovulação corrobora essa vertente, sugerindo que pacientes que responderam pior ao tratamento e permaneceram no protocolo de indução de ovulação por mais tempo apresentaram CGs com maiores taxas de ativação de caspase-3. Essa visão concorda com trabalhos já realizados pelo grupo de pesquisa, que demonstrou a maior expressão gênica de caspase-3 em pacientes com maior duração do protocolo de HOC e que fizeram uso de doses maiores de gonadotrofinas (LOBACH et al., 2017). No entanto, ainda não há um consenso sobre a real interferência da apoptose na qualidade dos oócitos produzidos durante os ciclos de reprodução assistida (ALMEIDA et al., 2018; REGAN et al., 2018a). Adicionalmente, é necessário elucidar se a maior taxa de caspase-3 clivada e apoptose das células da granulosa está relacionada a necessidade de um tempo de indução de ovulação maior, ou se o tempo maior do protocolo de indução de ovulação é responsável pela clivagem da caspase-3 e ativação da apoptose nas células da granulosa das pacientes submetidas a HOC.

A ausência de consenso com relação a apoptose em CG e sua relação com o desfecho das pacientes em propedêutica de infertilidade pode ser justificada pela grande variação de metodologias utilizadas nos diferentes estudos, tais como número de pacientes avaliadas e

diferentes protocolos de HOC utilizados, além de uma ausência de caracterização mais fidedigna do tipo celular estudado (ALMEIDA et al., 2018). Entretanto, a utilização de tecnologias mais recentes leva a crer que os níveis de apoptose nas CGs refletem o estágio proliferativo do folículo, já que a apoptose e sua via de sinalização dependem do estágio de desenvolvimento folicular e da origem da ativação extrínseca ou intrínseca (REGAN et al., 2018a).

De fato, parte das ocorrências de apoptose levam à diferenciação terminal das CGs na superfície antral dos folículos, sem induzir atresia folicular (VAN WEZEL et al., 1999). Os resultados encontrados nesse estudo sobre a alta taxa de marcação de pró-caspase-3 nas CGs e sua correlação direta com a proporção de oócitos maduros coletados podem estar relacionados a atividade fisiológica durante o desenvolvimento folicular, refletindo uma preparação das CGs para iniciar o processo de atresia ou de ovulação, dando origem ao corpo lúteo. Isso sugere uma preservação das vias bioquímicas normais das CGs que, ao expressarem constitutivamente altos níveis de pró-caspase-3 tornam-se aptas a adequar-se às variações na expressão de receptores hormonais e de fatores de crescimento que regulam a seleção dos folículos para ovulação ou atresia.

Nossos dados de expressão gênica demonstraram haver uma correlação positiva entre a duração do protocolo de indução de ovulação e a expressão de CASP3 e CASP8. Esses achados corroboram a correlação encontrada entre a expressão de caspase-3 clivada e a duração do protocolo de indução de ovulação, e ambos concordam com a vertente de uma possível influência negativa da apoptose nos resultados de procedimentos de reprodução assistida, especificamente com Lobach et al. (2017), sugerindo que a maior ocorrência de apoptose durante a HOC está associada a uma pior resposta da paciente ao tratamento, consequentemente aumentando o tempo de duração do mesmo. Não foram encontradas, porém, correlações quanto ao número de oócitos coletados ou maturidade dos oócitos e qualidade dos embriões avaliados no processo, o que também está de acordo com trabalhos que sugerem não haver relação entre apoptose e os resultados de procedimentos de reprodução assistida (CLAVERO et al., 2003; JANČAR et al., 2007).

A partir desses resultados e, apesar de haver a indicação de uma relação entre a expressão gênica de caspase-3 e caspase-8 e a resposta das pacientes à HOC, propomos que a avaliação da

ocorrência de apoptose somente a partir de dados de expressão gênica deve ser efetuada com cautela. Havendo encontrado uma diferença tão grande entre as expressões da pró-caspase-3 e a sua forma ativada (caspase-3 clivada), sugere-se que a expressão dos genes-alvo para apoptose não refletem de fato o perfil apoptótico dos folículos, já que a presença de mRNA da CASP3 está melhor relacionada a ocorrência da pró-caspase e não da sua forma ativa/clivada. Além disso, a identificação de outros tipos celulares além das CGs nas amostras de *cellblock* indica que os dados de expressão gênica encontrados podem não corresponder em sua totalidade à expressão gênica das CGs e, conseqüentemente, relativizam a influência da expressão desses genes no processo de crescimento e maturação oocitária. Essa ausência de uma caracterização precisa do tipo celular avaliado juntamente com a grande variação no número de pacientes avaliadas, os protocolos de HOC utilizados e diferentes metodologias aplicadas para avaliação da ocorrência de apoptose, pode estar contribuindo para a discordância quanto ao papel desse fenômeno nos resultados de procedimentos de reprodução assistida (REGAN et al., 2018a). Dessa forma, a utilização de metodologias mais refinadas para se caracterizar e avaliar somente as CGs é de extrema importância, já que o principal método para se coletar as CGs (punção ovariana e aspiração do líquido folicular) abre margem para a presença de “contaminantes”, como células do sangue periférico, do estroma ovariano e até mesmo fragmentos de epitélio vaginal e tuba uterina.

## 9. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste estudo, e nas condições metodológicas empregadas, podemos concluir que:

- Pacientes submetidas ao protocolo de indução de ovulação por mais tempo apresentaram uma maior expressão de caspase-3 clivada nas células da granulosa, porém esse resultado não deixa claro qual dessas condições é a determinante nesse processo.
- Há maior expressão de pró-caspase-3 em células da granulosa de pacientes com maior número de oócitos maduros coletados, sugerindo uma expressão constitutiva/fisiológica dessa pró-enzima além da preservação das funções e vias moleculares nas células da granulosa dessas pacientes.

- A expressão de CASP3 e CASP8 parece estar correlacionada a um maior tempo de indução de ovulação, porém, devido a presença de outros tipos celulares nas amostras de aspirado folicular essa expressão pode não corresponder em sua totalidade às células da granulosa.
- Não foram encontradas correlações entre a expressão de BAX e BCL2 e os parâmetros clínicos analisados.
- Não houve correlação entre a expressão dos genes alvo e a expressão protéica de pró-caspase-3 e caspase-3 clivada em células da granulosa.

## 10. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A estimulação ovariana é a base das técnicas de reprodução assistida e tratamentos de infertilidade, sendo que uma boa foliculogênese produzindo um número adequado de oócitos de boa qualidade aumenta significativamente as chances de gravidez e nascidos vivos (TEMPLETON; MORRIS; PARSLOW, 1996). A interação entre o microambiente folicular e o oócito é o que irá ditar sua maturação e qualidade e, dada a importância das células da granulosa nesse processo, avaliar suas funções é extremamente importante para se melhorar os resultados dos tratamentos de infertilidade (MANDELBAUM, 2000).

