

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS (UFMG)
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR

Monique Ellen Gervásio Nunes

**EFEITOS DA ANGIOTENSINA 1-7 NA VIA DE ESTEROIDOGENESE E
MATURAÇÃO DAS CÉLULAS DO CUMULUS E GRANULOSA MURAIIS
LUTEINIZADAS HUMANAS**

Belo Horizonte

2022

MONIQUE ELLEN GERVÁSIO NUNES

**EFEITOS DA ANGIOTENSINA 1-7 NA VIA DE ESTEROIDOGENESE E
MATURAÇÃO DAS CÉLULAS DO CUMULUS E GRANULOSA MURAIIS
LUTEINIZADAS HUMANAS**

Tese apresentada como requisito para obtenção do título de doutor junto ao Programa de pós-graduação em Medicina Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Marcos dos Reis.

Belo Horizonte

2022

Nunes, Monique Ellen Gervásio.
N972e Efeitos da Angiotensina 1-7 na via de esteroidogênese e maturação das células do cumulus e granulosa murais luteinizadas humanas [recurso eletrônico] / Monique Ellen Gervásio Nunes. -- Belo Horizonte : 2022.
64f.: il.

Formato: PDF.

Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador: Fernando Marcos dos Reis.

Área de concentração: Medicina Molecular

Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Angiotensinas. 2. Células do Cúmulo. 3. Células da Granulosa. 4. Líquido Folicular. 5. Hormônios Esteroides Gonadais. 6. Dissertação Acadêmica. I. Reis, Fernando Marcos dos. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NI M: QU 465

Bibliotecário responsável: Monaliza Maria da Silveira Caires Lima CRB-6/1707



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR

FOLHA DE APROVAÇÃO

EFEITOS DA ANGIOTENSINA 1-7 NA VIA DE ESTEROIDOGENESE E MATUREAÇÃO DAS CÉLULAS DO CUMULUS E GRANULOSA MURAIAS LUTEINIZADAS HUMANAS

MONIQUE ELLEN GERVÁSIO NUNES

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia nove de dezembro de dois mil vinte e dois, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Medicina Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes professores doutores:

Fernando Marcos dos Reis - Orientador
UFMG

Letícia Ferreira Gontijo Silveira
UFMG

Fabio Vasconcellos Comim
UFMG

Virgínia Mara Pereira
UFJF

Kinulpe Honorato Sampaio
UFVJM

Belo Horizonte, 09 de dezembro de 2022.



Documento assinado eletronicamente por Fernando Marcos dos Reis, Professor do Magistério Superior, em 03/01/2023, às 14:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Letícia Ferreira Gontijo Silveira, Professora do Magistério Superior, em 04/01/2023, às 10:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Kinulpe Honorato Sampaio, Usuário Externo, em 05/01/2023, às 16:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Fabio Vasconcellos Comim, Professor do Magistério Superior, em 13/01/2023, às 11:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Virgínia Mara Pereira, Usuária Externa, em 20/03/2023, às 10:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 2000358 e o código CRC 00488756.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador **Fernando Reis** pela dedicação e empenho, por me ensinar e contribuir tanto para minha formação;

A toda a equipe do LRH, em especial a equipe de enfermagem **Gizele, Maria Helena e Marli**. Às embriologistas **Raquel Lara, Maíra Casalechi, Elaine Sousa e Wiviane Assis** que tornaram possível este trabalho. À equipe da andrologia, **Luiz Carlos Thimóteo, Simone França Nery**, que compartilharam comigo um pouco do laboratório de reprodução humana e à secretária **Rose Costa**, pelos cafezinhos;

Aos colegas da pós-graduação, em especial as amigas **Maíra Casalechi e Taynná El Cury**, que foram muito mais do que ombros amigos, acompanharam de perto e tiveram muita empatia durante todas as dificuldades que enfrentamos no processo de formação ao doutoramento;

Às alunas de iniciação científica que me deram a oportunidade de ensinar e aprender muito durante esse tempo, em especial **Tays Guedes, Izabela Flueti e Lorrane Marques**;

Aos amigos de outros programas da pós-graduação, **João Locke e Sara Coxir e Raissa Lima Pereira**, que me ajudaram a ver e interpretar as dificuldades nos experimentos por perspectivas diferentes.

Aos meus pais **Manoel Messias Nunes e Silvana de Lima Gervásio Nunes**, que sempre acreditaram em mim e foram suporte, em todos os momentos durante a minha vida e formação;

Ao meu marido **Helbert Luiz Paulino**, que é meu conselheiro, auxiliador e me apoia em todas as decisões da minha vida;

A **Deus**, que foi o meu combustível para não desistir, que me ampara e sustenta, me ajuda a ter persistência, reconhece meu esforço e sempre abre as portas para mim.

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”
Leonardo da Vinci

RESUMO

O Sistema Renina Angiotensina tem sido documentado no ovário e, apesar disso, seu papel fisiológico no processo reprodutivo feminino ainda não foi totalmente compreendido. Um dos peptídeos chaves para entender esse mecanismo é a Angiotensina (Ang) 1-7, que em modelos animais participa na maturação dos folículos e na esteroidogênese, e é liberada no plasma e no líquido folicular de mulheres submetidas à fertilização *in vitro*. As células do cumulus (CC) e da granulosa murais (CGM), além de estar anatomicamente próximas aos oócitos, apresentam uma comunicação bidirecional entre si, o que é essencial para os processos de diferenciação folicular. Portanto, a avaliação da expressão de fatores ou genes nas CGMs e CCs pode prever a saúde folicular. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da Ang 1-7 nas CGMs e CCs cultivadas *in vitro*. Para isto, foi realizado o isolamento e purificação das CCs e CGMs de pacientes participantes do programa de fertilização *in vitro* do HC- UFMG. Estas células foram cultivadas por 72 horas e depois submetidas a Ang 1-7 nas concentrações 10^{-10} M; 10^{-8} M; 10^{-6} M, ou ao antagonista A779 na concentração de 10^{-8} M, isolado ou associado à Ang1-7 por 24hrs. As concentrações de progesterona e estradiol foram dosadas no meio de cultivo e a expressão gênica de *StAR*, *CYP11A1*, *HSD17B*, *HSD17B*, *CYP19A1*, *HSD3B2*, *MASR* e *LHR* nas CGMs foi avaliada por qPCR. Nas CC, GMPc e AMPc foram detectados por imunofluorescência. Não houve diferença na liberação de progesterona e estradiol entre os grupos estudados. Os níveis de expressão do mRNA das enzimas esteroidogênicas não se alteraram com os tratamentos. Foi possível detectar *LHR* nas CGMs e GMPc e AMPc nas CCs. Este foi o primeiro trabalho a avaliar a relação das células da granulosa e do cumulus humanas cultivadas *in vitro* com a via esteroidogênica após estímulo com Ang 1-7. A ausência de efeito da Ang 1-7 sobre a esteroidogênese neste modelo *in vitro* de células humanas contrasta com observações prévias em outras espécies e não parece estar associada a falta do receptor MAS. O possível efeito da Ang 1-7 não ficou demonstrado no ovário humano, mas essa hipótese ainda precisa ser avaliada em diferentes condições experimentais, como por exemplo o estímulo prévio ou concomitante com LH/hCG.

Palavras-chave: Angiotensina 1-7; Células do cumulus; Células da granulosa; Esteroidogênese.

ABSTRACT

The Renin Angiotensin System has been documented in the ovary, and despite this, its physiological role in the female reproductive process is still not fully understood. One of the key peptides to understand this mechanism is Angiotensin (Ang) 1-7, which participates in follicular maturation and steroidogenesis in several animal models, and has been detected in plasma and follicular fluid of women undergoing in vitro fertilization (IVF). Cumulus (CC) and mural granulosa (CGM) cells, in addition to being anatomically close to oocytes, have bidirectional communication with each other, which is essential for follicular differentiation processes. Therefore, the evaluation of the expression of factors or genes in CGMs and CCs can predict follicular health. The objective of this work was to evaluate the effects of Ang 1-7 on CGMs and CCs cultured *in vitro*. For this, the isolation and purification of CCs and CGMs from patients participating in the IVF program at HC-UFMG was carried out. These cells were cultured for 72 hours, and then subjected to Ang 1-7 at the concentrations 10^{-10} M, 10^{-8} M, 10^{-6} M, or its antagonist A779 at 10^{-8} M alone or associated with Ang1-7 for 24hrs. Progesterone and estradiol levels were assayed in the culture medium, and the gene expression of *StAR*, *CYP11A1*, *HSD17B*, *HSD17B*, *CYP19A1*, *HSD3B2*, *MASR* and *LHR* in CGMs was evaluated by qPCR. In CC, cGMP and cAMP were detected by immunofluorescence. There was no difference in the release of progesterone and estradiol between the studied groups. The mRNA expression levels of steroidogenic enzymes did not change with treatments. It was possible to detect *LHR* in CGMs and cGMP and cAMP in CCs. This was the first study to evaluate the relationship of in vitro cultured human granulosa and cumulus cells with the steroidogenic pathway after stimulation with Angiotensin 1-7. The results did not show any effect of Ang 1-7 on human ovarian cells, but this hypothesis still remains to be tested in different experimental conditions like priming or concomitant stimulation with LH/hCG.

Keywords: Angiotensin 1-7; Cumulus cells; Granulosa cells; Steroidogenesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Formação Angiotensina 1-7.	19
Figura 2 Diferenças morfológicas das células da granulosa e do cumulus cultivadas in vitro.	23
Figura 3 - Via da esteroidogênese nas células da granulosa e da teca	27
Figura 4- Fluxograma orientador das etapas de processamento e análise das amostras de CCs e CGMs.	35
Figura 5- Protocolo de cultivo das CGM com quantidade >6oócitos	37
Figura 6- Protocolo de cultivo das CGM com quantidade <6oócitos	38
Figura 7- Protocolo de cultivo das CCs.	39
Figura 8 - Níveis de liberação de estradiol e progesterona pelas CGMs luteinizadas cultivadas in vitro.	45
Figura 9- Níveis de expressão relativa (Δ CT) de CYP19A1, CYP11A1, STAR, HSD3B2, HSD17b1 e HSD17b2 em amostras de CGMs luteinizadas cultivadas in vitro.	47
Figura 10- Níveis de expressão relativa (Δ CT) de RMAS e RLH em amostras de CGMs cultivadas in vitro	48
Figura 11 - Identificação e caracterização das CGMs com anti LHR	49
Figura 12- Imunofluorescência para GMPc e AMPc em CCs.	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Oligos da via esteroidogênica, MASR, LHR e suas sequências correspondentes	41
Tabela 2- Variáveis descritivas da população estudada	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A779- D-Ala7-angiotensina-1-7
AMPc - monofosfato de adenosina cíclico
Ang I- Angiotensina I
Ang II- Angiotensina II
Ang1-7- Angiotensina 1-7
Ang1-9- Angiotensina 1-9
Antianti- antibiótico e antimicótico
ATR1- Receptor de Angiotensina II tipo 1
CAPI- UFMG- Centro de aquisição e processamento de imagem da UFMG
Cat. - Catálogo
CC- Célula do Cúmulus
cDNA- DNA
complementar
CGL- Células da Granulosa Luteinizadas
CGM- Célula da granulosa Mural
CNP- peptídeo Natriurético tipo
COEP- Comitê de Ética e Pesquisa
CP- Corpúsculo Polar
CT- Do inglês cycle threshold
CYP- citocromo P450
CYP11A1- citocromo P450scc
CYP17A1- citocromo P450
D1, D2, D3 e D4- Dias 1,23 e 4 de cultivo
DAPI- 4',6'-diamino-2-fenil-indol
DMEM/F12- Dulbecco's Modified Eagle Medium sem fenol red
DNA- Ácido desoxirribonucleico
E2- Estradiol
EC- Eficiência Catalítica
ECA- Enzima Conversora de Angiotensina
ECA2- Enzima conversora da Angiotensina
2 EDTA- ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA- Ensaio Imunoenzimático
Em- Emissão

Ex- Excitação

FBS- do inglês Fetal Bovin Serum

FIV- Fertilização in vitro

FSH- Hormônio Folículo Estimulante

g- força G

GFP- do inglês Green fluorescent protein

GMPc monofosfato de guanosina cíclico

GnRHa- análogo do hormônio liberador de gonadotrofina

HC- UFMG- Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais

HGC- do inglês humam chorionic gonadotropin

HOC- Hiperestimulação ovariana controlada

HPO- eixo Hipotálamo hipófise ovariano

hrs- Horas

HSD17B- 17 β -hidroxiesteroide desidrogenase

HSD3B- 3beta-hidroxiesteroide-dehidrogenase

HSDs- hidroxiesteroides desidrogenases

ICSI - injeção intracitoplasmática de espermatozoides

IGF- do inglês Insulin like grown

IMC- Índice de Massa Corporal

LF- Líquido Folicular

LH- Hormônio Luteinizante

LHR- do inglês LH receptor

M- Molar

MASr- Receptor MAS do inglês *MAS receptor*

MII- Metáfase da segunda fase da divisão meiótica das células

min- Minutos

ml- mililitros

mRNA- RNA mensageiro

NEP- neutral endopeptidase

ng- nanogramas

nm- nanômetros

No- Número

NPR2- receptor de peptídeo natriurético

2 OMS- Organização mundial de saúde

P4- Progesterona
PBS- do inglês Phosphate buffered saline
PCR- reação em cadeia da polimerase
PDE3A - fosfodiesterase 3A
Penstrept- Penicilina e Estreptomicina
PEP- prolyl oligopeptidase
Pg- Picogramas
PKA- Proteína quinase A
RFP- do inglês Red fluorescent protein
rFSH- FSH recombinante
RLUs- Unidades de luz relativas
RMAS- gene do receptor MAS
RNA- ácido ribonucleico
Rpm- Rotações por minuto
RT- PCR- PCR em tempo real
SNC- sistema nervoso central
SNP- sistema nervoso periférico
SRA- Sistema Renina Angiotensina
TCLE- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
THOP1- timet oligopeptidase
ul- microlitros
VG- Vesícula Germinativa
ZP- Zona Pelúcida

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
1.1. O Sistema Renina Angiotensina	16
1.2. Ang.1-7- e suas vias de formação;	17
1.3. Os ovários	19
1.3.1 A Oogênese	19
1.3.2 Foliculogênese	21
1.4. Células do cumulus e Células da granulosa murais	22
1.5. Esteroidogênese	25
1.6. O papel da Ang 1-7 na reprodução	28
JUSTIFICATIVA	31
OBJETIVOS	32
2.1. Objetivo Geral	32
2.2. Objetivos Específicos	32
MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1. Delineamento e descrição da população estudada	33
3.2. Considerações éticas	33
3.3. Hiperestimulação ovariana controlada	33
3.4. Coleta do líquido folicular e células do cumulus	34
3.5. Isolamento e cultivo das células da granulosa luteinizadas e células do cumulus.	35
3.5.1 Isolamento e cultivo das CGM para >6 oócitos	36
3.5.2 Isolamento e cultivo das CGL para <6 oócitos	37
3.5.3 Isolamento e cultivo das CC	38
3.5.4 Tratamento dos cultivos com Angiotensina 1-7 e A779	39
3.6. Protocolo de tripsinização	39
3.7. Ensaio imunoenzimático e quimioluminescência	40
3.8. Extração de RNA, Síntese de cDNA e qPCR	41
3.9. Imunofluorescência	43
3.10. Análise Estatística	43
RESULTADOS	44
4.1. Caracterização da amostra	44
4.2. Não houve diferença de liberação de estradiol e progesterona entre os grupos de tratamento e controles	45
4.3. Os níveis de expressão de CYP19A1, CYP11A1, STAR, HSD3B2, HSD17b1 e HSD17b2 não diferiram entre os grupos	46

4.4. Houve expressão de MASR e LHR em todos os grupos de tratamento.	
44	
4.5. Houve detecção de receptor LH nas células da granulosa cultivadas <i>in vitro</i>	45
4.6. Houve detecção de GMPc e AMPc em todos os grupos de tratamento nas células do cumulus cultivadas <i>in vitro</i>	50
DISCUSSÃO	51
CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXOS	62
Anexo A- Carta de Aprovação ao COEP- UFMG	62
Anexo B- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	63

INTRODUÇÃO

1.1. O Sistema Renina Angiotensina

O Sistema renina angiotensina (SRA) foi relatado pela primeira vez por Tigersted e Bergman, em 1898, eles descobriram que um extrato de tecido de rim de coelhos era responsável por aumentar a pressão sanguínea. Em 1934, Goldblatt, em um experimento clássico, conseguiu induzir hipertensão em cães através da constrição da artéria renal. Logo nos anos seguintes, (1939 e 1940) Braun-Menendez et al. e Page et al. descobriram a angiotensina, a molécula chave para formação dos outros componentes da via (Hall 2003). A partir daí uma cascata de enzimas, peptídeos, hormônios esteroides e cofatores pertencentes ao SRA foram sendo caracterizados (Oparil e Haber 1974). E após mais de cem anos de sua descoberta vários pesquisadores continuam fascinados por esse sistema, devido a seu importante papel no controle do equilíbrio de sódio, do volume de fluidos corporais e da pressão sanguínea (Hall 2003).