Por muito tempo o papel da apoptose nas técnicas de fertilização *in vitro* tem sido discutido, acreditando-se que o aumento dos níveis de apoptose teria um efeito negativo nos resultados dos procedimentos. Porém, com o advento de tecnologias e metodologias mais avançadas, como a citometria de fluxo, essa ideia começou a ser questionada (ALMEIDA et al., 2018). A apoptose está presente durante todas as fases da foliculogênese, intermediada principalmente pelas células da granulosa durante o processo de atresia folicular, ovulação, formação do corpo lúteo e futuramente sua regressão (RUSSELL; ROBKER, 2007), e acredita-se que os níveis de apoptose das células da granulosa seja um indicativo do perfil proliferativo do folículo, e não da qualidade oocitária (REGAN et al., 2018a). De fato, a expressão de pró-caspase-3 em células da granulosa e sua correlação direta com uma maior porcentagem de oócitos maduros sugere uma presença constitutiva da pró-enzima durante a foliculogênese, e possivelmente a preservação das vias bioquímicas normais das células da granulosa, indicando assim um bom funcionamento dessas células no processo.

Apesar de terem sido observadas correlações positivas entre a expressão de mRNA de CASP3, CASP8 com a duração do protocolo de indução da ovulação, esses dados não suportam totalmente a hipótese do papel deletério da apoptose na HOC. Devido a presença de outros tipos celulares nas amostras, confirmada pelos cortes histológicos provenientes do *cellblock*, não se pode dizer que nossos dados de expressão gênica sejam reflexo real do perfil apoptótico das células da granulosa, pois inclui a expressão gênica de epitélio e estroma contidos na amostra. Além disso, devido à presença de mRNA de CASP3 não estar relacionada a ativação da caspase-3, a utilização da expressão gênica da caspase-3 deixa de ser um bom marcador para apoptose, pelo menos no contexto do presente trabalho.

Quanto à correlação entre a caspase-3 clivada e a duração do protocolo de indução da ovulação, nossos dados não deixam explícita a relação entre a ativação da caspase-3 e o tempo de estimulação ovariana. É necessário avaliar se o aumento da ativação da caspase-3, e consequentemente um maior índice de apoptose nas células da granulosa, torna necessário um tempo prolongado de estimulação ovariana, ou se a exposição a um protocolo de estimulação mais longo induz a clivagem da caspase-3, aumentando assim a taxa de apoptose nas células da granulosa.

Em síntese, o presente trabalho corrobora a importância da caspase-3 e do papel da apoptose na fisiologia folicular, podendo assim interferir no resultado final de protocolos de tratamento de infertilidade. Ressaltamos a necessidade de se ampliar o estudo, abrangendo um maior número de pacientes, possivelmente avaliando amostras de pacientes não submetidas a HOC (ciclos ovarianos normais). É importante ainda se investigar possíveis funções da pró-caspase-3 nas células da granulosa além da apoptose, além de se realizar estudos mais aprofundados sobre os mecanismos moleculares da influência dos protocolos de HOC na apoptose de células da granulosa e uma caracterização mais precisa sobre a presença e o perfil das células da granulosa nas amostras avaliadas nas pesquisas realizadas com *pool* de células dos folículos ovarianos através da punção folicular.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, J. M. Ways of dying: Multiple pathways to apoptosis. **Genes and Development**, v. 17, n. 20, p. 2481–2495, 2003.
- 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, 2018.
- AMELIO, M. D. ; CAVALLUCCI, V.; CECCONI, F. Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death. **Cell Death and Differentiation**, v. 17, 2009.
- BAUMGARTEN, S. C.; STOCCO, C. **Granulosa Cells**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier, 2018. v. 2
- CAMPOS, C. O. et al. Preventing Microbial Contamination during Long-Term In Vitro Culture of Human Granulosa-Lutein Cells: An Ultrastructural Analysis. **ISRN obstetrics and gynecology**, v. 2012, n. January 2017, p. 152781, 2012.
- CHANG, H. Y.; YANG, X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 64, n. 4, p. 821–46, 2000.
- CHAUBE, S. K. et al. Estradiol protects clomiphene citrate-induced apoptosis in ovarian follicular cells and ovulated cumulus-oocyte complexes. **Fertility and Sterility**, v. 84, n. SUPPL. 2, p. 1163–1172, 2005.
- CHAUBE, S. K. et al. Clomiphene Citrate Induces ROS-Mediated Apoptosis in Mammalian Oocytes. **Open Journal of Apoptosis**, v. 3, n. July, p. 52–58, 2014.
- CHUN, S. Y. et al. Hormonal Regulation of Apoptosis in Early Antral Follicles: Follicle-Stimulating Hormone as a Major Survival Factor. **Endocrinology**, 1996.
- CLAVERO, A. et al. Apoptosis in human granulosa cells after induction of ovulation in women participating in an intracytoplasmic sperm injection program. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 110, n. 2, p. 181–185, 2003.
- 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.
- ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007.
- FRANTZ, N. et al. Origem , Crescimento , Degeneração e Maturação In Vitro do Oócito. **Femina**, v. 34, p. 537–543, 2006.
- GLAMOČLIJA, V. et al. Apoptosis and active caspase-3 expression in human granulosa cells. **Fertility and Sterility**, v. 83, n. 2, p. 426–431, 2005.
- GRÜTTER, M. G. Caspases: Key players in programmed cell death. **Current Opinion in**

**Structural Biology**, v. 10, n. 6, p. 649–655, 2000.

HENNET, M. L.; COMBELLES, C. M. H. The antral follicle: A microenvironment for oocyte differentiation. **International Journal of Developmental Biology**, v. 56, n. 10–12, p. 819–831, 2012.

HIRSHFIELD, A. N. Development of Follicles in the Mammalian Ovary. **International Review of Cytology**, 1991.

IGNEY, F. H.; KRAMMER, P. H. Death and Anti-Death: Tumour Resistance To Apoptosis. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 4, p. 277–288, 2002.

JANČAR, N. et al. Effect of apoptosis and reactive oxygen species production in human granulosa cells on oocyte fertilization and blastocyst development. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 24, n. 2–3, p. 91–97, 2007.

JURISICOVA, A.; ACTON, B. M. Deadly decisions: The role of genes regulating programmed cell death in human preimplantation embryo development. **Reproduction**, v. 128, n. 3, p. 281–291, 2004.

KANEKO, T. et al. Effects of controlled ovarian hyperstimulation on oocyte quality in terms of the incidence of apoptotic granulosa cells. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, 2000.