Atualmente, sabemos que o SRA é um sistema regulador endócrino e parácrino, composto por peptídeos que seletivamente se ligam aos receptores de superfície da célula e ativam sinais citoplásmicos (Reis e Reis 2020). A partir de sua principal molécula, o angiotensinogênio, sucessivas clivagens enzimáticas dão origem a outros componentes como, por exemplo, a Angiotensina II (Ang II) e a Angiotensina 1-7 (Ang 1-7), que são responsáveis por funções antagônicas dentro do SRA (Reis e Reis 2020).

Funcionalmente, o SRA é composto por um eixo clássico que compreende a Ang II, a enzima conversora de angiotensina (ECA) e o receptor de Ang II tipo 1 (ATR1) e por outro eixo mais recentemente descoberto que inclui a enzima ECA2, o peptídeo Ang 1-7 e o receptor Mas (rMAS). Fisiologicamente, esses ambos eixos, até onde se sabe, desempenham um papel coordenado na regulação da função cardiovascular. A hiperativação do eixo ECA-Ang-II-ATR1 geralmente causa efeitos deletérios, como vasoconstrição, disfunção endotelial, inflamação, fibrose, trombose e angiogênese, e é pró-hipertensiva. Enquanto a ativação do eixo ECA2-Ang 1-7-MASr se opõe aos efeitos do sistema clássico.

Portanto, tem sido descrito como o braço protetor do SRA, induzindo efeitos vasodilatadores, anti-inflamatórios, antifibróticos, antiangiogênicos e anti-hipertensivos através da ligação de ang1-7 ao seu receptor MASr (Touz e Montezano 2017).

Em 1986, Culer e colaboradores identificaram a Ang II no fluido folicular ovariano, seguido por Glorioso *et al.* que no mesmo ano detectaram altas concentrações de pró renina (Culer et al. 1986; Glorioso et al. 1986). No ano seguinte, Husain e colaboradores conseguiram identificar receptores para Ang II em ovários de ratas (Husain et al. 1987). Estas identificações foram a peça inicial para a descoberta da existência de um envolvimento local do SRA no ovário (Culer et al. 1986; Glorioso et al. 1986; Husain et al 1987; PMID: Reis and Reis 2020).

Nos ovários então, os peptídeos do SRA atuam no controle da pressão sanguínea ovariana e na regulação autócrina ou parácrina do crescimento folicular e da secreção hormonal. Apesar do sistema SRA no ovário já ter sido documentado, seu papel fisiológico no processo reprodutivo feminino permanece pouco conhecido (Dominska 2020).

1.2. Ang.1-7- e suas vias de formação;

Um dos peptídeos chaves para entender o mecanismo do SRA no ovário é o Ang 1-7. O Ang 1-7 inicialmente, foi considerado um heptapeptídeo inativo devido à falta estudos que demonstrassem uma relação entre a sua estrutura e atividade. Porém em 1988, Santos et al. demonstrou que Ang 1-7 foi o principal produto da incubação de Angiotensina I (Ang I) em micropunções de tecido cerebral, sendo que a formação de Ang 1-7 foi independente da ECA (Santos et al. 1988). No mesmo ano, Schiavone et al relatou a primeira ação biológica do Ang 1-7, a liberação de vasopressina do sistema hipotálamo-neurohipofisário em cérebro de rato (Schiavone et al. 1988; Santos et al. 2018).

Atualmente sabemos que a formação do Ang 1-7 pode ser desenvolvida por três maneiras diferentes. Primeiramente, através da via clássica do eixo SRA, o angiotensinogênio é clivado pela enzima renina e forma o decapeptídeo Ang I. Ang I então volta a ser clivada pela enzima ECA para produzir Ang II (Rice et al. 2004; Santos et al. 2018).

Como ilustra a Figura 1, Ang 1-7 pode ser gerada da clivagem de Ang I por endopeptidases ou da clivagem de Ang II, realizada por carboxipeptidases. As principais enzimas envolvidas na produção de Ang 1-7 através de Ang I são timet oligopeptidase (THOP1; EC 3.4.24.15), neutral endopeptidase (NEP; EC 3.4.24.11) e prolyl oligopeptidase (PEP; EC 3.4.21.26). E para clivagem da Ang II e formação de Ang 1-7 as carboxiperossidases são: ECA2 (EC 3.4.17.23), carboxypeptidase A (EC 3.4.17.1), e prolil carboxypeptidase (EC 3.4.16.2) (Rice et al. 2004; Santos et al. 2018).

Já a formação de Ang 1-7 a partir de Ang I por ECA2 envolve a produção do intermediário Angiotensina 1-9 (Ang 1-9) e sua clivagem subsequente por ECA ou NEP (Rice et al 2004). No entanto, a eficiência catalítica dessa via é muito menor do que a conversão dependente de ECA2 de ANG II em Ang 1-7 (Rice et al. 2004; Santos et al. 2018) (**Figura 1**).

A Ang 1-7 serve como ligante para o proto-oncogene MASr, um receptor acoplado à proteína G, constitutivamente ativo que sofre endocitose após estimulação com Ang 1-7. Usando um antagonista específico do MASr, D-Ala7-angiotensina-1-7 (A779), foi possível observar que este atua como um receptor para Ang 1-7 de forma diferente dos receptores de Ang II (Santos et al. 2003; Tallant et al. 2005). Porém, algumas das ações da Ang 1-7 parecem ser mediadas por vários receptores, pois são sensíveis tanto ao antagonista do receptor de bradicinina, quanto ao A779 (Dominska 2020). A suposição de que a Ang 1-7 pode se associar com MASr foi baseada principalmente em observações de que muitos dos efeitos deste peptídeo são perdidos em animais nocaute para MASr, tecidos deficientes para MASr ou deficientes de agonistas específicos de MASr que utilizam o A779. No entanto, não há evidência farmacológica suficientes de que Ang 1-7 interaja diretamente com MASr (Dominska 2020).

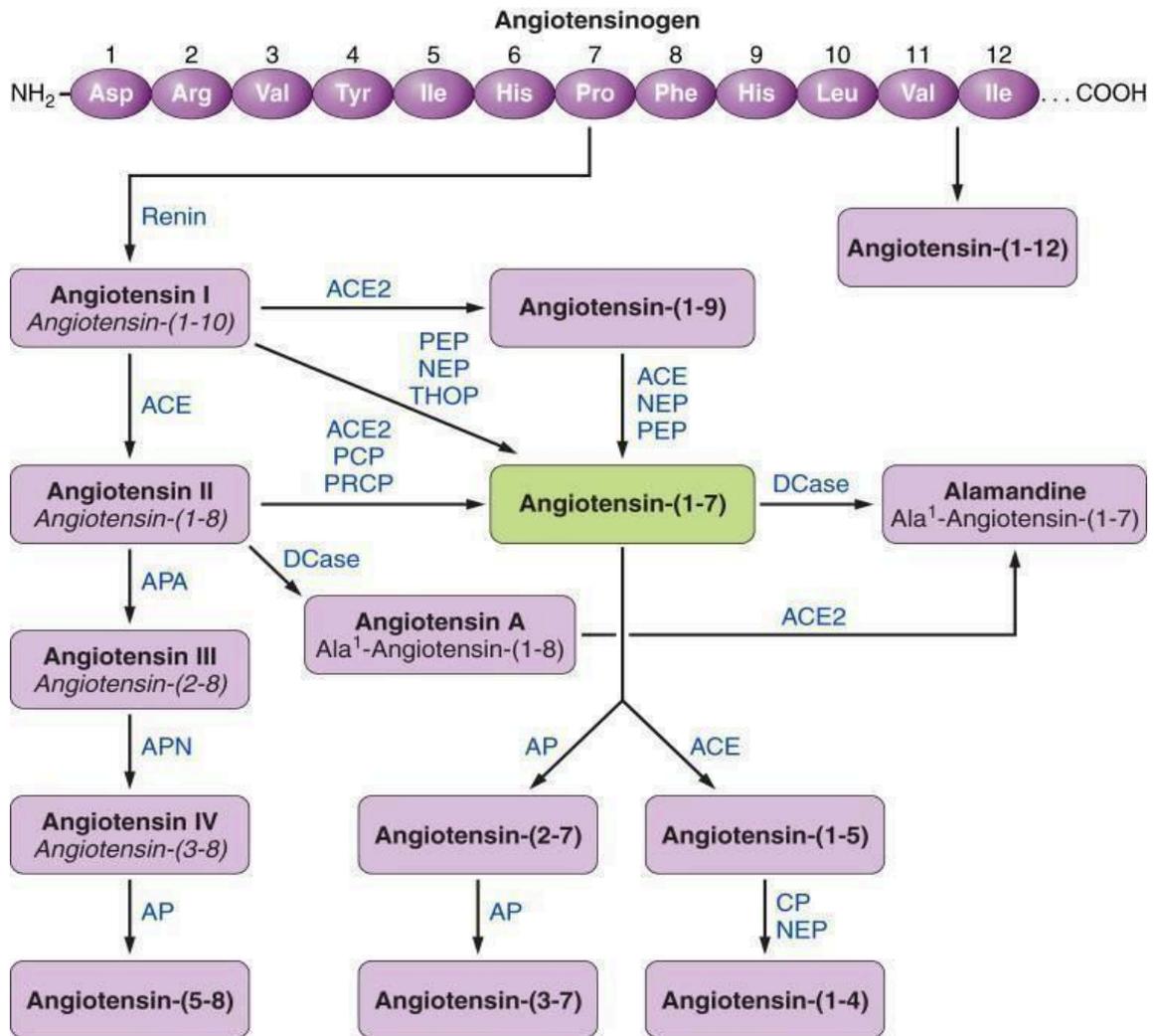


Figura 1- Formação Angiotensina 1-7. A angiotensina 1-7 é formada por três vias, primeiro quando o Angiotensinogenio é clivado pela renina em Ang I, que sofre clivagens pelas endopeptidases e forma Ang 1-7. A segunda quando ECA (sigla em inglês ACE) cliva Ang I em Ang II as carboxipeptidases clivam Ang II em Ang 1-7, e a terceira, menos comum, Ang I sofre ação das carboxipeptidases que formam Ang 1-7 (Santos et al. 2018).

1.3. Os ovários

Os ovários são as gônadas femininas, responsáveis pela produção dos oócitos e pela síntese de hormônios necessários para a regulação das funções reprodutivas. O interior do ovário é dividido em uma parte externa denominada córtex, e a parte interna, a medula. A medula contém os vasos sanguíneos, os ductos linfáticos e as fibras nervosas, que são cercadas por tecido conjuntivo.

No córtex está contido o folículo ovariano, incorporado em um tecido conjuntivo estromal celular. A todo momento durante o ciclo reprodutivo o ovário contém folículos em todas as fases de desenvolvimento (Dominska 2020).

Durante seu desenvolvimento, os ovários apresentam dois processos fundamentais: a oogênese, na qual as células germinativas femininas, os oócitos, são formados e amadurecidos; e a foliculogênese, processo no qual as células somáticas, da granulosa e da teca que circundam o oócito se diferenciam e contribuem para a formação dos folículos ovarianos (Dahari et al. 2016; Porras- Gomez et al. 2017).

1.3.1 A Oogênese

Nos mamíferos, os oócitos passam pela primeira divisão meiótica durante o desenvolvimento embrionário e, no momento do nascimento, são mantidos no estágio diplóteno da prófase I (Sen e Caiazza 2013). Neste estágio, os cromossomos estão duplicados, apresentam duas cromátides e também os chamados quiasmas, que são os pontos de cruzamento entre as cromátides não irmãs, devido ao *crossing over*. É possível identificar o oócito morfologicamente nessa fase pela presença da vesícula germinativa (VG) que apresenta o núcleo bem desenvolvido e imaturo (Sen e Caiazza 2013).

Os oócitos ficam neste estágio de prófase I até a mulher atingir a puberdade, sendo que poderá se completar apenas a partir da adolescência. Imediatamente antes da ovulação, por influência das gonadotrofinas hipofisárias, ocorre um aumento de LH e FSH os quais desencadeiam a retomada do processo da meiose I (Sen e Caiazza 2013).

Esta transição é caracterizada por vários fenômenos: a condensação da cromatina, a quebra da VG, resultando na mistura do nucleoplasma com o citoplasma, a formação do fuso mitótico e a segregação dos cromossomos. Os cromossomos presentes no citoplasma migram para a periferia ocorrendo a retomada da meiose e metade dos cromossomos migram para o primeiro corpúsculo polar (CP). A meiose I se encerra com a expulsão do primeiro CP e a formação do oócito secundário (Betteridge et al. 1989; Caixeta e Dode 2008).

Ao iniciar a segunda divisão meiótica, o ciclo meiótico é bloqueado pela segunda vez no estágio de metáfase (II), com a formação do primeiro corpúsculo

polar (CP) (Daharian et al 2016). O oócito permanece no estágio MII até ser liberado do folículo pela ovulação (Porrás- Gomez et al. 2017).

O término da maturação meiótica do oócito dependerá do espermatozoide no processo de fecundação (Porrás- Gomez et al. 2017). Quando a região equatorial da cabeça espermática se liga à membrana vitelínica inicia a ativação do oócito que induz ao término da segunda divisão meiótica à liberação do segundo CP com formação do oócito haplóide fecundado (Georgadaki et al. 2016).

1.3.2 Foliculogênese

Antes da formação de um folículo ovariano, os oócitos estão presentes dentro de aglomerados de células germinativas, também conhecidos como ninhos de células germinativas. A formação do folículo primordial ocorre quando os oócitos que sobreviveram ao processo de quebra do agrupamento de células germinativas são individualmente rodeados por células escamosas pré granulosas. Isso representa o primeiro estágio da foliculogênese e ocorre durante a última metade do desenvolvimento fetal em humanos (Edson et al. 2009). Neste momento o oócito é mantido no estágio de diplóteno da prófase I da meiose e não irá retomar até o início da ovulação (Jones e Shikanov 2019).