KEEFE, D. L. et al. Mitochondrial deoxyribonucleic acid deletions in oocytes and reproductive aging in women. **Fertility and Sterility**, v. 64, n. 3, p. 577–583, 1 set. 1995.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British journal of cancer**, v. 26, n. 4, p. 239–57, ago. 1972.

KHALILZADEH, B. et al. Advances in nanomaterial based optical biosensing and bioimaging of apoptosis via caspase-3 activity: a review. **Microchimica Acta**, v. 185, n. 9, 2018.

LEAVER, R. B. Male infertility: an overview of causes and treatment options. **British journal of nursing**, v. 25, n. 18, p. S35–S40, 13 out. 2016.

LEE, K. S. et al. Cumulus cells apoptosis as an indicator to predict the quality of oocytes and the outcome of IVF-ET. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, 2001.

LEVRAN, D. et al. Aging of endometrium and oocytes: observations on conception and abortion rates in an egg donation model. **Fertility and Sterility**, v. 56, n. 6, p. 1091–1094, 1 dez. 1991.

LI, J.; YUAN, J. Caspases in apoptosis and beyond. **Oncogene**, v. 27, n. 48, p. 6194–206, 2008.

LIM, A. S. T.; TSAKOK, M. F. H. Age-related decline in fertility: A link to degenerative

oocytes? **Fertility and Sterility**, v. 68, n. 2, p. 265–271, 1 ago. 1997.

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**, 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**, 2017.

MANDELBAUM, J. **Oocytes** **Human Reproduction**, 2000.

MARKSTRÖM, E. et al. **Survival factors regulating ovarian apoptosis - Dependence on follicle differentiation** **Reproduction**, 2002.

MATSUDA, F. et al. Follicular Growth and Atresia in Mammalian Ovaries: Regulation by Survival and Death of Granulosa Cells. **J. Reprod. Dev**, 2012.

MCCLUGGAGE, W. G. Value of inhibin staining in gynecological pathology. **International Journal of Gynecological Pathology**, v. 20, n. 1, p. 79–85, 2001.

MIGNOTTE, B.; VAYSSIERE, J. Review Mitochondria and apoptosis. **Eur. J. Biochem**, v. 252, p. 1–15, 1998.

NAKAHARA, K. et al. The incidence of apoptotic bodies in membrana granulosa can predict prognosis of ova from patients participating in in vitro fertilization programs. **Fertility and Sterility**, 1997.

OOSTERHUIS, G. J. E. et al. Apoptotic cell death in human granulosa-lutein cells: A possible indicator of in vitro fertilization outcome. **Fertility and Sterility**, 1998.

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

REGAN, S. L. P. et al. Granulosa cell apoptosis in the ovarian follicle-A changing view. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, n. MAR, p. 1–10, 2018a.

REGAN, S. L. P. et al. The effect of ovarian reserve and receptor signalling on granulosa cell apoptosis during human follicle development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 2018b.

RIEDL, S. J.; SHI, Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 11, p. 897–907, 1 nov. 2004.

RUSSELL, D. L.; ROBKER, R. L. Molecular mechanisms of ovulation: Co-ordination through the cumulus complex. **Human Reproduction Update**, v. 13, n. 3, p. 289–312, 2007.

SANCHEZ, A. M. et al. Is the oocyte quality affected by endometriosis? A review of the literature. **Journal of Ovarian Research**, v. 10, n. 1, p. 43, 12 dez. 2017.

- SEIFER, D. B. et al. Apoptosis as a function of ovarian reserve in women undergoing in vitro fertilization. **Fertility and Sterility**, v. 66, n. 4, p. 593–598, 1 out. 1996.
- SHALINI, S. et al. Old, new and emerging functions of caspases. 2015.
- STRAUSS, J. F.; WILLIAMS, C. J. **Ovarian Life Cycle**. Seventh Ed ed. [s.l.] Elsevier, 2014.
- SUH, C. S. et al. Prognostic implication of apoptosis in human luteinized granulosa cells during IVF-ET. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, 2002.
- TEMPLETON, A.; MORRIS, J. K.; PARSLow, W. Factors that affect outcome of in-vitro fertilisation treatment. **Lancet**, 1996.
- VAN WEZEL, I. L. et al. Evidence for alternative pathways of granulosa cell death in healthy and slightly atretic bovine antral follicles. **Endocrinology**, 1999.
- 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.
- WALTERS, J. et al. A constitutively active and uninhibitable caspase-3 zymogen efficiently induces apoptosis. **Biochem. J**, v. 424, p. 335–345, 2009.
- WANG, C.; YOULE, R. J. The Role of Mitochondria in Apoptosis. **Annual Review of Genetics**, v. 43, n. 1, p. 95–118, dez. 2009.
- YANG, M. Y.; RAJAMAHENDRAN, R. Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced in vitro. **Animal Reproduction Science**, v. 70, n. 3–4, p. 159–169, 2002.
- ZHANG, Y. et al. Research trends and perspectives of male infertility: a bibliometric analysis of 20 years of scientific literature. **Andrology**, 2016.

## ANEXOS

### ANEXO A

#### APROVAÇÃO DO PROJETO PELO CEP - PLATAFORMA BRASIL

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 foliculo 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 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

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 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

**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 substanciado 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 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

**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 B**

### **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)

## ANEXO C

### APOPTOSIS-RELATED GENES AND ALPHA-INHIBIN EXPRESSION IN HUMAN GRANULOSA CELLS

Almeida, C.P.<sup>1</sup>; Ferreira, E.<sup>1</sup>; Silveira, C.O.<sup>2</sup>; Veloso, E.S.<sup>1</sup>; Carvalho, B.A.<sup>1</sup>; Coelho, S.S.<sup>1</sup>; Reis, F.M.<sup>2</sup>; Del Puerto, H.L.<sup>1</sup>.