O folículo passa para o seu estágio primário à medida que as células pré- granulosas se transformam de uma morfologia escamosa para cuboide e começam a se proliferar. Essas células da granulosa são circundadas por uma camada de matriz extracelular chamada membrana basal, que atua como uma barreira permeável entre o folículo e seu ambiente (Jones e Shikanov 2019).

O estágio secundário começa quando o folículo adquire múltiplas camadas de células da granulosa e a camada tecal começa a se formar fora da membrana basal. A camada de células da teca também desenvolverá vasculatura para fornecer nutrientes conforme o folículo se expande. Entretanto, essa vasculatura não penetra na membrana basal e a maioria dos fatores solúveis se difunde para dentro e para fora, contribuindo para o gradiente

intrafolicular. Durante este período, o oócito aumenta de tamanho, mas permanece em parada meiótica. O antro se forma como resultado das secreções das células da granulosa e do fluido da vasculatura tecal (Jones e Shikanov 2019; Edson et al. 2009).

Antes da ovulação, um pico de LH faz com que o oócito amadureça ainda mais, retome a meiose e progrida para a metáfase II. As células da granulosa fazem a transição novamente em células do cumulus e respondem ao pico de LH secretando ácido hialurônico em um processo denominado expansão do cumulus. Após a ovulação, as células da granulosa e da teca restantes formam o corpo lúteo, que secreta progesterona e inibina - hormônios essenciais para sustentar os primeiros estágios da gravidez. Essa estrutura se degenera em questão de dias se não houver gravidez e o ciclo se inicia novamente (Jones e Shikanov 2019).

1.4. Células do cumulus e Células da granulosa murais

As células do cumulus (CC) e da granulosa (CG) desempenham um papel fundamental no folículo e oogênese. As células da granulosa apresentam diferentes fenótipos dentro do folículo, dependendo de sua localização, distinções na resposta hormonal e expressão gênica (Straus III 2019). Elas podem ser divididas em três sub-linhagens: 1. Células da granulosa murais (CGM), que se alinham à parede folicular e geralmente têm algum contato com a membrana basal folicular. 2. Células da granulosa antral (CGA), que revestem a cavidade antral em contato com o fluido folicular; e 3. Células do cumulus (CC), que têm contato direto com o oócito por meio de projeções celulares que atravessam a zona pelúcida e formam conexões de junções comunicantes (ou junções GAP do inglês) com a membrana plasmática do oócito (Russel et al. 2016).

As CCs são claramente um tipo de célula distinto, uma vez que elas têm funções diferentes e capacidade de resposta hormonal diferente. Já foi demonstrado que elas servem como células nutridoras do oócito no complexo cumulus oócito durante a oogênese *in vitro*, e mantêm um microambiente favorável com fatores de crescimento e interações celulares essenciais para a oogênese (Russel et al. 2016). Estas células se conectam ao citoplasma do

oócito e penetram na zona pelúcida (ZP) com junções GAP durante o desenvolvimento do folículo antral até a fase de folículo pré-ovulatório, e sofrem proliferação quando as junções GAP são gradualmente liberadas no ooplasma com a maturação meiótica do oócito (Turathum et al. 2021).

Quanto à morfologia, as CCs e as CGMs podem ser diferentes quando estão em folículos e fases do ciclo menstrual distintas. As CCs de pequenos folículos antrais sem estimulação de FSH e pico de LH aparecem com morfologia indiferenciada. No entanto, quando em folículos pré-ovulatórios, especialmente após o pico de LH, geralmente apresentam uma forma diferenciada. Nesta fase, quando observadas em cultivo *in vitro*, as CGMs têm citoplasmas compactos e escuros e se apresentam em forma de células semelhantes às epiteliais, com formato estrelado. Em contraste, as CCs possuem com citoplasmas soltos e claros, além de apresentar um formato arredondado (**Figura 2**) (Turathum et al. 2021).

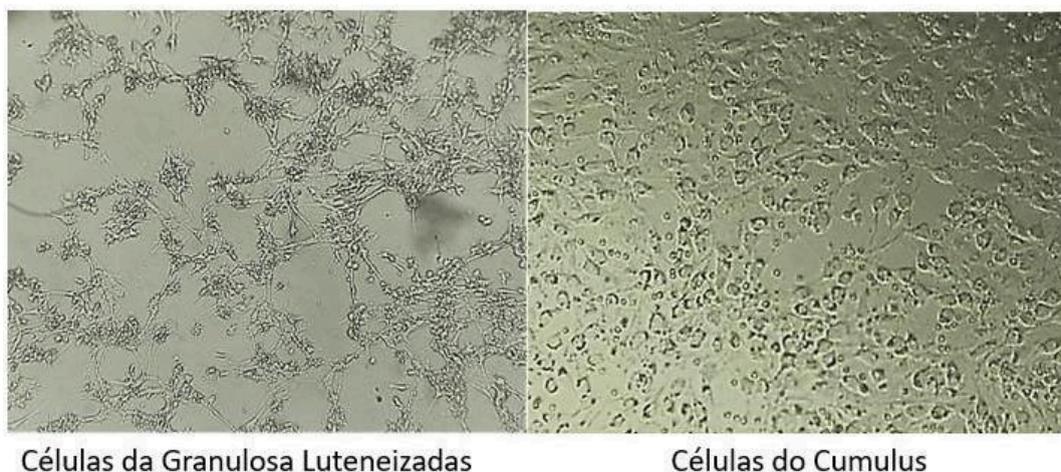


Figura 2 Diferenças morfológicas das células da granulosa e do cumulus cultivadas *in vitro*. Células da granulosa luteinizadas (CGL) e as células do cumulus foram cultivadas durante 48 horas em condições semelhantes e observadas em microscópio invertido no aumento de 100 vezes. É possível observar que as CGL se organizam em filetes estrelados enquanto as CC apresentam o formato oval com o citoplasma mais frouxo.

A diferenciação das células da granulosa em CGMs é estimulada pelo FSH através de uma pequena interação com os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs). Esta diferenciação das CGMs induzida por FSH

desempenha um papel crucial na fertilidade e prepara os órgãos reprodutivos femininos para o transporte de espermatozoides, fertilização e desenvolvimento embrionário inicial. O FSH estimula a expressão de mRNA do receptor do hormônio luteinizante (LHR) em CGMs, sendo o LHR marcador chave da diferenciação das CGM. Os níveis de transcrição do marcador mural de LHR são mais altos perto da lâmina basal e mais baixos nas CCs (Meduri, G et al 1992). Com fenótipo de CGMs, o FSH estimula essas células a transcrever os mRNA envolvidos na esteroidogênese (CYP11A1), ovulação (LHR) e função imune (CD34) (Turathum et al. 2021).

A qualidade dos oócitos depende das interações com as células da granulosa e do cumulus adjacentes. Alguns estudos já demonstraram o papel das células somáticas (CGMs e CCs) no processo de parada meiótica ou maturação oocitária (Ross et al. 2022; Liao et al. 2022; Hillier e Smyth 1994; Reis e Reis 2020)

Estudos demonstram, por exemplo, que o peptídeo natriurético tipo C (CNP) é capaz de induzir um sinal no interior das CCs que inibe a quebra das VGs, mantendo assim a parada meiótica e consequentemente evitando a maturação oocitária precoce. Através da produção de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), o CNP se liga ao seu receptor, receptor de peptídeo natriurético 2 (NPR2) dentro das CCs. Após essa ligação, GMPc se difunde para o oócito através de uma grande rede de comunicações de junção de gap e inibe a atividade da fosfodiesterase 3A (PDE3A), suprimindo assim a hidrólise do monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) e mantendo a parada meiótica do oócito pela ativação da proteína quinase (PKA). Porém, a sinalização molecular que controla diretamente a expressão do sistema NPPC / NPR2 ainda é totalmente desconhecida (Liu et al. 2017).

Já as CGMs no folículo antral são capazes de expressar uma maior atividade esteroidogênica (Straus e Williams 2019). Assim, essas células são responsáveis pela secreção de uma ampla variedade de hormônios e fatores de crescimento que podem afetar a maturação do oócito; portanto, a avaliação da expressão de fatores ou genes nas CGMs pode prever a saúde folicular. Além disso, a avaliação bioquímica e molecular das CGMs pode gerar

informações adicionais que são necessárias para a compreensão do sucesso da fertilização de oócitos (Mckenzie et al. 2004; Aghadadov et al. 2015).

1.5. Esteroidogênese

A biossíntese de hormônios esteroides, incluindo mineralocorticoides, progestagênios, androgênios, estrogênios e glicocorticoides, é conduzida pelas enzimas conhecidas como enzimas esteroidogênicas, a saber: as redutases esteroides, hidroxisteroide desidrogenases (HSDs) e enzimas específicas do citocromo P450 (CYPs) (Heidarzadehpilehrood et al. 2022; Chakraborty et al. 2021).

A esteroidogênese no ovário começa com a modificação do colesterol e progride sequencialmente para progesterona, androgênio e estrogênio, todos necessários para os processos subsequentes de síntese de hormônios esteroides. Esses hormônios são posteriormente liberados na circulação sanguínea, onde exercem seus efeitos tanto no sistema nervoso periférico (SNP) quanto no sistema nervoso central (SNC) (Heidarzadehpilehrood et al. 2022). A síntese de hormônios esteroides e a maturação dos oócitos promovem a manutenção dos tecidos reprodutores femininos (Chakraborty et al. 2021).

No ovário, sob a influência do LH, o colesterol é convertido em pregnenolona pela enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol, citocromo P450_{scc} (também conhecida como CYP11A1, codificada pelo gene *CYP11A1*) (Heidarzadehpilehrood et al. 2022). A proteína reguladora aguda esteroidogênica (StAR) facilita o transporte de colesterol para dentro das mitocôndrias (Chakraborty et al. 2021).

A CYP11A1, uma vez ligada à camada interna das mitocôndrias nas células da teca, é clivada em pregnenolona (Heidarzadehpilehrood et al. 2022). A pregnenolona é então transportada do interior da membrana mitocondrial para o retículo endoplasmático liso e convertida em deidroepiandrosterona e progesterona via 3beta-hidroxisteroide-dehidrogenase (HSD3B) ou pelo citocromo p450 (*CYP17A1*). Essas mesmas enzimas esteroidogênicas ajudam a converter a progesterona nos androgênios, androstenediona e testosterona (Labrune et al. 2022).

Depois que a androstenediona é produzida, ela pode se difundir para as células da granulosa imediatamente ou ser convertida em testosterona via 17β -hidroxiesteroide desidrogenase (HSD17B) (Labrune et al. 2022). Todo esse mesmo mecanismo relatado acima pode ocorrer também diretamente nas células da granulosa, através da ligação do FSH ao seu receptor. O colesterol também é clivado em pregnenolona pela CYP11A1 até a formação da androstenediona. Após a androstenediona se difundir das células da teca para as células da granulosa, ou ser produzida na própria célula da granulosa, ela é convertida em estrona, um estrogênio fraco, pela CYP19A1, mediante estímulo do FSH (Heidarzadehpilehrood et al. 2022). A testosterona também se difunde das células da teca para as células da granulosa, onde pode ser convertida junto com a estrona na forma mais potente de estrogênio, o estradiol, via CYP19A1 e HSD17B (**Figura 3**) (Labrune et al. 2022).

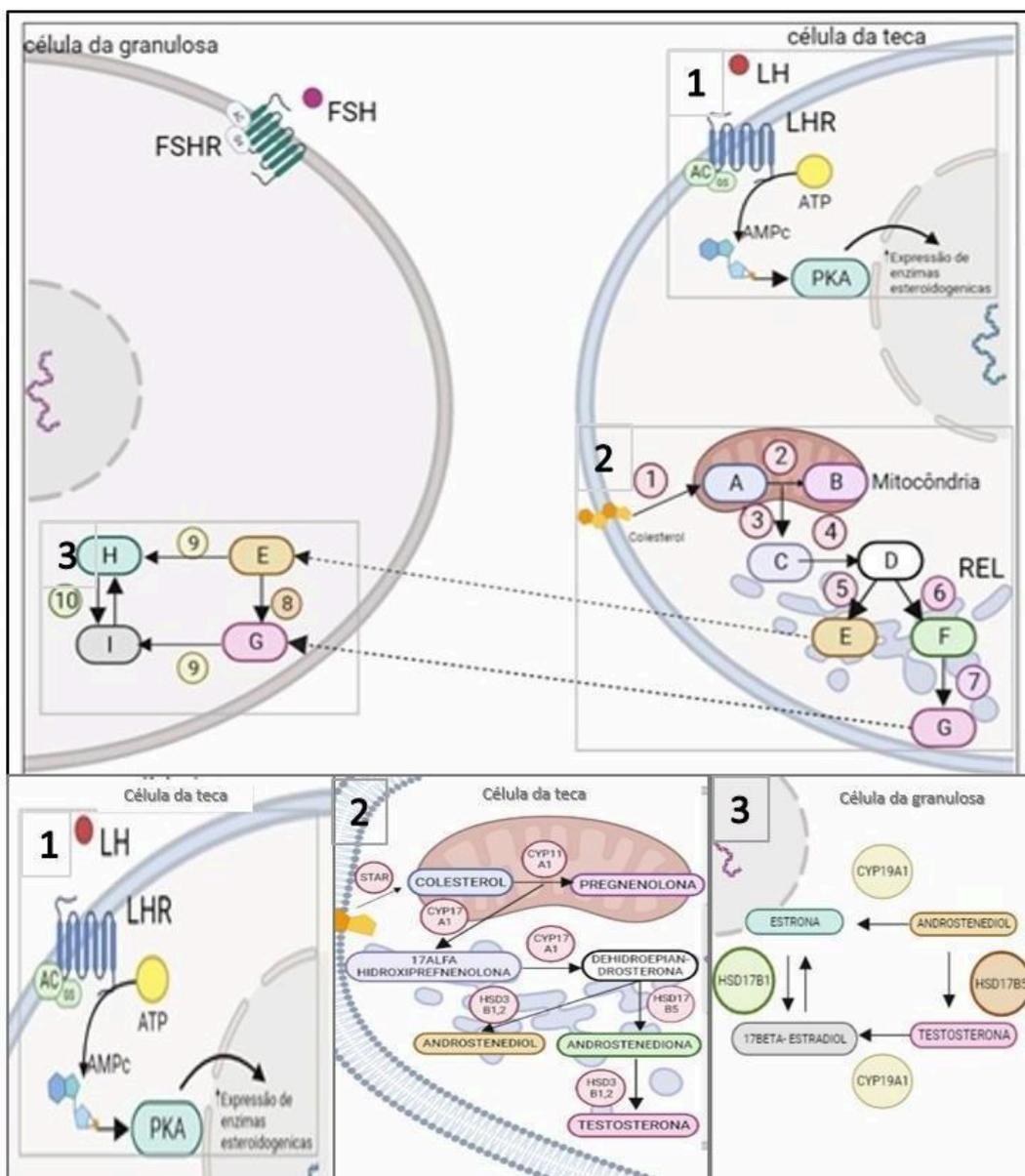


Figura 3 - Via da esteroidogênese nas células da granulosa e da teca-As células da granulosa e da teca simultaneamente podem produzir androstenediona, que pode ser difundida para as células da granulosa, no caso de terem sido produzidas nas células da teca, e sofrer sucessivas clivagens até a formação do estradiol. Adaptado de Heidarzadehpilehrood et al 2022 (Heidarzadehpilehrood et al 2022).

O processo de esteroidogênese regula o crescimento folicular no ovário, determina o estágio do ciclo reprodutivo, mantém e regula a função reprodutiva (Labrune et al. 2022). O mecanismo de ação da esteroidogênese ovariana é mostrado na Figura 3. A compreensão dessas vias da esteroidogênese dentro

do ovário pode fornecer informações importantes sobre as moléculas essenciais que regulam o mecanismo de sinalização nas células ovarianas, principalmente na ovulação e fertilidade (Chakraborty et al. 2021). Já foi demonstrado em estudos em ratos que a liberação de estradiol pelas células da granulosa foi significativamente maior quando estimuladas com Ang 1-7, sendo assim, esse peptídeo poderia auxiliar indiretamente na maturação oocitária através das células somáticas e no aumento na liberação de hormônios esteroidogênicos no microambiente folicular.

1.6. O papel da Ang 1-7 na reprodução

A expressão de mRNA para angiotensinogênio foi observada em ovário de ratos, e o peptídeo correspondente foi detectado nas células da granulosa, no estroma e nas células do corpo lúteo (Thomas e Sernia 1990; Pereira et al. 2009; Paul e Kreutz 2006). Honorato Sampaio *et al.* também observaram mRNA de ECA2 em amostras de ovário de ratas, sugerindo a produção local de Ang 1-7 (Honorato Sampaio et al. 2012). Este peptídeo também foi identificado nas células da teca e intersticiais de oócitos de ratos, e nas células estromais de ovários imaturos e sem estímulo. Entretanto, as células da granulosa de folículos antrais e pré-ovulatórios foram negativas para Ang 1-7 (Pereira *et al.* 2009; Dominska 2020).

Pereira *et al.* (2020) identificaram o MASr por imunocoloração nas células da teca e intersticiais em todas as fases do ciclo estral de ratos. Já nos folículos em estágio inicial de desenvolvimento, as células da granulosa foram negativas para Ang1-7, mas essa marcação foi observada nas células do cumulus de alguns folículos pré-ovulatórios (Pereira et al. 2020). Já em ovários de ratos perfundidos, Ang 1-7 e Ang II induziram a produção de progesterona (Costa *et al.* 2003), efeito este que foi inibido pelo A-779, indicando que a ação da Ang II poderia ser revertida (Reis & Reis, 2020). Ang 1-7 e Ang II também foram capazes de estimular a secreção de estradiol no ovário de ratos (Costa *et al.* 2003), sugerindo que o eixo Ang 1-7/Mas teria capacidade de modular a produção de androgênios no compartimento intersticial da teca. A Ang II, por sua

vez, poderia promover a conversão de androgênio em estrogênio nas células da granulosa (Hilier *et al.* 1994; Reis & Reis 2020).

Em humanos, há um estudo observacional de mulheres submetidas a FIV o qual comprovou que células da granulosa luteinizadas expressam mRNA para MAS e ECA2, sugerindo assim a atuação do SRA na foliculogênese ovariana humana. Este efeito anteriormente tinha sido relacionado apenas à Ang II, e o estudo demonstrou a possibilidade de também envolver o eixo da Ang 1-7/ECA2/Mas (Cavallo *et al.* 2017). Além disso, esse estudo sinaliza que o eixo Ang 1-7/ECA2/Mas está ativado durante o processo de indução da ovulação, pois houve correlação positiva entre a expressão do MASr nas células da granulosa e o número de oócitos MII coletados. E ainda sugerem que os folículos ovarianos maduros podem secretar Ang 1-7, uma vez que os níveis intrafoliculares do peptídeo tiveram correlação positiva com o número de oócitos maduros captados (Cavallo *et al.* 2017).

Mulheres estimuladas com gonadotrofinas durante a preparação para FIV são caracterizadas por um nível elevado de Ang 1-7 no plasma. Mesmo assim, a concentração de Ang 1-7 em seu fluido folicular ainda é menor do que no plasma (Reis *et al.* 2011). Isso provavelmente se deve ao fato de que esse heptapeptídeo é metabolizado muito rapidamente no ovário por NEP ou PEP, enzimas responsáveis pela formação mas também pela clivagem da Ang 1-7. Em pacientes após estimulação ovariana com gonadotrofina urinária humana (hCG) e/ou FSH recombinante (rFSH) observou-se aumento das concentrações plasmáticas de Ang 1-7. Esses achados indicam que FSH e hCG podem mediar a ativação do SRA ovariano (Cavallo *et al.* 2017). Além disso, a correlação negativa entre a expressão do receptor AT1 nas células da granulosa e o número de oócitos maduros foi observada em mulheres com baixa reserva ovariana (Penã *et al.* 2009; Reis e Reis 2020).

Em contraste, Honorato-Sampaio *et al.* (2012) observaram que a estimulação de ovários de ratos com hGC resulta em um nível 4,5 vezes maior de mRNA de ECA2 em comparação com controles, mas sem aumento da expressão do receptor MAS1. Nesse estudo também houve uma imunorreatividade muito maior de Ang 1-7 e ECA2 nos folículos pré-ovulatórios

que foram incubadas por 4 horas com LH. O LH estimulou os níveis de testosterona e diminuiu os níveis de progesterona, mas não influenciou os níveis de estradiol nos folículos pré-ovulatórios. Já a Ang 1-7 sozinha não teve impacto na produção de hormônios sexuais, mas o A779 reduziu os níveis de progesterona e aumentou a testosterona após estimulação com LH. Os autores sugerem que Ang 1-7 poderia regular a atresia folicular regulando o nível de androgênios (Honorato- Sampaio *et al.* 2012), já que androgênios induzem apoptose nas células da granulosa (Bilig et al. 1993) enquanto a progesterona previne esse processo (Peloso e Pappalardo 1994).

Com base nesses achados, o SRA exerce um papel importante na regulação do crescimento e maturação folicular, porém mais estudos são necessários para esclarecer o real papel dos peptídeos do SRA nesse processo, em especial do peptídeo Ang-(1-7), na maturação oocitária em humanos, através da síntese e liberação de hormônios esteroides.

JUSTIFICATIVA

As células do cumulus e da granulosa são modelos já consagrados para o estudo do oócito, devido à sua comunicação bidirecional com o mesmo. As células da granulosa são responsáveis pela liberação hormonal e as células do cumulus são responsáveis pelo transporte de nutrientes e outros peptídeos para dentro do oócito. Este trabalho se propõe a verificar a influência da estimulação com Angiotensina 1-7 nas células do cumulus e da granulosa humanas *in vitro* para a esteroidogênese, e os possíveis mecanismos pelos quais esta influência poderia impactar na maturação oocitária. O entendimento do funcionamento destes mecanismos poderia ajudar na criação de possíveis alvos terapêuticos para estímulo *in vivo* de pacientes que não respondem bem às terapias convencionais de estimulação ovariana.

OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigar o efeito da angiotensina 1-7 sobre a esteroidogênese e maturação das células do cumulus e células da granulosa murais humanas cultivadas *in vitro*.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da angiotensina 1-7 na liberação de estradiol e progesterona pelas células da granulosa murais;
- Avaliar o efeito da angiotensina 1-7 na via de esteroidogênese pelas células da granulosa murais;
- Avaliar o efeito da angiotensina 1-7 na maturação das células do cumulus;
- Investigar possíveis vias de estimulação e inibição da maturação oocitária através das células da granulosa e do cumulus humanas.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Delineamento e descrição da população estudada

Trata-se de um estudo experimental *in vitro*, controlado, pareado, utilizando células do cumulus e células da granulosa luteinizadas de setenta pacientes atendidas no período de julho de 2021 a agosto de 2022 pelo Programa de Fertilização Assistida do Laboratório de Reprodução Humana Professor Aroldo Fernando Camargos do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG). Estas pacientes foram submetidas a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) ou FIV convencional e aceitaram participar da pesquisa através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo B).

Os critérios de exclusão foram a desistência ou revogação do consentimento em participar do estudo, ou não admissão no Programa de fertilização *in vitro*.

Para ser admitida no Programa de fertilização *in vitro*, a paciente deve ter diagnóstico de infertilidade primária ou secundária com indicação de tratamento por FIV ou apresentar algum fator que a impeça de engravidar espontaneamente ou por outros tratamentos de menor complexidade. A paciente deve também apresentar idade inferior a 40 anos no momento de inclusão no programa e índice de massa corporal (IMC) inferior a 30 no momento de início do tratamento.

3.2. Considerações éticas

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP-UFMG) (Projeto: CAAE-0198.0.203.000-11) (Anexo A) e todas as pacientes convidadas a participarem do estudo assinaram o TCLE (anexo B) antes da inclusão no estudo.

3.3. Hiperestimulação ovariana controlada

A hiperestimulação ovariana controlada (HOC) foi realizado de acordo com o protocolo do serviço conforme descrito por Cavallo e colaboradores (2017). Resumidamente, as mulheres foram submetidas a hiperestimulação ovariana individualizada, de acordo com a idade, contagem de folículos antrais

e níveis basais de FSH. O bloqueio hipofisário foi feito com análogo do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRHa) ou com o antagonista do GnRH (cetrorrelix), de acordo com a prescrição médica para cada paciente. A estimulação ovariana foi realizada por rFSH e/ou gonadotrofina urinária humana altamente purificada em doses decrescentes começando com 225 a 300 UI, seguida de monitoramento por ultrassom.

Quando pelo menos um folículo dominante atingiu um diâmetro de 18 mm, HCG recombinante foi administrado na dose de 250 µg. Os folículos foram aspirados ~35 h após a injeção de HCG usando uma agulha de aspiração folicular de calibre 17 conectada a uma sonda transvaginal e uma unidade de sucção artesanal com pressão negativa de 100-200 mmHg. O líquido folicular foi coletado em tubos de ensaio estéreis e os oócitos foram identificados em uma placa de cultura usando uma lupa em capela de fluxo laminar. O sêmen foi preparado pela técnica de *swim up* e a inseminação foi realizada por FIV convencional ou ICSI de acordo com a indicação médica. A fertilização do oócito foi avaliada 18-20 h após a inseminação pela confirmação da presença e localização de dois pró núcleos. As transferências foram realizadas por especialistas com formação no próprio laboratório e experiência similar. Após a transferência embrionária, foi administrada progesterona por via vaginal, na dose de 600 mg/dia, para o suporte de fase lútea, mantida pelo menos até a confirmação ou não de gravidez. Após 14 dias da coleta ovular a paciente foi submetida à dosagem de β-HCG.

3.4. Coleta do líquido folicular e células do cumulus

A coleta das CGMs no Líquido Folicular (LF) foi realizada após a retirada dos oócitos e as células do cumulus foram obtidas após processo de desnudação dos oócitos pela embriologista. O fluxo dos demais experimentos realizados foram seguidos como o fluxograma a seguir:

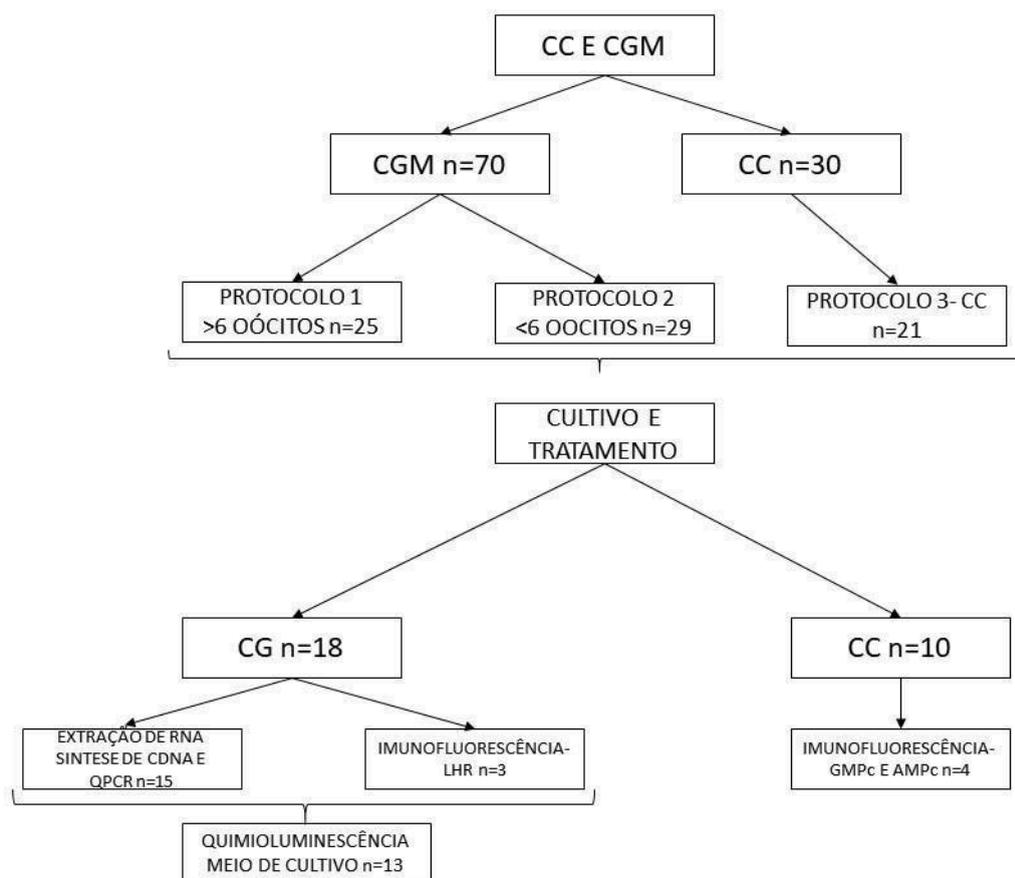


Figura 4- Fluxograma orientador das etapas de processamento e análise das amostras de CCs e CGMs. Das 70 pacientes obtidas durante todo o período da pesquisa, foi possível coletar as CCs e as CGMs de 70 e 30 respectivamente. Após a padronização dos protocolos 1 e 2 para as CGMs realizado com 25 e 29 amostras respectivamente e o protocolo 3 para as CCs realizado com 21 amostras, restaram para o cultivo e passos posteriores 18 amostras de CGMs e 10 amostras de CCs cultivadas *in vitro*. A imunofluorescência para LHR foi realizada para confirmação da pureza do cultivo das CGMs (n=3).

3.5. Isolamento e cultivo das células da granulosa luteinizadas e células do cumulus.

O material de LF para isolamento e cultivo das células da granulosa luteinizadas foi dividido em dois grupos, para realização de protocolos distintos de acordo com a quantidade de oócitos detectados: o protocolo 1 para as pacientes que obtiveram contagem maior ou igual a 6 oócitos, e o protocolo 2 para pacientes que obtiveram contagem menor que 6 oócitos (Han *et al.* 2016, 2021).

3.5.1 Isolamento e cultivo das CGM para >6 oócitos

O LF foi distribuído em tubos de 15ml e centrifugado a 2000 rpm por 15 minutos. O pellet foi ressuscitado com 1ml de PBS para cada tubo, após homogeneização vigorosa. O primeiro gradiente histopaque foi montado, com 1 ml de histopaque e 1 ml do concentrado de células. Foi realizada uma centrifugação a 400g por 20 min e as CGM foram recuperadas na interface da coluna com aspiração lenta e cuidadosa e depositadas em um novo tubo eppendorf. Foi realizada uma nova lavagem com PBS até 2ml e homogeneização vigorosa, depois o material foi centrifugado a 10.000 g por 15 minutos. O pellet foi ressuscitado com 1ml de PBS com o conteúdo transferido para um novo tubo de 15ml. Um volume igual de tripsina EDTA 0,25% foi adicionado e deixado em repouso por 15 minutos à temperatura ambiente. Após esse tempo a tripsina foi inativada com meio de crescimento (DMEM/F12 + 20% FBS + 1% penstrept). Uma nova centrifugação foi realizada a 2000 rpm por 15 minutos, o novo pellet foi ressuscitado com 1ml de PBS e homogeneizado vigorosamente para desfazer os grumos de células. Então um segundo gradiente histopaque foi montado com 1 ml de histopaque e 1 ml do concentrado de células, centrifugado a 400 x g por 20 minutos. As CGLs foram aspiradas na interface e transferidas para um novo tubo, com acréscimo de PBS para completar 2ml. O conteúdo foi novamente centrifugado a 10.000 g por 15 minutos e ressuscitado com 300µl de PBS. O concentrado de células foi corado com trypan blue e a contagem diferencial das células vivas foi feita em câmara de Neubauer.