1- Department of General Pathology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

2 - Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

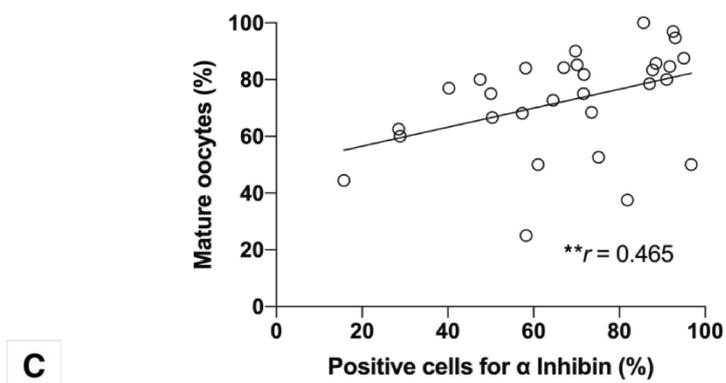
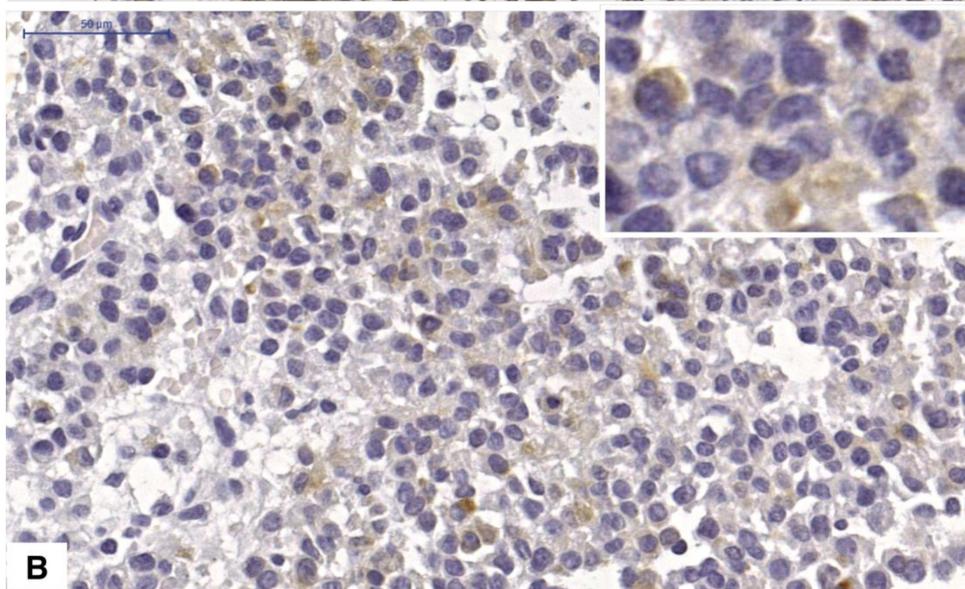
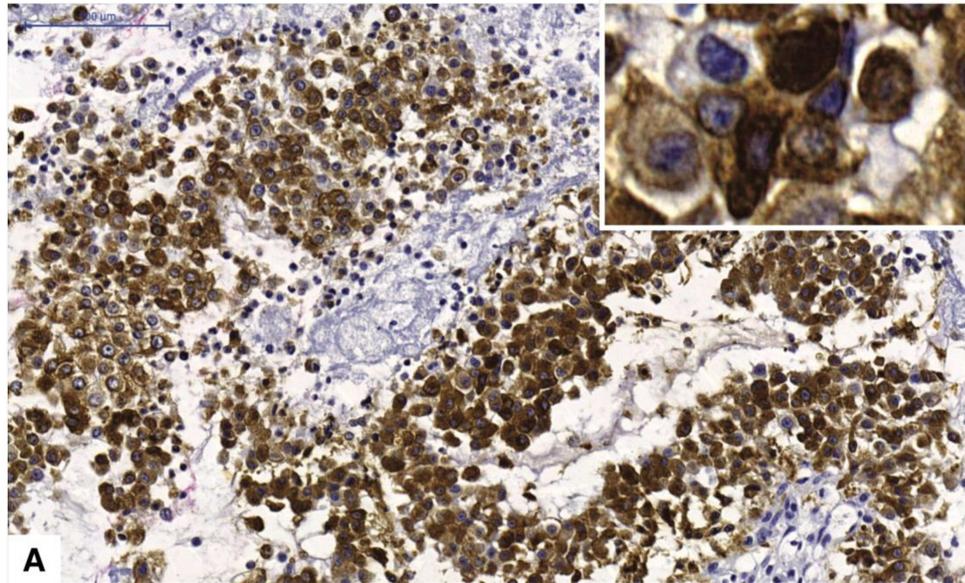
**Introduction:** The development of quality oocytes relies on their interactions with surrounding granulosa cells. Granulosa cells are essential in normal follicular maturation process since they produce growth factors, steroidal and non-steroidal hormones such as Inhibins, and an increase of granulosa cells apoptosis appears to have a negative effect on conception and pregnancy rates in IVF programs. Thus, this study evaluated the clinical correlation of apoptosis-related genes and alpha-inhibin expression in human granulosa cells of patients undergoing controlled ovarian stimulation.

**Materials and Methods:** We enrolled prospectively 30 IVF patients referred to a private clinic for couple infertility treatment and women fertility preservation. Luteinized granulosa cells were isolated from the follicular fluid, their expression of alpha-inhibin was assessed by immunostaining of cellblock sections, and gene expression of apoptosis inducers (CASP3, CASP8, and BAX) and inhibitor (BCL2) was quantified by real-time PCR.

**Results:** Alpha inhibin expression in granulosa cells had a positive correlation with the number of mature oocytes ( $p < 0.005$ ). No associations were found with CASP3, CASP8, BAX or BCL2 gene expression and patients clinical parameters. These preliminary findings agree with previous data, suggesting that increased alpha inhibin expression in human granulosa cells is associated with a better oocyte maturation.

RESUMO APRESENTADO NO VI ENCONTRO DE PATOLOGIA DA UFMG – 12 A 14  
DE NOVEMBRO DE 2018

**Figure:** Differential expression of alpha inhibin in human granulosa cells from follicular fluid. Immunostaining of cellblock sections of human granulosa cells, showing a strong (A) and weak (B) expression of alpha inhibin. (C) Direct correlation of alpha inhibin positive granulosa cells and the number of mature oocytes collected.  $r =$  Spearman's rank correlation coefficient;  $**p < 0.005$ .





## ANEXO D

Cell Biology International ISSN 1065-6995  
doi: 10.1002/cbin.11036

## REVIEW

## Clinical correlation of apoptosis in human granulosa cells—A review

Camila P. Almeida<sup>1</sup>, Márcia C.F. Ferreira<sup>2</sup>, Camila O. Silveira<sup>2</sup>, Jacira R. Campos<sup>3</sup>, Isabella T. Borges<sup>1</sup>, Pedro G. Baeta<sup>1</sup>, Felipe H.S. Silva<sup>1</sup>, Fernando M. Reis<sup>2\*</sup> and Helen L. Del Puerto<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of General Pathology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>2</sup> Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>3</sup> Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

### Abstract

The quality of oocytes depends on interactions with surrounding granulosa cells. Granulosa cells are essential in normal follicular maturation process since they produce steroidal hormones and growth factors, and they play a crucial role in follicular atresia. The success in reproductive biology and medicine depends on reliable assessment of oocyte and embryo viability which presently mainly bases on oocyte and embryo morphology. Recent investigations have tried to establish an evaluation system for oocyte quality and to predict outcome of in vitro fertilization (IVF) based on the incidence of granulosa cells and cumulus cells apoptosis. Apoptosis of granulosa cells seems to have a negative effect on conception and pregnancy rates in IVF programs. Thus, in this review we present a brief outline of clinical correlation of apoptosis in human granulosa cells and cumulus cells, and its influence upon oocyte quality and IVF outcome. Taken together, understanding the influence of granulosa cell apoptosis on oocyte quality and maturity as well as on embryo health may ultimately allow scientists and clinicians to harness better protocols of ovarian stimulation for infertility treatments.