As células foram plaqueadas a 5×10^4 células por poço, em placa de 48 wells com 300µl de meio de crescimento (DMEM/F12 + 20% FBS + 1% anti anti) e foram mantidas em incubadora a 37°C 7%CO₂ por 48 horas (**Figura 5**).



Figura 5- Protocolo de cultivo das CGM com quantidade >6oócitos. O LF passou por sucessivas lavagens com PBS, duas colunas histopaque e tripsina, para isolamento e purificação das CGM. O plaqueamento foi realizado com 5×10^4 células por poço, em placa de 48 poços, e o cultivo foi realizado a 37°C com meio DMEM\F12 + 20% FBS + 1% anti anti, por 48hrs.

3.5.2 Isolamento e cultivo das CGL para <6 oócitos

O LF foi distribuído em tubos de 15ml e centrifugado a 2000 rpm por 15 minutos. O pellet foi então ressuscitado com 1ml de PBS, após homogeneização vigorosa. Foi realizada uma nova lavagem com PBS até 2ml e nova homogeneização, depois o material foi centrifugado a 10.000 g por 15 minutos. O pellet foi ressuscitado com 1ml de PBS e o conteúdo foi transferido para um novo tubo de 15ml. Um volume igual de tripsina EDTA 0,25% foi adicionado e deixado em repouso por 15 minutos à temperatura ambiente. Após esse tempo, a tripsina foi inativada com meio de crescimento (DMEM/F12 + 20% FBS + 1% penstrept). Uma nova centrifugação foi realizada a 2000 rpm por 15 minutos, o novo pellet foi ressuscitado com 1ml de PBS e homogeneizado vigorosamente para desfazer os grumos de células. Então foi realizado um gradiente histopaque com 1 ml de histopaque e 1 ml do concentrado de células, centrifugado a $400 \times g$ por 20 minutos. As CGLs foram aspiradas na interface e transferidas para um novo tubo, ao qual se adicionou PBS para completar 2ml. O conteúdo foi novamente centrifugado a 10.000 g por 15 minutos e ressuscitado com $300\mu\text{l}$ de PBS. O concentrado de células foi corado com trypan blue a contagem diferencial das células vivas em câmara de Neubauer.

As células foram plaqueadas a 5×10^4 células por poço, em placa de 48 wells com 300µl de meio de crescimento (DMEM/F12 + 20% FBS + 1% anti anti) e foram mantidas em incubadora a 37°C 7%CO₂ por 48 horas (Figura 6).



Figura 6- Protocolo de cultivo das CGM com quantidade <60ócitos. O LF passou por sucessivas lavagens com PBS, tripsina e apenas uma coluna histopaque, para isolamento e purificação das CGM. O plaqueamento foi realizado com 5×10^4 células por poço, em placa de 48 poços, e o cultivo foi realizado a 37°C com meio DMEM\F12 + 20% FBS + 1% anti anti, por 48hrs.

3.5.3 Isolamento e cultivo das CC

As CCs recebidas em placa contendo meio foram pipetadas para eppendorf uma a uma, com cuidado para pipetar o mínimo de meio possível. Foram adicionados 100 µL de hialuronidase e, após vários *up* e *down* com a pipeta por 30 segundos, a enzima foi inativada com 500µl do meio de crescimento (DMEM\F12 + 20% FBS + 1% anti anti). Depois, foram centrifugadas a 100 x g por 10 min e ressuspendidas com 500µl de PBS. Foi realizada uma diluição com trypan blue (1:2) e contagem diretamente na Câmara de Neubauer. As CCs foram então plaqueadas a 5×10^4 células por poço em placa de 96 wells com 200µl de meio de crescimento. As células foram mantidas em incubadora a 37°C 7%CO₂ por 48 horas (Figura 7).

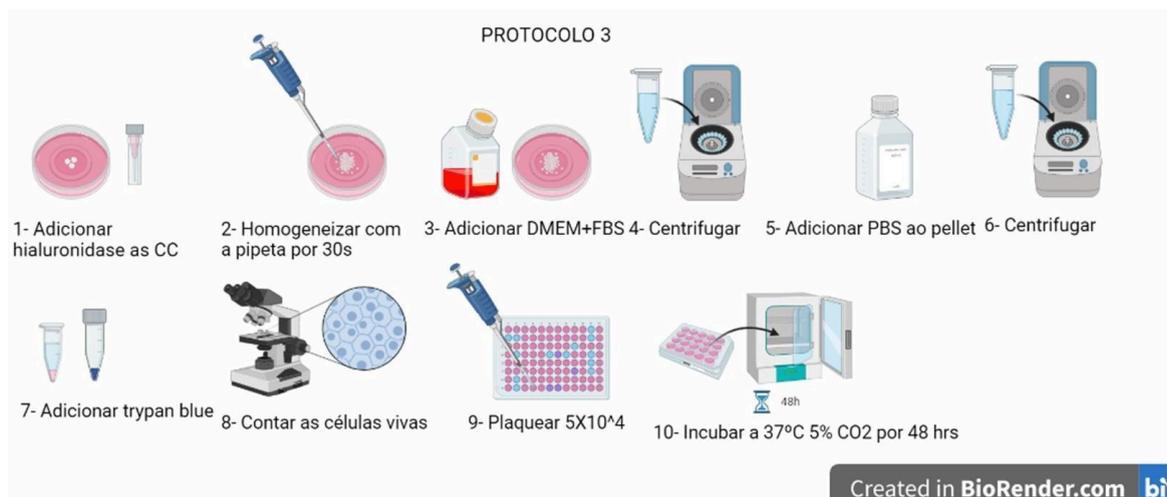


Figura 7- Protocolo de cultivo das CCs. O produto da denudação dos oócitos foi dissociado com hialuronidase, a qual foi inativada com FBS em DMEM, e lavado com PBS. O plaqueamento foi realizado com 5×10^4 células por poço, em placa de 96 poços, e o cultivo foi realizado a 37°C com meio DMEM\F12 + 20% FBS + 1% anti anti, por 48hrs.

3.5.4 Tratamento dos cultivos com Angiotensina 1-7 e A779

Após 48 horas de cultivo, DIA 2 (D2), as células foram observadas na lupa para verificar a confluência igual ou superior a 80%. Somente dos cultivos que apresentaram mais de 80% de confluência, foi realizada a troca do meio de cultivo pelo meio de carvão ativado (DMEMF12 + 10% CSS + 1% anti anti) para retirada o FBS, por 24 horas, para retirar o FBS dos cultivos.

No D3 (72 horas de cultivo) o meio de carvão ativado foi retirado e substituído por tratamento com 300 μl de Ang 1-7 nas concentrações 10^{-10}M , 10^{-8}M , 10^{-6}M , A779 10^{-8}M +ang 10^{-6}M , A779 10^{-8}M +ANG 1-7 10^{-8}M ou A779 10^{-8}M e o controle negativo, mantidos por 24hrs. Após esse tempo de teste (em D4), o meio foi aspirado e armazenado a -80°C para posterior análise. As células em cultivo que estavam aderidas à placa foram submetidas ao protocolo de tripsinização, ou fixação de acordo com a análise a ser realizada.

3.6. Protocolo de tripsinização

O protocolo de tripsinização começou com a retirada do meio de tratamento e depois a lavagem com PBS e homogeneização. Após a retirada do

PBS foram adicionados 100µl de tripsina 0,25% (Gibco™ cat. Nº 25200056) em cada poço por 3 minutos. Deixamos as células na incubadora a 37°C durante esse período. Para bloquear a atividade da tripsina, foi adicionado meio de crescimento DMEM (20% FBS + 1% penstrep) após o tempo estimado. Depois de devidamente identificada, a solução de células foi centrifugada por 8 min a 1300 x g. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido com DMEM. Após uma nova centrifugação de 8 minutos a 1300 x g o pellet foi ressuspendido com Trizol™ (ThermoFisher scientific cat. 15596026) e congelado a -80°C até a extração de RNA.

3.7. Ensaio imunoenzimático e quimioluminescência

As dosagens de progesterona e estradiol foram feitas por ensaio imunoenzimático (ELISA) de competição e também por ensaio de quimioluminescência automatizado.

O Elisa de competição foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante. Os kits foram adquiridos da Elabscience (Elabscience Biotechnology- USA Catalog No: E-EL-0150; Catalog No: E-EL-0154, estradiol e Progesterona, respectivamente). A sensibilidade do teste foi de 5,63 pg/ml e 0,15 ng/ml e o limite de detecção foi de 9,37-600pg/ml e 0,31-20 ng/ml para estradiol e progesterona, respectivamente. Nenhuma reação cruzada ou interferência entre progesterona ou estradiol e análogos foi observada. O ensaio foi realizado em duplicata como manda o kit e os coeficientes de variação para ambas as dosagens foram <10%. A leitura da absorbância foi realizada em um leitor de microplacas a 450nm. Os resultados foram convertidos para a concentração de estradiol (pg/ml) e progesterona (ng/ml) por regressão linear usando a curva padrão do teste.

As dosagens realizadas pelo método de imunensaio automatizado (ARCHITECT) cujo princípio foi a quimioluminescência, estão descritas a seguir. Para a dosagem de estradiol, a amostra, o diluente da amostra, o diluente do ensaio e as micropartículas paramagnéticas revestidas de anticorpos anti-estradiol (de coelho, monoclonais) são combinados. O estradiol presente na amostra liga-se às micropartículas revestidas de anticorpos anti-estradiol. Após a incubação, o conjugado de estradiol marcado com acridínio é adicionado à

mistura de reação. Após outra incubação e lavagem, as soluções Pré-Ativadora e Ativadora são adicionadas à mistura de reação. A reação quimioluminescente resultante é medida em unidades de luz relativas (RLUs). Há uma relação inversa entre a quantidade de estradiol na amostra e as RLUs detectadas pela ótica do ARCHITECT iSystem.

Para a dosagem de progesterona, a amostra, as micropartículas paramagnéticas revestidas de um complexo de anticorpos anti-fluoresceína (de camundongo, monoclonais) e progesterona marcada com fluoresceína, e o conjugado de anticorpos anti-progesterona (de ovelha, monoclonais) marcado com acridínio são combinados para criar uma mistura de reação. A progesterona presente na amostra compete com o complexo de anticorpos anti-fluoresceína (de camundongo, monoclonais) e progesterona marcada com fluoresceína pela ligação com o conjugado de anticorpos anti-progesterona (de ovelha, monoclonais) marcado com acridínio para formar complexos anticorpo-antígeno- anticorpo. 2. Após a lavagem, as soluções Pré-Ativadora e Ativadora são adicionadas à mistura de reação. 3. A reação quimioluminescente resultante é medida em RLUs. Há uma relação inversa entre a quantidade de progesterona na amostra e as RLUs detectadas pela ótica do ARCHITECT iSystem.

3.8. Extração de RNA, Síntese de cDNA e qPCR

A expressão de RNA mensageiro (mRNA) de *StAR*, *CYP11A1*, *HSD17B*, *HSD17B*, *CYP19A1*, *HSD3B2*, *MASR* e *LHR* foi avaliada nas CGMs por reverse- transcriptase quantitativa reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT- PCR).

Para o processamento, as amostras de CGMs armazenadas em Reagente TRIzol® foram retiradas do freezer a -80°C e mantidas em temperatura ambiente até o completo descongelamento, seguido de vigorosa homogeneização em vórtex. O RNA foi extraído usando o protocolo TRIzol®, não modificado. O RNA total foi extraído e quantificado por absorvância de luz a 260 nm (NanoDrop - Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, EUA). O ácido desoxirribonucleico complementar de primeira fita (cDNA) foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA total usando o sistema de síntese de primeira fita

Superscript III (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). O PCR em tempo real foi realizado como descrito anteriormente (Pereira *et al.* 2008) em um ABI-Prism 7500 Sequence Detection System, com uso do corante fluorescente Power SYBR Green Master Mix Kit (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Os parâmetros de PCR foram: [Fase 1] um ciclo de 95°C/10min; [Fase 2] 40 ciclos de 95°C/15 segundos, 60°C/15 segundos e 72°C/20 segundos; [Fase 3] 95 °C / 15 segundos, 54 °C / 15 segundos e 95 °C / 15 segundos. O gene que codifica a proteína ribossomal S26 foi usado como controle interno. As sequências de primers sintetizadas usadas para amplificação por PCR são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Oligos da via esteroidogênica, MASR, LHR e suas sequências correspondentes

Gene	Proteína	FW 5'-3'	Referência
<i>StAR</i>	StAR	GGCATCCTTAGCAACCAAGA	Mularoni et al. 2020
<i>CYP11A1</i>	P450scc	CCTGTTCCGCTTTGCCTTTG	Mularoni et al. 2020
<i>3β-HSD2</i>	HSD3B2	CCACACCGCCTGTATCATTG	Mularoni et al. 2020
<i>17β-HSD1</i>	HSD17B1	GGACGCGTGTTGGTGACCG	Shaughnessy et al. 2013
<i>17β-HSD2</i>	HSD17B2	AGGCTGGCATCTTATGGCTC	Shaughnessy et al. 2013
<i>CYP19A1</i>	P450arom	TCACTGGCCTTTTTCTCTTGGT	Shaughnessy et al. 2013
<i>LHR</i>	Receptor de LH	GCCGGTCTCACTCGACTATC	Casalechi et al. 2019
<i>MASR</i>	Receptor MAS	TTCCGGATGAGAAGAAATCC	Cavallo et al. 2017

Os primers foram projetados para abranger íntron-éxon e, portanto, hibridizam apenas o cDNA. A especificidade dos produtos de PCR foi confirmada por curvas de dissociação (ou curvas *de melting* em inglês) com um único pico. Não houve amplificação de fragmentos para amostras de controle negativo preparadas sem transcriptase reversa. Os valores de CT (do inglês *cycle threshold*) foram normalizados para S26 e a expressão gênica diferencial entre

os grupos foi expressa como a diferença do CT do normalizador S26 e o CT de cada primer (Δ CT).