**Keywords:** apoptosis; follicular fluid; human granulosa cells; IVF

### Introduction

Granulosa cells (GCs) have a major role in oocyte development and maturation, both in vivo and in vitro, interacting with the oocyte and creating a highly specialized microenvironment through the release of steroidal hormones and growth factors. Thereby, any alterations in the metabolism and apoptosis rate of GCs may interfere negatively in the quality of the oocyte and resulting embryo, consequently reducing the pregnancy chances (Hennet and Combelles, 2012).

Apoptosis is a cell death triggered by physiological stimulation. It is essential for controlling tissue homeostasis and is important for elimination of defective cells without evoking inflammatory response. However, apoptosis can be involved in pathological processes: resistance to apoptosis is related to neoplasms and excessive apoptosis is a

pathogenetic mechanism of neurodegenerative diseases, organ and tissue atrophy and hypoplasia (Favaloro et al., 2012).

In the ovary, apoptosis occurs as a physiological process, being highly important throughout the phases of follicular development, especially in ovarian follicular atresia and luteal regression (Jančar et al., 2007). Apoptosis is present at all phases of ovarian development, involving mainly the oocyte during fetal life, and later the GCs in follicular growth during adult life. At each menstrual cycle, a number of primordial follicles are recruited and start to grow, but usually only one will ovulate—the rest of the follicles undergo atresia through apoptosis (Figure 1). Eventually, about 450 follicles will ovulate in the course of a woman's reproductive life whereas 250,000 become atretic, evidencing the major role of apoptosis in folliculogenesis (Russell and Robker, 2007).

\*Corresponding author: e-mail: fmreis@ufmg.br

**Abbreviations:** BCL2L11, Bcl-2-like protein 11 gene; bFGF, Basic fibroblast growth factor; COS, Controlled ovarian stimulation; EGF, Epidermal growth factor; FASLG, Fas ligand gene; FSH, Follicle-stimulating hormone; GCs, Granulosa Cells; GnRH<sub>a</sub>, Gonadotropin-releasing hormone agonist; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Hydrogen peroxide; hCG, Human chorionic gonadotropin; hMG, Human menopausal gonadotropins; ICSI, Intracytoplasmic sperm injection; IGF, Insulin-like growth factor; IL-1 $\beta$ , Interleukin-1 $\beta$ ; IL-6, Interleukin-6; IVF, In vitro fertilization; LH, Luteinizing hormone; MII, Metaphase II; ROS, Reactive oxygen species

Although atresia may occur at any phase of folliculogenesis, the antral stage is when most follicles undergo apoptosis. GCs initiate follicular atresia, being the first apoptotic cell population in atretic follicles, while growing healthy follicles do not show apoptotic GCs (Matsuda *et al.*, 2012). The number of apoptotic GCs gradually increases in atretic follicles, starting in the cells of the inner surface of the granulosa layer, which becomes highly disrupted as the process of atresia advances (Matsuda *et al.*, 2012).

There are many hormones, growth factors and cytokines involved in folliculogenesis, and their interaction and/or production by GCs will dictate the fate of the follicles. Follicle-stimulating hormone (FSH) is the main hormone that controls folliculogenesis, inducing the production of estradiol, inhibins and insulin-like growth factor (IGF)-I by GCs. Estradiol and IGF-I act like autocrine and paracrine factors, being essential to follicular growth and development—the depletion of these survival factors is related to GC loss of function and death. Besides promoting folliculogenesis, estradiol increases the expression of gonadotropin receptors and IGF-I synthesis, inhibits the expression of proapoptotic genes p53 and Bax, and also protects cells from oxidative ( $H_2O_2$ ) stress-induced apoptosis. On the other hand, IGF ensures follicular survival by increasing the dominant follicle responsiveness to gonadotropins and the estradiol secretion by GCs. All that suggests that these three factors stimulate each other's expression, amplifying their survival effect (Matsuda *et al.*, 2012).

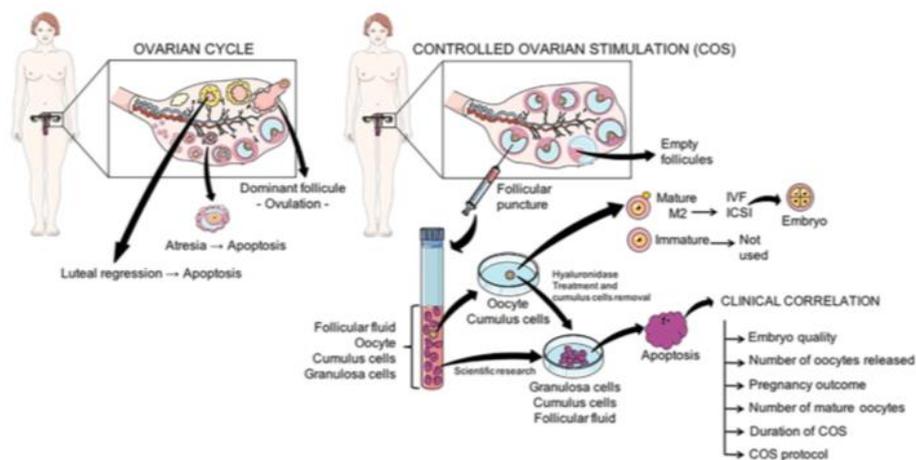
Other factors such as epidermal growth factor (EGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and

interleukin-6 (IL-6) have survival effects in GCs. Deprivation of one or more of these factors, or stimulation of death receptors leads to GC apoptosis and, ultimately, follicular atresia. In atretic follicles there is a decline of FSH, estradiol, IGF and IL-6, transactivating proapoptotic factors like FASLG and BLC2L11 in GCs. There is also an increase in death ligands-receptors expression in GC membranes, leading to the activation of apoptosis cascades (Matsuda *et al.*, 2012).

Although being a physiological process during dominant follicle selection, apoptosis in dominant follicles may interfere in ovulation and oocyte quality. Therefore, apoptosis of GCs seems to have a negative effect in pregnancy outcomes after in vitro fertilization (IVF) treatment (Jančar *et al.*, 2007).

Extrinsic factors such as DNA damage and oxidative stress can activate p53-specific signaling pathways and trigger the apoptotic cascade (Regan *et al.*, 2018a). Some diseases like endometriosis can lead to an increase in reactive oxygen species (ROS), which results in a lower number of oocytes retrieved and diminished implantation rate during IVF procedures. These outcomes seem to be related to an increase in the GC apoptotic rate, suggesting that higher levels of ROS lead to a lower quality follicle in reproductive medicine (Jančar *et al.*, 2007).

In this review, we will present a brief outline of apoptosis in human granulosa cells and cumulus cells, and discuss its effects in oocyte and embryo quality and IVF outcomes such as fertilization, implantation and pregnancy rates.



**Figure 1** Apoptosis involvement in physiological ovarian cycle. Apoptosis in COS—Clinical correlation of apoptosis in human granulosa cells and cumulus cells, and its effects in oocyte and embryo quality, and pregnancy outcome of ICSI and IVF-ET procedures.

### Methods or materials

We searched the bases Pubmed and Scopus using the terms "apoptosis," "granulosa cells," and "in vitro fertilization" and limited the search to articles in English published between 1980 and 2018. Studies eligible for inclusion were prospective cohort studies, performed in patients undergoing IVF treatment.

The following information was extracted from each study: reporting author, publication year, type of tissue/cells used, number of patients, inclusion criteria for the study, method to assess apoptosis, clinical correlations, and results.

### Results and discussion

Seven studies that fulfilled the criteria were selected and their characteristics are summarized in Table 1.

Overall, studies included small number of patients undergoing IVF and presented non-comparable outcomes. Different methods of assessment of GC apoptosis were utilized and the findings were correlated to the number of oocytes retrieved, oocyte maturation status, fertilization, implantation, and pregnancy rates. Some studies also compared GC apoptosis in different types of treatment cycle.

As shown in Table 1, apoptosis marker expression in GCs from patients undergoing IVF correlated directly with duration of controlled ovarian stimulation (COS) and inversely with the number of oocytes retrieved (Lobach *et al.*, 2017). Apoptosis was higher in unfertilized oocytes than in fertilized oocytes (Lee *et al.*, 2001), and there was lower apoptotic index in GCs of women that became pregnant with IVF compared to women that did not achieve pregnancy (Suh *et al.*, 2002). Active caspase-3 was observed in GCs from COS pre-ovulatory follicles but not in GCs of healthy dominant follicles from non-stimulated ovarian tissue (Glamoclija *et al.*, 2005). In addition, the incidence of apoptosis in mural and cumulus GCs was higher in women treated with gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRHa) than in natural cycles or cycles without GnRHa (Zhao *et al.*, 2000).

In reproductive medicine, the evaluation of oocyte quality is restricted to non-invasive techniques, such as morphometric and morphological analyses. Thus, the study of the microenvironment that surrounds the oocyte—GCs, cumulus cells and follicular fluid—and their correlation with clinical parameters is extremely important and may ultimately allow scientists and clinicians to harness better protocols of ovarian stimulation for infertility treatments (Wallace *et al.*, 2012).

Selecting embryos with high implantation potential remains one of the major goals in assisted reproduction. Follicular development and maturation are requisites to oocyte fertilization and subsequent early embryo

development, and during follicular growth, precisely at the pre-ovulatory stage, the cumulus-oocyte-complex might offer new criteria for choosing embryos with the best development ability (Russell and Robker, 2007).

Currently, high quality embryos (*i.e.*, those with better potential to implant and survive) are selected based on absence of multinucleation, timing and synchrony of the first two embryonic divisions, and a low percentage of cell fragments (Ajduk and Zernicka-Goetz, 2012). Another method for embryo selection, beyond morphological criteria, is based on the metabolic parameters of embryos in cell culture media, such as pyruvate, glucose, asparagine, glycine and leucine levels. Preimplantation genetic diagnosis has been developed to detect inherited genetic disorders, and may also be used to assess embryo quality (Ajduk and Zernicka-Goetz, 2012).

The incidence of apoptotic GCs in the follicle correlates negatively with number of oocytes recovered after stimulation for IVF (Seifer *et al.*, 1996; Nakahara *et al.*, 1997a, 1997b; Oosterhuis *et al.*, 1998). However, Clavero *et al.* (2003) evaluating the percentage of apoptosis in GC in pre-ovulatory follicles and the level of follicular fluid steroids, did not find a relationship between apoptosis and oocyte maturation or fertilization rates by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). This finding could be explained because ICSI would by-pass the natural barriers and not necessarily would require a good-quality oocyte to achieve fertilization. GC apoptosis has been negatively associated with embryo quality, fertilization rates and pregnancy outcomes following IVF (Lee *et al.*, 2001). The same study found higher incidence of cumulus cell apoptosis in unfertilized oocytes than in fertilized oocytes, but the frequency of apoptosis in cumulus cells was not associated to embryo quality (Lee *et al.*, 2001). Thus, GC apoptosis remains a potential marker of oocyte and embryo quality that needs further investigation.

The age of women undergoing IVF is an important factor to pregnancy rates and, accordingly, a significant increase in cumulus cell apoptosis has been observed in patients over 40 years old (Levrin *et al.*, 1991; Keefe *et al.*, 1995; Lim and Tsakok, 1997). However, a recent flow cytometry study with selective gating of pure mural GCs (identified by the expression of FSH receptor) observed lower apoptosis rate (measured by 7-amino-actinomycin incorporation by apoptotic cells) in follicles from women over 35 years compared to younger ones. The apoptosis rate was also lower in women over 40 years with diminished ovarian reserve compared to a group of the same age with normal ovarian reserve (Regan *et al.*, 2018b). On possible interpretation of these conflicting observations is that cumulus cell apoptosis would increase with advanced age (Lee *et al.*, 2001) whilst mural CGs apoptosis paradoxically decreases due to a slower turnover of this cell population

Table 1 Clinical aspects and correlation of apoptosis in human granulosa cells.