3.9. Imunofluorescência

Após a retirada do meio de tratamento, as culturas de células selecionadas para imunofluorescência das CGLs e as placas com CCs foram lavadas com PBS por 3 vezes e depois fixadas com para formaldeído (4% (v/v) em PBS) e permeabilizadas com a solução de permeabilização (0,1% de Triton™ X100 [Sigma-Aldrich Cat. No.: 9036-19], 4% BSA [Sigma-Aldrich Cat. No: 9048- 46-8] em PBS) por 2 horas. As células foram incubadas *overnight* com o anticorpo primário anti-LHR 1:100 para as CGL ou mix de anti- GMPC (Thermo Fisher scientific- Cat. No: 500-9534) e anti- AMPc (Thermo Fisher scientific- Cat. No: BS-3892R) (1:150) nas CCs. No dia seguinte as placas foram lavadas três vezes e incubadas a temperatura ambiente e protegidas da luz por 1 hora com o mix dos anticorpos secundários Alexa-Fluor™ 488 (Thermo Fisher Scientific- Cat. No: A-11008) e Alexa-Fluor™ 546 (Thermo Fisher Scientific- Cat. No: A- 11003) (1:500) para as CC e Alexa-Fluor™ 488 (Thermo Fisher Scientific- Cat. No: A-11008) 1:500 para as CGL. As placas foram então lavadas três vezes com PBS e coradas com DAPI (Thermo Fisher Scientific- Cat. No: 62248) (1:50.000) por 3 minutos, e após foram lavadas mais duas vezes com PBS. A visualização foi realizada no Centro de processamento e aquisição de imagem da UFMG (CAPI- UFMG) no Cytation (Cytation 5 Cell Imaging- Biotek), e o tratamento e aquisição da imagem foi realizada pelo software Gen5.

3.10. Análise Estatística

Os valores encontrados referentes aos dados clínicos das pacientes incluídas no estudo foram organizados em tabela e as médias e medianas foram calculadas. O teste Kolmogorov- Smirnov foi realizado a fim de verificar a distribuição dos dados e avaliar qual teste para análise da variância seria o mais adequado. Os dados apresentaram distribuição não normal e a comparação entre os três grupos foi avaliada pelo teste de Kruskal Wallis. As análises estatísticas e os gráficos foram feitos utilizando o GraphPadPrism 6.0 e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

4.1. Caracterização da amostra

Tabela 2- Variáveis descritivas da população estudada

VARIÁVEIS	N=54	
IDADE	37,9 (30-42)	
QUANTIDADE DE FOLICULOS >16 US (média + DP)	5,6+/-4,6	
QUANTIDADE DE FOLICULOS <16 US (média + DP)	6,9+/-5,3	
OÓCITOS PUNÇIONADOS (mediana+ min. e max)	6 (3-30)	
TEMPO DE INFERTILIDADE (anos)	9 (4-16)	
CFA- CONTAGEM DE FOLICULOS ANTRAIS (mediana+ min. Max)	10 (3-48)	
COMPLICAÇÕES/ DOENÇAS PRÉ EXISTENTES:		
ENDOMETRIOSE	17,6% (n=9)	
PCOS	5,9% (n=3)	
HIPOTIREODISMO	31,31% (n=16)	
HIPERPROLACTINEMIA	5,9%(n=3)	
CAUSAS DE INFERTILIDADE:	N	%
ISCA	6	11,1
ENDOMETRIOSE	2	3,7
ENDOMETRIOSE + FATOR TUBO PERITONIAL	5	9,3
FATOR MASCULINO	22	40,7
FATOR MASCULINO + ENDOMETRIOSE	3	5,6
FATOR MASCULINO+ TUBO PERITONIAL	5	9,3
FATOR OVARIANO- SOP	2	3,7
FATOR TUBO PERITONIAL	6	11,1
FATOR TUBO PERITONIAL + ENDOMETRIOSE	1	1,9
PRODUÇÃO INDEPENDENTE	2	3,7
total:	54	100

Os dados referentes a caracterização dos pacientes das amostras coletadas estão descritos na tabela 2. Totalizando uma amostra de 54 participantes com média de idade de 37,9 anos, tempo de infertilidade de 4 a 16 anos e contagem de folículos antrais de 3 a 48 folículos. Das doenças pré-existentes mais comuns entre os participantes estão hipotireoidismo (31,3%) e endometriose (17,6%), a causa de infertilidade mais comum foi por fator masculino (40,7%) e a menos comum foi a associação de fator tubo peritoneal e endometriose (1,9%).

4.2. Não houve diferença de liberação de estradiol e progesterona entre os grupos de tratamento e controles

A dosagem da liberação de progesterona e estradiol no meio de cultivo das células da granulosa tratadas não apresentou diferença em relação ao controle sem tratamento.

Foi realizada dosagem de Progesterona no meio de cultivo das células da granulosa tratadas com três diferentes doses de angiotensina 1-7 e seu antagonista A779, e não houve diferença significativa em relação ao controle não tratado ($P=0,65$). Nesse mesmo grupo foi realizada dosagem de estradiol que também não diferiu em relação ao controle não tratado ($P=0,40$).

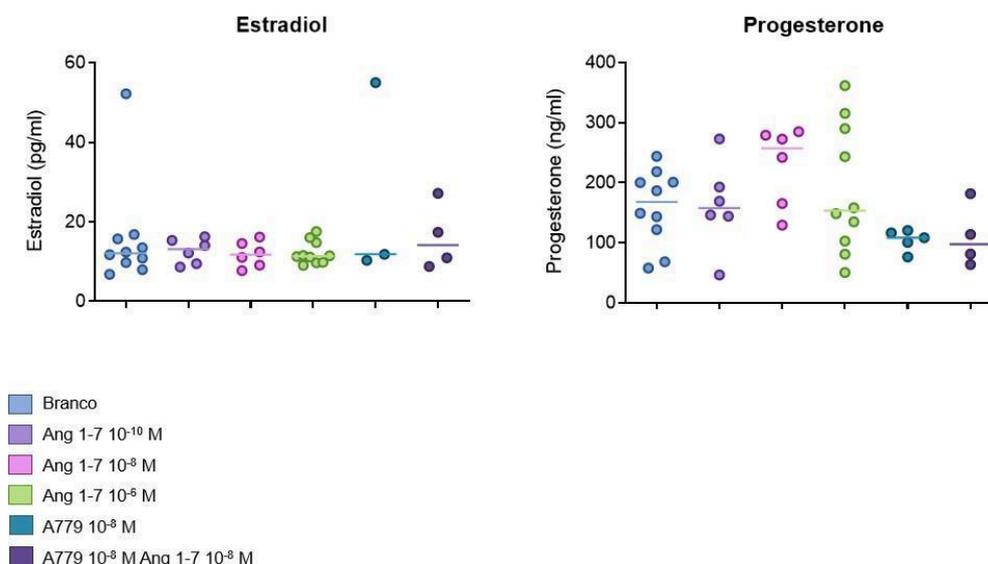
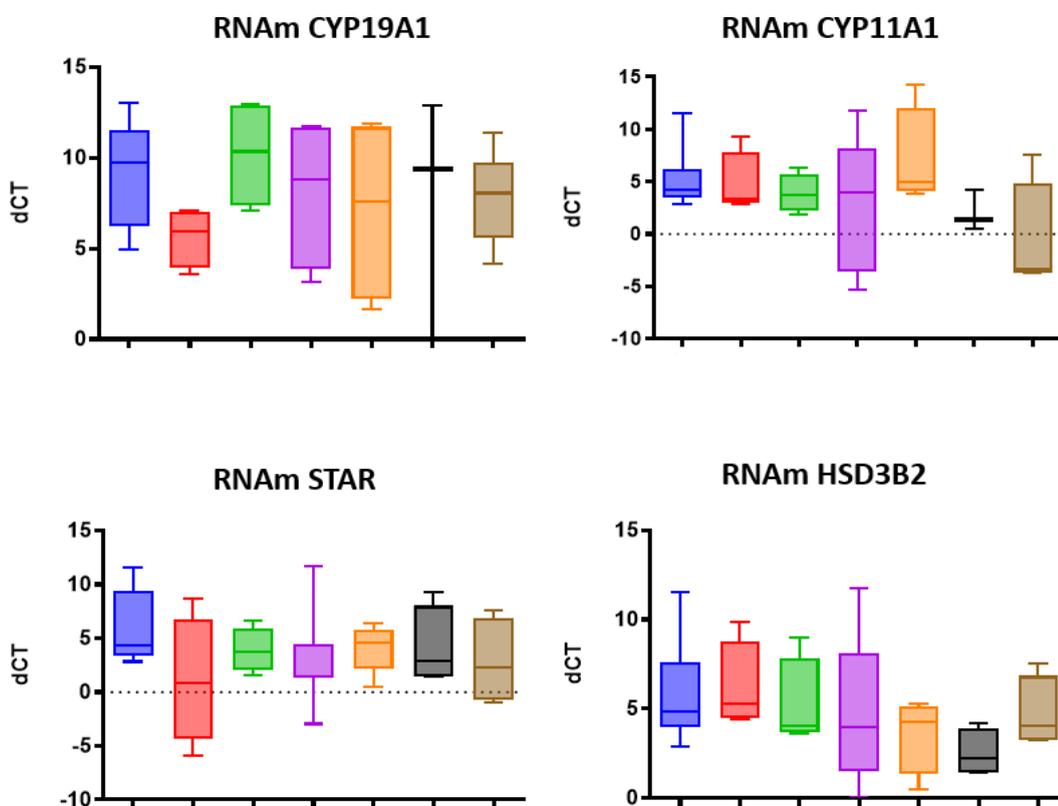


Figura 8 - Níveis de liberação de estradiol e progesterona pelas CGMs luteinizadas cultivadas *in vitro*. Células da Granulosa luteinizadas, com 15 cultivos distintos foram submetidas a tratamento com a Angiotensina 1-7 nas concentrações 10^{-10} M, 10^{-8} M e 10^{-6} M o antagonista A779 10^{-8} M isolado ou acompanhado de Angiotensina 1-7 10^{-8} M por 24 horas. Representação gráfica dos resultados de liberação hormonal de estradiol e progesterona. Os resultados nos gráficos representam mediana, máximo e mínimo.

4.3. Os níveis de expressão de *CYP19A1*, *CYP11A1*, *STAR*, *HSD3B2*, *HSD17b1* e *HSD17b2* não diferiram entre os grupos

O tratamento com Angiotensina 1-7 e seu antagonista A779 por 24hrs nas células da granulosa cultivadas *in vitro* não alterou a expressão de *CYP19A1*, *CYP11A1*, *STAR*, *HSD3B2*, *HSD17b1* e *HSD17b2* quando comparado as amostras controle, sem tratamento (P=0,60; *CYP19A1*) (P=0,69; *STAR*) (P=; 0,25; *HSD3B2*) (p=0,83; *HSD17B1*) (p=0,36; *HSD17B2*).



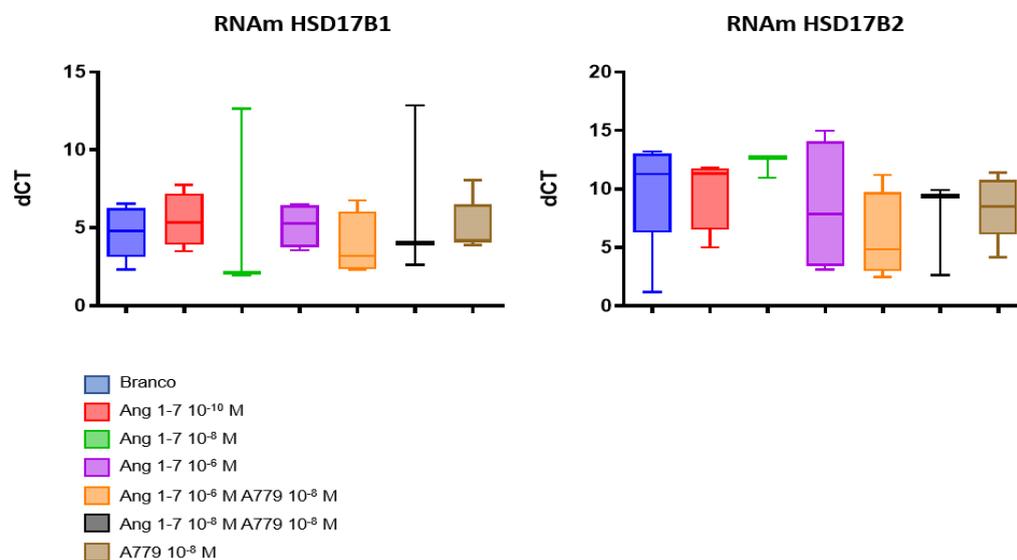


Figura 9- Níveis de expressão relativa (Δ CT) de *CYP19A1*, *CYP11A1*, *STAR*, *HSD3B2*, *HSD17b1* e *HSD17b2* em amostras de CGMs luteinizadas cultivadas *in vitro*. Os níveis de expressão dos primers da via esteroidogênica com 15 cultivos distintos que foram submetidas a tratamento com a Angiotensina 1-7 nas concentrações 10⁻¹⁰M, 10⁻⁸M e 10⁻⁶M o antagonista A779 10⁻⁸M isolado ou acompanhado de Angiotensina 1-7 10⁻⁸M por 24 horas. Representação gráfica dos Δ CTs, que são a diferença do CT do primer normalizador, S26, e do CT do primer de interesse. Os resultados são representados como mediana, mínimo e máximo.

4.4. Houve expressão de MASR e LHR em todos os grupos de tratamento.

O tratamento com Angiotensina 1-7 e seu antagonista A779 por 24hrs nas células da granulosa cultivadas *in vitro* não alterou a expressão dos receptores MAS e LH quando comparado a expressão destes receptores nas amostras controle, sem tratamento ($p=0,67$; MASR) ($P= 0,34$; LHR), estes estavam presentes em todos os grupos de tratamento.

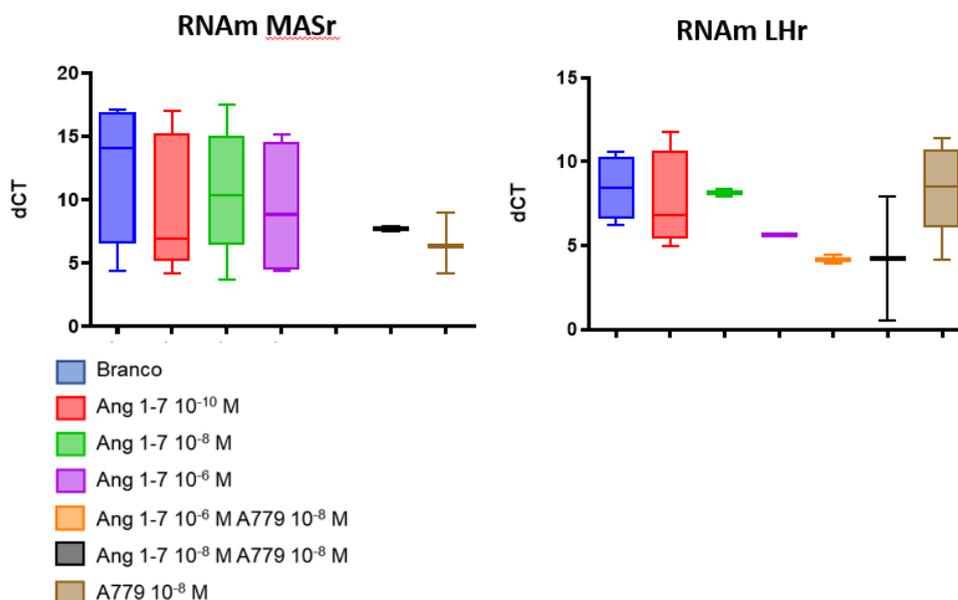


Figura 10- Níveis de expressão relativa (Δ CT) de MASR e LHR em amostras de CGMs cultivadas *in vitro*. Os níveis de expressão mRNA dos receptores MAS e LH de 15 cultivos distintos que foram submetidas a tratamento com a Angiotensina 1-7 nas concentrações 10⁻¹⁰M, 10⁻⁸M e 10⁻⁶M o antagonista A779 10⁻⁸M isolado ou acompanhado de Angiotensina 1-7 10⁻⁸M por 24 horas. Representação gráfica dos Δ CTs, que são a diferença do CT do primer normalizador, S26, e do CT do primer de interesse. Os resultados são representados como mediana, mínimo e máximo.

4.5. Houve detecção de receptor LH nas células da granulosa cultivadas *in vitro*

As células da granulosa, após cultivo por 72horas apresentavam expressão do LHR. Após troca de meio em 48 horas de cultivo e retirada do FBS destas células (**Figura 11**).

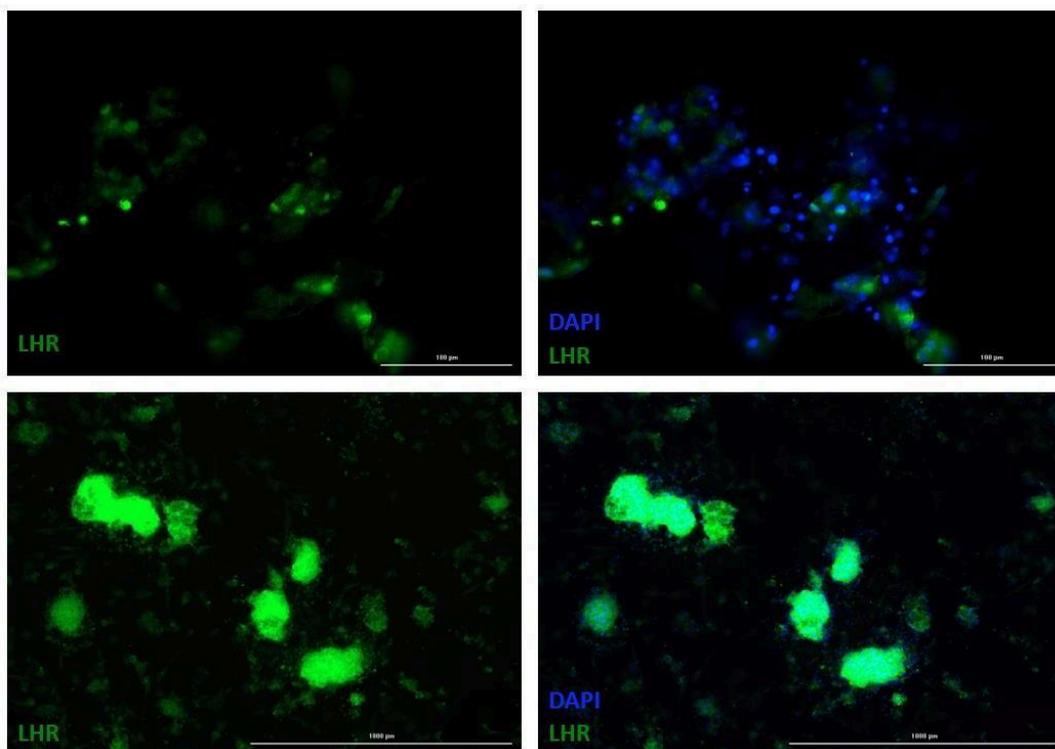


Figura 11 - Identificação e caracterização das CGMs com anti LHR. As CGMs foram cultivadas por 72hrs sem nenhum tratamento, com troca de meio realizada a 48 horas, depois foram fixadas com formaldeído 4%. N=3. Filtros utilizados para fluorescência: Ex:377 Em:447 (DAPI), Excitação: 469 Emissão: 525 (GFP), Excitação:531 Emissão: 593 (RFP), Escala de barras de 1000um, e magnificação de 4X.

4.6. Houve detecção de GMPc e AMPc em todos os grupos de tratamento nas células do cumulus cultivadas *in vitro*

O resultado de imunofluorescência para os anticorpos anti-GMPc e anti-AMPc foi eficiente em detectar esses nucleotídeos nas células da granulosa na presença de Ang 10^{-6} M, A79910 $^{-8}$ M + Ang 10^{-6} M, e nas amostras controle. Porém não foi possível observar diferença na expressão de GMPc ou AMPc para os tratamentos em relação ao controle.

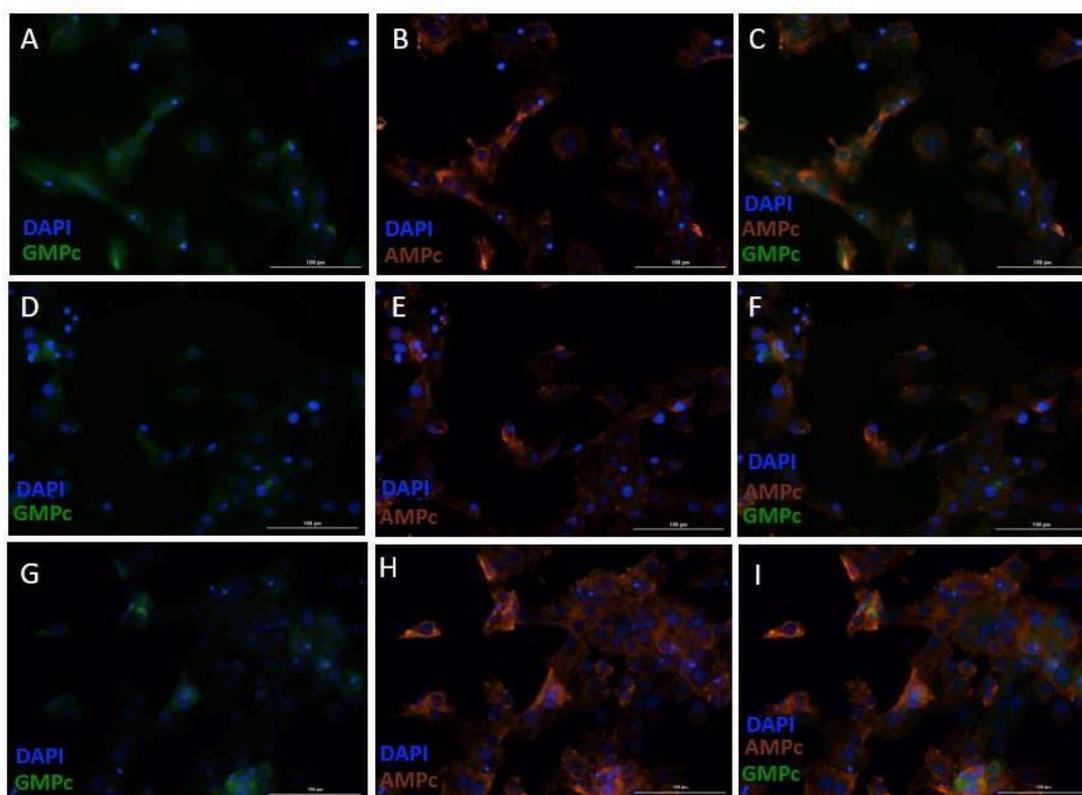


Figura 12- Imunofluorescência para GMPc e AMPc em CCs. As células foram cultivadas por 72hrs tratadas com Ang10-6 (A-C); Ang10-6+A799 D-F e Branco G-I. Filtros de fluorescência: Ex:377 Em:447 (DAPI), Excitação: 469 Emissão: 525 (GFP), Excitação:531 Emissão: 593 (RFP) em aumento de 100um, e magnificação de 20X. n=4 para todos os tratamentos.

DISCUSSÃO

Uma das principais dificuldades dentro dos centros de reprodução humana é como conduzir as pacientes más-responderas à estimulação ovariana padrão, cujo principal objetivo é a maturação dos folículos ovarianos, indução da ovulação e captação de oócitos maduros para FIV ou ICSI. O estudo das características individuais de cada paciente e a investigação das principais causas de má resposta aos medicamentos padronizados poderia contribuir para a melhora desse problema.

Neste trabalho, o fator masculino foi a maior causa de infertilidade entre a população estudada, hipotireoidismo e endometriose foram as principais doenças progressas descritas e a idade das pacientes apresentou média de 37,9 anos. Estatísticas da OMS mostram que 50 a 80 milhões de pessoas em todo o mundo podem ser inférteis. No Brasil, esse número chega a cerca de 8 milhões. As causas da infertilidade são diversas e podem ser femininas, masculinas ou devido à associação de dificuldades dos dois componentes do casal. Atualmente, é estimado que cerca de 35% dos casos de infertilidade estão relacionados à mulher, cerca de 35% estão relacionados ao homem, 20% a ambos e 10% são provocados por causas desconhecidas. E entre 25 a 50% das mulheres inférteis apresentam endometriose, já das que já têm endometriose 30 a 50% são inférteis (Bulletei *et al.* 2010; Tanbo e Fedorcsak 2017).

A angiotensina 1-7 e seu antagonista não foram capazes de induzir maior liberação de progesterona e estradiol pelas CGM, segundo o resultado das dosagens hormonais no meio de cultivo. Estudo anterior de Honorato Sampaio e colaboradores (2012) avaliou os níveis de progesterona (P4) e estradiol (E2) em folículos de ratas cultivados por 48hrs na presença ou ausência de angiotensina 1-7, e também não identificou diferença na liberação destes esteroides em relação ao meio de cultivo sem tratamento. Outros estudos anteriores mostraram que Ang 1-7 estimulou a liberação de E2 e P4 de ovários perfundidos com Ang 1-7 *in vitro* (Viana et al. 2011). Esta diferença de resultados pode ser explicada pela diferença de modelos estudados, uma vez que os ratos perfundidos apresentam vários folículos em estágios diferentes do ciclo celular,

e também porque nosso estudo se propôs a estudar as células do cumulus e da granulosa em cultivos isolados, e não os folículos inteiros de humanos, devido à dificuldade de se conseguir este tipo de amostra em humanos.

Para verificar se a ausência de estímulo seria apenas na liberação de P4 e E2 pelas CGMs ou em toda a via de produção hormonal, verificamos a expressão das principais enzimas envolvidas na síntese de P4 e E2 pela célula sob estímulo com Ang 1-7. Foi possível verificar que não houve diferença de expressão em nenhuma dessas enzimas em relação aos cultivos não estimulados. Ainda foi possível comprovar que o receptor específico de Ang 1-7, o MASR, estava sendo expresso em todos os cultivos, assim como o LHR que também foi detectado na imunofluorescência. Estes resultados estão de acordo com o resultado encontrado nas dosagens hormonais, reforçando mais uma vez que para o modelo de CGM humanas cultivadas não parece haver aumento da produção de E2 ou P4 quando estas células são estimuladas com Ang1-7 ou A779.

Um estudo de cultivo de CGM humanas expostas à combinação de LH, FSH e hCG por 16 h verificou aumento na expressão de mRNA para STAR e CYP19A1 (Yung et al. 2022). Outro trabalho recente demonstrou que o tratamento com doses e tempos diferentes de LH em CGM luteinizadas de humanos cultivadas *in vitro* induziu um aumento na liberação de P4 quando comparado ao controle (Sperduti et al. 2022). No trabalho do Honorato Sampaio *et al.* (2012) também foi possível observar aumento de liberação de P4 e E2 nos cultivos estimulados com LH. Porém, um estudo de Bildik e colaboradores demonstrou que as células da granulosa luteinizadas coletadas de ciclos naturais são capazes de manter sua viabilidade, atividade esteroidogênica e expressão do receptor de LH por mais tempo do que aquelas de ciclos de fertilização *in vitro* estimulados (Bildik *et al.* 2019). Os autores explicam que os níveis supra fisiológicos de esteroides produzidos por múltiplos folículos durante a estimulação ovariana inibem a liberação de LH por meio de feedback negativo no eixo hipotálamo-hipófise-ovariano, o que reduz a viabilidade e a capacidade esteroidogênica das células da granulosa luteinizadas obtidas em ciclos estimulados de FIV, comparados a ciclos naturais (Gamze Bildik et al. 2019). Dessa forma, a administração de LH antes ou durante o tratamento com a Ang

1-7 poderia melhorar a resposta dessas células ao peptídeo. Como este é o primeiro trabalho a realizar o cultivo de CGM luteinizadas humanas estimuladas com Ang1-7 para verificar a atividade esteroidogênica, há outras possíveis explicações para a ausência de resposta, além da falta de pré-estímulo com LH, que mereceriam ser avaliadas. Por exemplo, é possível que seja obrigatória a manutenção da estrutura tecidual íntegra, com suas diversas camadas e tipos celulares, para que os mecanismos parácrinos ovarianos traduzam o estímulo inicial da Ang1-7 em aumento da produção de E2 e P4.

Houve detecção de AMPc e GMPc nas células do cumulus estimuladas com Ang 1-7, porém não foi possível identificar se o tratamento com Ang1-7 alterou quantitativamente a expressão de AMPc ou GMPc. Estudos prévios demonstram que as CGs e CC são interligadas por junções GAP que permitem as trocas metabólicas e o transporte de pequenas moléculas entre si, como o AMPc e GMPc. A partir da ligação do LH ou FSH nas células da granulosa há um aumento de GMPc e AMPc, os quais se difundem para as CC. O peptídeo natriurético C promove a produção de mais GMPc no interior das CC, através da ligação ao receptor NPR2. Esse GMPc então difunde-se para o oócito via junção GAP e inibe a atividade de PDE3A suprimindo a hidrólise do AMPc e mantendo a parada meiótica do oócito pela ativação da PKA. O AMPc pode também vir a se acumular dentro das células do cumulus a partir da ligação de FSH na sua superfície e ser difundido também para o oócito. Assim, AMPc e GMPc podem promover ou inibir a maturação oocitária respectivamente de acordo com o que será difundido para o oócito (Gilchrist et al. 2019). Entretanto, neste trabalho a detecção de GMPc e AMPc foi perceptível em todos os grupos de tratamento.

Apesar das limitações do presente estudo, este foi o primeiro trabalho a avaliar a relação das células da granulosa e do cumulus humanas cultivadas *in vitro* com a via esteroidogênica após estímulo com Angiotensina 1-7. A ausência de efeito da Ang 1-7 sobre a esteroidogênese neste modelo *in vitro* de células humanas contrasta com observações prévias em outras espécies e não parece estar associada a falta do receptor MAS. O possível efeito da Ang 1-7 não ficou demonstrado no ovário humano, mas essa hipótese ainda precisa ser avaliada em diferentes condições experimentais, como por exemplo o estímulo prévio ou concomitante com LH ou hCG.

CONCLUSÃO

Podemos concluir que para o modelo de CGM humanas cultivadas não há aumento da liberação de estradiol ou progesterona e nem da expressão gênica de enzimas esteroidogênicas quando estas células são estimuladas com Ang 1-7 ou com seu antagonista A779. Houve detecção de GMPc e AMPc nas CCs tratadas com Ang 1-7, porém não foi possível observar se esta detecção diferiu significativamente entre os grupos tratados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGHADAVID, Esmat *et al.* Isolation of granulosa cells from follicular fluid; applications in biomedical and molecular biology experiments. **Advanced Biomedical Research**, [s. l.], v. 4, p. 250, 2015. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4746942/>. Acesso em: 2 dez. 2022.

BILDIK, Gamze *et al.* Luteal granulosa cells from natural cycles are more capable of maintaining their viability, steroidogenic activity and LH receptor expression than those of stimulated IVF cycles. **Human Reproduction**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 345–355, 2018. Disponível em: Acesso em: 2 dez. 2022.

BILLIG, H; FURUTA, I; HSUEH, A J. Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. **Endocrinology**, [s. l.], v. 133, n. 5, p. 2204–2212, 1993. Disponível em: Acesso em: 10 maio 2022.

BILLIGT, Hakan; FURUTAS, Itsuko; HSUEHS, Aaron. **Estrogens Inhibit and Androgens Enhance Ovarian Granulosa Cell Apoptosis***. [S. l.: s. n.], 1993. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8404672/> Acesso em: 2 dez. 2022.