Author	Samples	Number of patients	Age	Inclusion factors (Causes of infertility for IVF-ET)	Method	Clinical correlation objective	Results
Lobach et al. (2017)	Granulosa cells	59	Median age 38 (ranging from 33 to 40 years).	Tubal factor, endometriosis, male infertility, combined male and female infertility factors, and other causes (Patients with all their oocytes cryopreserved were excluded from the study)	Caspase-3, caspase-8 and Bax mRNA expression	Number of oocytes released, duration of COS, and dose of gonadotropins X apoptosis in GCs	Caspase-3 expression in GCs correlated inversely with the number of oocytes released and directly with the duration of COS, and with the total dose of gonadotropins
Jancar et al. (2007)	Granulosa cells	30	Mean age 33.4 ± 4.0 years	Tubal factor (Women with endometriosis or those with male factor infertility were excluded from the study)	Flow cytometry (Annexin V and PI)	Fertilization competence of the oocyte, embryo development, and implantation rate X apoptosis in GCs	No differences between the characteristics of GCs from the follicles with fertilized and those with non-fertilized oocytes
Glamodija et al. (2005)	Granulosa cells from IVF and from ovarian tissue	15 from IVF, and 8 from ovarian tissue	31–40 years (IVF patients) 19–42 years (ovarian tissue)	IVF causes not described. Human ovarian tissue from hysterectomy/ovariectomy from patients with benign conditions	Immunohistochemistry (Active caspase-3) and TUNEL Assay	GCs from COS patients, compared to no COS patients X apoptosis in GCs	Expression of active caspase-3 in GCs from COS pre-ovulatory follicles, which was absent in GCs of healthy dominant follicle from ovarian tissue
Clavero et al. (2003)	Granulosa cells	55	Ranged age 24–36 years	Male infertility	Flow cytometry (Annexin V and PI)	Follicular and oocyte maturation X apoptosis in GCs	Apoptosis in GCs is not related to oocyte maturity and fertilizability by ICSI, or to follicular quality in stimulated cycles of normal women
Suh et al. (2002)	Granulosa cells	73	Mean age 33.4 ± 4.0 years	Tubal factor, male infertility, and unexplained infertility (female factors other than tubal factor were excluded from the study)	Flow cytometry	Pregnancy outcome X apoptosis in GCs	Pregnant group showed a significantly lower apoptotic index in GCs compared with the nonpregnant group
Lee et al. (2001)	Cumulus cells	34	Mean age 33.2 ± 5.0 years (ranging from 26 to 44 years)	Tubal factor and unexplained infertility	TUNEL	Fertilized oocytes and embryo quality X apoptosis in cumulus cells	Apoptosis is higher in unfertilized oocytes than in fertilized oocytes. No difference was found in the incidence of cumulus cells apoptosis according to embryo quality
Kaneko et al. (2000)	Granulosa cells and cumulus cells	24	Not informed	Tubal factor and unexplained infertility	Hoechst 33258 (examined by fluorescence microscopy to	Comparison of natural, and controlled ovarian stimulation protocols X apoptosis	Incidence of apoptotic mural GCs in the GnRH $\alpha$ +hMG-hCG cycle was significantly higher than

continued

Table 1. (Continued)

Author	Samples	Number of patients	Age	Inclusion factors (Causes of infertility for IVF-ET)	Method	Clinical correlation objective	Results
					estimate the incidence of apoptotic cells.	in GCs (cumulus and mural)	those of the natural and hMG+hCG cycles. Incidence of apoptotic cumulus GCs in the GnRH+hMG+hCG cycle was significantly higher than those of natural and hMG+hCG cycles, and the incidence of apoptotic cumulus GCs in the hMG+hCG cycle was significantly lower than that in the natural cycle

COG, control ovarian stimulator; GCs, granulosa cells.

(Regan et al., 2018a). Furthermore, previous studies may have evaluated mixed cell populations in the follicular fluid aspirate rather than ultra-pure GCs (Ferrero et al., 2012).

Different protocols of ovarian stimulation for IVF could increase apoptosis in GCs. Indeed, studies comparing natural cycles, stimulation cycles with GnRH $\alpha$  plus human menopausal gonadotropins (hMG) and stimulation cycles with hMG plus human chorionic gonadotropin (hCG) have reported a higher incidence of apoptosis in GCs, in a dose dependent manner, in cycles with GnRH $\alpha$  (Kaneko et al., 2000). Despite the fact that GnRH $\alpha$  prevents the premature endogenous LH surge, its detrimental effects have been demonstrated in rats (Billig et al., 1994), pigs, and humans (Zhao et al., 2000). Another factor that further increases the percentage of apoptosis in GCs is the presence of endometriosis (Toya et al., 2000; Sanchez et al., 2014).

During stimulation protocols for IVF, follicles that were supposed to become atretic in a natural unstimulated cycle are rescued and only 80% of these follicles contain fertilizable healthy metaphase II (MII) oocytes. About 10% are already in apoptosis process while 10% have not achieved meiosis (Mandelbaum, 2000). Even though the majority of the retrieved oocytes are classified as mature, not all of them develop into a good quality embryo after fertilization.

### Concluding remarks

High apoptosis rates of GCs extracted from follicle aspirates have been associated with empty follicles, less oocytes retrieved and lower oocyte and embryo quality in IVF (Figure 1). However, new evidence suggests that a precise cell type characterization is needed to better understand the relationship between follicular apoptosis and IVF outcomes. In addition, it is necessary to investigate the effects of ovarian stimulation protocols on GCs apoptosis, since this mechanism may be exacerbated by GnRH $\alpha$ . Since invasive methods of evaluation of oocytes and embryos can harbor significant damage to cells and thus hinder pregnancy achievement, GCs evaluation should be further studied as it can provide clinicians with feasible and reliable instruments for the best oocyte and embryo selection.

### References

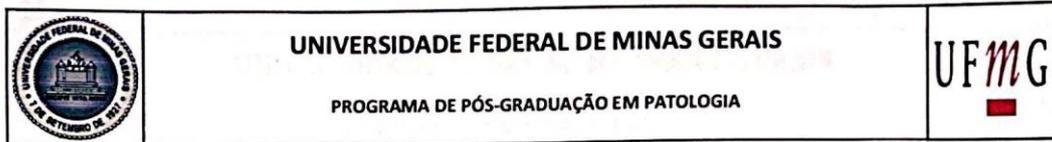
- Ajduk A, Zernicka-Goetz M (2012) Advances in embryo selection methods. *Biol Rep* 4: 11.
- Billig H, Furuta I, Hsueh AJ (1994) Gonadotropin-releasing hormone directly induces apoptotic cell death in the rat ovary: biochemical and in situ detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in granulosa cells. *Endocrinology* 134: 245–52.
- Clavero A, Castilla JA, Núñez AI, García-Peña ML, Maldonado V, Fontes J, Mendoza N, Martínez I (2003) Apoptosis in human granulosa cells after induction of ovulation in women

- participating in an intracytoplasmic sperm injection program. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 110: 181–5.
- Favaloro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C, De Laurenzi V (2012) Role of Apoptosis in disease. *Aging* 4: 330–49.
- Ferrero H, Delgado-Rosas F, Garcia-Pascual CM, Monterde M, Zimmermann RC, Simon C, Pellicer A, Gomez R (2012) Efficiency and purity provided by the existing methods for the isolation of luteinized granulosa cells: a comparative study. *Hum Reprod* 27: 1781–9.
- Glamočlija V, Vilović K, Saraga-Babić M, Baranović A, Sapunar D (2005) Apoptosis and active caspase-3 expression in human granulosa cells. *Fertil Steril* 83: 426–31.
- Hennet ML, Combelles CMH (2012) The antral follicle: a micro environment for oocyte differentiation. *Int J Dev Bio* 56: 819–31.
- Jančar N, Kopitar AN, Ihan A, Klun IV, Bokal EV (2007) Effect of apoptosis and reactive oxygen species production in human granulosa cells on oocyte fertilization and blastocyst development. *J Assist Reprod Genet* 24: 91–7.
- Kaneko T, Saito H, Takahashi T, Ohta N, Saito T, Hiroi M (2000) Effects of controlled ovarian hyperstimulation on oocyte quality in terms of the incidence of apoptotic granulosa cells. *J Assist Reprod Genet* 17: 580–5.
- Keefe DL, Niven-Fairchild T, Powell S, Buradagunta S (1995) Mitochondrial deoxyribonucleic acid deletions in oocytes and reproductive aging in women. *Fertil Steril* 64: 577–83.
- Lee KS, Joo BS, Na YJ, Yoon MS, Choi OH, Kim WW (2001) Cumulus cells apoptosis as an indicator to predict the quality of oocytes and the outcome of IVF-ET. *J Assist Reprod Genet* 18: 490–8.
- Levrin D, Ben-Shlomo I, Dor J, Ben-Rafael Z, Nebel L, Mashiah S (1991) Aging of endometrium and oocytes: observations on conception and abortion rates in an egg donation model. *Fertil Steril* 56: 1091–4.
- Lim AS, Tsakok MF (1997) Age-related decline in fertility: a link to degenerative oocytes?. *Fertil Steril* 68: 265–71.
- Lobach VN, Casalechi M, Dela Cruz C, Pereira MT, Del Puerto HL, Reis FM (2017) Caspase-3 gene expression in human luteinized granulosa cells is inversely correlated with the number of oocytes retrieved after controlled ovarian stimulation. *Hum Fertil* 1–6. <https://doi.org/10.1080/14647273.2017.1356474>
- Mandelbaum J (2000) Oocytes. *Hum Reprod* 15: 11–8.
- Matsuda F, Inoue N, Manabe N, Ohkura S (2012) Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. *J Reprod Dev* 58: 44–50.
- Nakahara K, Saito H, Saito T, Ito M, Ohta N, Takahashi T, Hiroi M (1997) The incidence of apoptotic bodies in membrana granulosa can predict prognosis of ova from patients participating in in vitro fertilization programs. *Fertil Steril* 68: 312–7.
- Nakahara K, Saito H, Saito T, Ito M, Ohta N, Sakai N, Tezuka N, Hiroi M, Watanabe H (1997) Incidence of apoptotic bodies in membrana granulosa of the patients participating in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 67: 302–8.
- Oosterhuis GJ, Michgelsen HW, Lambalk CB, Schoemaker J, Vermes I (1998) Apoptotic cell death in human granulosa-lutein cells: a possible indicator of in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 70: 747–9.
- Regan SLP, Knight PG, Yovich JL, Leung Y, Arfuso F, Dharmarajan A (2018) Granulosa cell apoptosis in the ovarian follicle—a changing view. *Front Endocrinol* 9: 61.
- Regan SLP, Knight PG, Yovich JL, Stanger JD, Leung Y, Arfuso F, Almahbobi G, Dharmarajan A (2018) The effect of ovarian reserve and receptor signalling on granulosa cell apoptosis during human follicle development. *Mol Cell Endocrinol* 470: 219–27.
- Russell DL, Robker RL (2007) Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex. *Hum Reprod Update* 13: 289–312.
- Sanchez AM, Viganò P, Quattrone F, Pagliardini L, Papaleo E, Candiani M, Panina-Bordignon P (2014) The WNT/ $\beta$ -catenin signaling pathway and expression of survival promoting genes in luteinized granulosa cells: endometriosis as a paradigm for a dysregulated apoptosis pathway. *Fertil Steril* 101: 1688–96.
- Seifer DB, Gardiner AC, Ferreira KA, Peluso JJ (1996) Apoptosis as a function of ovarian reserve in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 66: 593–8.
- Suh CS, Jee BC, Choi YM, Kim JG, Lee JY, Moon SY, Kim SH (2002) Prognostic implication of apoptosis in human luteinized granulosa cells during IVF-ET. *J Assist Reprod Genet* 19: 209–14.
- Toya M, Saito H, Ohta N, Saito T, Kaneko T, Hiroi M (2000) Moderate and severe endometriosis is associated with alterations in the cell cycle of granulosa cells in patients undergoing in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 73: 344–50.
- Wallace M, Cottell E, Gibney MJ, McAuliffe FM, Wingfield M, Brennan L (2012) An investigation into the relationship between the metabolic profile of follicular fluid, oocyte developmental potential, and implantation outcome. *Fertil Steril* 97: 1078–84.
- Zhao S, Saito H, Wang X, Saito T, Kaneko T, Hiroi M (2000) Effects of gonadotropin-Releasing hormone agonist on the incidence of apoptosis in porcine and human granulosa cells. *Gynecol Obstet Invest* 49: 52–6.

Received 20 June 2018; accepted 29 July 2018.  
Final version published online 16 August 2018.



## ANEXO E



**ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA  
CAMILA PEREIRA ALMEIDA**

Realizou-se, no dia 21 de fevereiro de 2019, às 14:00 horas, C3 - Sala de reuniões - Departamento de Patologia, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada *MARCADORES DE APOPTOSE EM CÉLULAS DA GRANULOSA HUMANAS E SUA CORRELAÇÃO COM PARAMETROS CLÍNICOS DE PACIENTES SUBMETIDAS A HIPERESTIMULAÇÃO OVARIANA CONTROLADA*, apresentada por CAMILA PEREIRA ALMEIDA, número de registro 2017668146, graduada no curso de BIOMEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Helen Lima Del Puerto - Orientador (UFMG), Prof(a). Fernando Marcos dos Reis (UFMG), Prof(a). Enio Ferreira (UFMG), Prof(a). Marcia Cristina Franca Ferreira (UFMG), Prof(a). Milene de Alvarenga Rachid (UFMG).

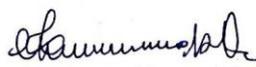
A Comissão considerou a dissertação:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 21 de fevereiro de 2019.

  
Prof(a). Helen Lima Del Puerto ( Doutor )

  
Prof(a). Fernando Marcos dos Reis ( Doutor )

  
Prof(a). Enio Ferreira ( Doutor )

  
Prof(a). Marcia Cristina Franca Ferreira ( Doutora )

  
Prof(a). Milene de Alvarenga Rachid ( Doutor )