BULLETTI, Carlo *et al.* Endometriosis and infertility. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, [s. l.], v. 27, n. 8, p. 441–447, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2941592/>.

CASALECHI, Maíra *et al.* C-type natriuretic peptide signaling in human follicular environment and its relation with oocyte maturation. **Molecular and cellular endocrinology**, [s. l.], 2019. Disponível em: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201900360229>. Acesso em: 2 dez. 2022.

CAIXETA, Ester; DODE, Margot. Dissecação folicular: um método eficiente para estudos de competência ovocitária. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2008. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/191250/dissecacao-folicular-um-metodo-eficiente-para-estudos-de-competencia-ovocitaria>. Acesso em: 2 dez. 2022.

CHAKRABORTY, Soura; PRAMANIK, Jhuma; MAHATA, Bidesh. Revisiting steroidogenesis and its role in immune regulation with the advanced tools and technologies. **Genes & Immunity**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 125–140, 2021. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41435-021-00139-3>.

COSTA, Amilton P. R. *et al.* Angiotensin-(1–7): A Novel Peptide in the Ovary. **Endocrinology**, [s. l.], v. 144, n. 5, p. 1942–1948, 2003. Disponível em: Acesso em: 27 abr. 2020.

CULLER, M. D. *et al.* Angiotensin II-like immunoreactivity in human ovarian follicular fluid. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 62, n. 3, p. 613–615, 1986. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3944240/>. Acesso em: 2 dez. 2022.

DOMIŃSKA, Kamila. Involvement of ACE2/Ang-(1-7)/MAS1 Axis in the Regulation of Ovarian Function in Mammals. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 13, p. 4572, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32604999/>. Acesso em: 2 dez. 2022.

EDSON, Mark A; NAGARAJA, Ankur K; MATZUK, Martin M. The mammalian ovary from genesis to revelation. **Endocrine reviews**, [s. l.], v. 30, n. 6, p. 624–712, 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19776209>. Acesso em: 23 maio 2019.

FABRICIO, Sousa *et al.* **Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos** **Regulatory factors of folliculogenesis in mammalian**. [S. l.: s. n.], 2008. Disponível em: <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/RB135%20pag36.pdf>. Acesso em: 2 dez. 2022.

GEORGADAKI, Katerina *et al.* The molecular basis of fertilization (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, [s. l.], v. 38, n. 4, p. 979–986, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5029953/>.

GILCHRIST, R B *et al.* Oocyte maturation and quality: role of cyclic nucleotides. **Reproduction**, [s. l.], v. 152, n. 5, p. R143–R157, 2016. Disponível em: Acesso em: 7 jul. 2020.

GLORIOSO, Nicola *et al.* Prorenin in High Concentrations in Human Ovarian Follicular Fluid. **Science**, [s. l.], v. 233, n. 4771, p. 1422–1424, 1986. Disponível em: Acesso em: 2 dez. 2022.

HALL, John E. Historical Perspective of the Renin-Angiotensin System. **Molecular Biotechnology**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 27–39, 2003. Disponível em: Acesso em: 26 jul. 2019.

HEIDARZADEHPILEHROOD, Roozbeh *et al.* A Review on CYP11A1, CYP17A1, and CYP19A1 Polymorphism Studies: Candidate Susceptibility Genes for Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) and Infertility. **Genes**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 302, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4425/13/2/302/htm>. Acesso em: 22 maio 2022.

HILLIER, S. G.; WHITELAW, P. F.; SMYTH, C. D. Follicular oestrogen synthesis: the “two-cell, two-gonadotrophin” model revisited. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [s. l.], v. 100, n. 1-2, p. 51–54, 1994. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8056158/>.

HONORATO-SAMPAIO, Kinulpe *et al.* Evidence that angiotensin-(1-7) is an intermediate of gonadotrophin-induced oocyte maturation in the rat preovulatory follicle. **Experimental Physiology**, [s. l.], v. 97, n. 5, p. 642–650, 2012.

HUSAIN, A. *et al.* Localization of angiotensin II receptors in ovarian follicles and the identification of angiotensin II in rat ovaries. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 84, n. 8, p. 2489–2493, 1987. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3470807/>. Acesso em: 2 dez. 2022.

LABRUNE, Elsa; SALLE, Bruno; LORNAGE, Jacqueline. An Update on In Vitro Folliculogenesis: A New Technique for Post-Cancer Fertility. **Biomedicines**, [s. l.], v. 10, n. 9, p. 2217, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36140316/>. Acesso em: 2 dez. 2022.

LIAO, Baoying *et al.* Effects of Androgen Excess-Related Metabolic Disturbances on Granulosa Cell Function and Follicular Development. **Frontiers in Endocrinology**, [s. l.], v. 13, p. 815968, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8883052/>. Acesso em: 2 dez. 2022.

LIU, Wei *et al.* Estrogen receptors in granulosa cells govern meiotic resumption of preovulatory oocytes in mammals. **Cell Death & Disease**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. e2662, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5386574/>. Acesso em: 10 maio 2022.

MCKENZIE, L.J. *et al.* Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. **Human Reproduction**, [s. l.], v. 19, n. 12, p. 2869–2874, 2004.

MEDURI, G. *et al.* New functional zonation in the ovary as shown by immunohistochemistry of luteinizing hormone receptor. **Endocrinology**, [s. l.], v. 131, n.

1, p. 366–373, 1992. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1612016/>. Acesso em: 2 dez. 2022.

MULARONI, Valentina *et al.* Age-related changes in human Leydig cell status. **Human Reproduction**, [s. l.], v. 35, n. 12, p. 2663–2676, 2020. Disponível em: Acesso em: 28 abr. 2022.

O'SHAUGHNESSY, P. J. *et al.* Steroidogenic enzyme expression in the human fetal liver and potential role in the endocrinology of pregnancy. **Molecular Human Reproduction**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 177–187, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23197595/>. Acesso em: 2 dez. 2022.

OPARIL, Suzanne; HABER, Edgar. The Renin-Angiotensin System. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 291, n. 8, p. 389–401, 1974a. Disponível em: Acesso em: 22 nov. 2021.

OPARIL, Suzanne; HABER, Edgar. The Renin-Angiotensin System. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 291, n. 8, p. 389–401, 1974b. Disponível em: Acesso em: 22 nov. 2021.

PAUL, Martin; POYAN MEHR, Ali; KREUTZ, Reinhold. Physiology of local renin-angiotensin systems. **Physiological reviews**, United States, v. 86, n. 3, p. 747–803, 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16816138>.

PELUSO, John J.; PAPPALARDO, Anna. Progesterone and cell–cell adhesion interact to regulate rat granulosa cell apoptosis. **Biochemistry and Cell Biology**, [s. l.], v. 72, n. 11-12, p. 547–551, 1994. Disponível em: Acesso em: 6 set. 2020.

PEÑA, Óscar *et al.* Expression of angiotensin II type 1 (AT1) and angiotensin II type 2 (AT2) receptors in human granulosa-lutein (GL) cells: correlation with infertility diagnoses. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 93, n. 5, p. 1601–1608, 2010. Disponível em: Acesso em: 2 dez. 2022.

PEREIRA, Virgínia Mara *et al.* Regulation of steroidogenesis by atrial natriuretic peptide (ANP) in the rat testis: differential involvement of GC-A and C receptors. **Peptides**, v. 29, n. 11, p. 2024–2032, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18778744/>. Acesso em: 2 dez. 2022.

PEREIRA, Virgínia M. *et al.* Gonadotropin stimulation increases the expression of angiotensin-(1--7) and MAS receptor in the rat ovary. **Reproductive Sciences**

(**Thousand Oaks, Calif.**), [s. l.], v. 16, n. 12, p. 1165–1174, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19703990/>. Acesso em: 2 dez. 2022.

PEREIRA, Virginia M. *et al.* Localization of angiotensin-(1-7) and Mas receptor in the rat ovary throughout the estrous cycle. **Journal of Molecular Histology**, [s. l.], v. 51, n. 6, p. 639–647, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32875393/>. Acesso em: 2 dez. 2022.

PORRAS-GÓMEZ, Tania Janeth; MORENO-MENDOZA, Norma. Neo-oogenesis in mammals. **Zygote**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 404–422, 2017. Disponível em: Acesso em: 1 nov. 2020.

REIS, Fernando M. *et al.* Angiotensin-(1-7), its receptor Mas, and the angiotensin-converting enzyme type 2 are expressed in the human ovary. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 95, n. 1, p. 176–181, 2011. Disponível em: Acesso em: 2 abr. 2020.

REIS, Fernando M.; REIS, Adelina M. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), angiotensin-(1-7) and Mas receptor in gonadal and reproductive functions. **Clinical Science**, [s. l.], v. 134, n. 22, p. 2929–2941, 2020. Disponível em: Acesso em: 30 dez. 2020.

RICE, Gillian I. *et al.* Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 383, n. 1, p. 45–51, 2004. Disponível em: Acesso em: 2 set. 2020.

RIMON-DAHARI, Nitzan *et al.* Ovarian Folliculogenesis. **Results and Problems in Cell Differentiation**, [s. l.], v. 58, p. 167–190, 2016.

ROOS, Kristine *et al.* Single-cell RNA-seq analysis and cell-cluster deconvolution of the human preovulatory follicular fluid cells provide insights into the pathophysiology of ovarian hyporesponse. **Frontiers in Endocrinology**, [s. l.], v. 13, p. 945347, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36339426/>. Acesso em: 2 dez. 2022.

RUSSELL, Darryl L. *et al.* Bidirectional communication between cumulus cells and the oocyte: Old hands and new players? **Theriogenology**, [s. l.], v. 86, n. 1, p. 62–68, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X16300504>. Acesso em: 18 set. 2022.

SANTOS, Robson A. S. *et al.* Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.],

/], v. 100, n. 14, p. 8258–8263, 2003. Disponível em:

<https://www.pnas.org/content/100/14/8258>. Acesso em: 22 dez. 2020.

SANTOS, R A *et al.* Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. **Hypertension**, [s. l.], v. 11, n. 2_pt_2, 1988. Disponível em: Acesso em: 30 maio 2022.

SANTOS, Robson Augusto Souza *et al.* The ACE2/Angiotensin-(1–7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1–7). **Physiological Reviews**, [s. l.],

v. 98, n. 1, p. 505–553, 2018.

SCHIAVONE, M T *et al.* Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 85, n. 11, p. 4095–4098, 1988. Disponível em: Acesso em: 30 maio 2022.

SEN, Aritro. Oocyte Maturation A story of arrest and release. **Frontiers in Bioscience**, [s. l.], v. S5, n. 2, p. 451–477, 2013. Disponível em: Acesso em: 17 maio 2020.

SPERDUTI, Samantha *et al.* LH increases the response to FSH in granulosa-lutein cells from sub/poor-responder patients in vitro. **Human Reproduction (Oxford, England)**, deac246, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36367827/>. Acesso em: 2 dez. 2022.

STRAUSS, Jerome; WILLIAMS, Carmen. **Ovarian Life Cycle**. [S. l.: s. n.], 2009. Disponível em: http://www.herbex.tn/pdf/73/52_pcos18.pdf. Acesso em: 2 dez. 2022.

TALLANT, E. Ann; FERRARIO, Carlos M.; GALLAGHER, Patricia E. Angiotensin-(1–7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, [s. l.], v. 289, n. 4, p. H1560–H1566, 2005. Disponível em: Acesso em: 22 fev. 2022.

TANBO, Tom; FEDORCSAK, Peter. Endometriosis-associated infertility: aspects of pathophysiological mechanisms and treatment options. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, [s. l.], v. 96, n. 6, p. 659–667, 2017.

THOMAS, W. G.; SERNIA, C. The immunocytochemical localization of angiotensinogen in the rat ovary. **Cell and Tissue Research**, [s. l.], v. 261, n. 2, p. 367–373, 1990. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2205393/>. Acesso em: 2 dez. 2022.

TOUYZ, Rhian M.; MONTEZANO, Augusto C. Angiotensin-(1–7) and Vascular Function. **Hypertension**, [s. l.], v. 71, n. 1, p. 68–69, 2018. Disponível em: Acesso em: 18 set. 2019.

TURATHUM, Bongkoch; GAO, Er-Meng; CHIAN, Ri-Cheng. The Function of Cumulus Cells in Oocyte Growth and Maturation and in Subsequent Ovulation and Fertilization. **Cells**, [s. l.], v. 10, n. 9, p. 2292, 2021.

VIANA, Gregorio E. N. *et al.* Angiotensin-(1-7) induces ovulation and steroidogenesis in perfused rabbit ovaries. **Experimental Physiology**, [s. l.], v. 96, n. 9, p. 957–965, 2011. Disponível em: Acesso em: 16 set. 2022.

YUNG, Yuval *et al.* The in-vitro effect of gonadotropins' type and combination on Granulosa cells gene expressions. **Reproductive Biology and Endocrinology**, [s. l.], v. 20, n. 1, 2022. Disponível em: Acesso em: 2 dez. 2022.

ANEXOS**Anexo A- Carta de Aprovação ao COEP- UFMG**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**

Projeto: CAAE – 0198.0.203.000-11

**Interessado(a): Prof. Fernando Marcos dos Reis
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia
Faculdade de Medicina - UFMG**

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 13 de julho de 2011, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação do sistema angiotensina (1-7)/receptor mas em células da granulosa humanas e no processo de maturação oocitária in vitro**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

**Prof. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG**

Anexo B- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Avaliação da expressão do eixo da angiotensina (1-7) em células da granulosa humana e a sua participação no processo de maturação celular

I. INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Esta pesquisa visa ao estudo da fisiologia do tecido ovariano de mulheres em idade reprodutiva. A pesquisa permitirá compreender melhor as características moleculares do ovário de mulheres com ciclos ovulatórios ou com ausência de ovulação. Uma melhor compreensão da fisiologia deste tecido ajudará no entendimento do processo de maturação de oócitos, ovulação e produção hormonal, bem como na melhoria do tratamento dos distúrbios ovulatórios e da infertilidade feminina. Nesta pesquisa serão utilizados somente materiais que são habitualmente desprezados durante o procedimento de coleta ovular e Fertilização in vitro.

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

A pesquisa não trará benefício direto para as pessoas que dela participarem. Porém, o conhecimento que for obtido por meio deste estudo poderá ajudar no tratamento de outros casais com infertilidade.

IV. RISCOS

O estudo não acrescenta nenhum risco às pacientes, uma vez que serão utilizados somente materiais que são habitualmente desprezados durante o procedimento de coleta ovular e Fertilização in vitro. Não será realizado qualquer tipo de manipulação, experimento ou intervenção direta com o paciente, exceto a coleta de uma única amostra de sangue periférico (5 ml, volume equivalente a uma colher de sopa), através da punção venosa realizada de rotina para indução da anestesia.

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 do Laboratório de Reprodução Humana da Universidade Federal de Minas Gerais. 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. Os oócitos maduros coletados serão TODOS utilizados para o tratamento da paciente não sofrerão nenhuma intervenção referente à pesquisa.

VII. TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, voluntariamente, concordo que parte do material biológico (líquido folicular, células da granulosa e oócitos IMATUROS) proveniente da minha coleta ovular sejam utilizado para fins de pesquisa científica no Laboratório de Reprodução Humana da Universidade Federal de Minas Gerais. Estou ciente do exposto acima e ainda de que esta pesquisa não trará qualquer prejuízo à minha saúde.

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

Assinatura do voluntário:

Telefone para contato:

3248-9485 (Prof. Fernando M. Reis)
3248-9485 (Dra. Ines Katerina D. Cavallo)