

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA MULHER**

Camila Oliveira da Silveira Caires Lopes

**EFEITOS DO CITRATO DE CLOMIFENO, LETROZOL E ESTRADIOL SOBRE
APOPTOSE EM CÉLULAS DO *CUMULUS OOPHORUS* HUMANO**

BELO HORIZONTE

2022

CAMILA OLIVEIRA DA SILVEIRA CAIRES LOPES

**EFEITOS DO CITRATO DE CLOMIFENO, LETROZOL E ESTRADIOL SOBRE
APOPTOSE EM CÉLULAS DO *CUMULUS OOPHORUS* HUMANO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde da Mulher, da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Doutor.

Área de concentração: Reprodução Humana e Patologia Ginecológica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia Cristina França Ferreira.

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

Belo Horizonte

2022

L864e Lopes, Camila Oliveira da Silveira Caires.
Efeitos do Citrato de Clomifeno, Letrozol e Estradiol sobre apoptose em células do Cumulus Oophorus Humano [recursos eletrônicos]. / Camila Oliveira da Silveira Caires Lopes. - - Belo Horizonte: 2022.
65f.: il.
Formato: PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Márcia Cristina França Ferreira.
Coorientador (a): Helen Lima Del Puerto.
Área de concentração: Saúde da Mulher.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Ácido Cítrico. 2. Clomifeno. 3. Letrozol. 4. Apoptose. 5. Células do Cúmulo. 6. Ciclo Celular. 7. Dissertação Acadêmica. I. Ferreira, Márcia Cristina França. II. Puerto, Helen Lima Del. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: QU 300

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA MULHER

ATA DA DEFESA DE TESE DA ALUNA/ CAMILA OLIVEIRA DA SILVEIRA CAIRES LOPES

Realizou-se, no dia 13 de abril de 2022, às 14:00 horas, Plataforma lifesize, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada *EFEITOS DO CITRATO DE CLOMIFENO, LETROZOL E ESTRADIOL SOBRE APOPTOSE EM CÉLULAS DO CUMULUS OOPHORUS HUMANO*, apresentada por CAMILA OLIVEIRA DA SILVEIRA CAIRES LOPES, número de registro 2017652185, graduada no curso de MEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em SAÚDE DA MULHER, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Marcia Cristina Franca Ferreira - Orientador (UFMG), Prof(a). Helen Lima Del Puerto (UFMG), Prof(a). Fernanda Polisseni Souza (UFJF), Prof(a). Fernando Marcos dos Reis (UFMG), Prof(a). Milene Alvarenga Rachid (UFMG), Prof(a). Heder José Ribeiro (UFJF). A Comissão considerou a dissertação:

(X) Aprovada

() Reprovada

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

Belo Horizonte, 13 de dezembro de 2022.

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

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

Prof(a). Fernanda Polisseni Souza (Doutora)

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

Prof(a). Milene Alvarenga Rachid (Doutora)

Prof(a). Heder José Ribeiro (Doutor)



Documento assinado eletronicamente por **Milene Alvarenga Rachid, Servidor(a)**, em 13/04/2022, às 17:02, 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 **Fernando Marcos dos Reis, Professor do Magistério Superior**, em 13/04/2022, às 17:02, 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 **Helen Lima Del Puerto, Professora do Magistério Superior**, em 13/04/2022, às 17:04, 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 **Marcia Cristina Franca Ferreira, Professora do Magistério Superior**, em 13/04/2022, às 17:08, 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 **Fernanda Polisseni Souza, Usuário Externo**, em 13/04/2022, às 17:12, 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 **1376793** e o código CRC **6716494C**.

Referência: Processo nº 23072.220746/2022-11

SEI nº 1376793

Ao Marcos, Letícia e Giovana, que aceitaram a minha ausência
e apoiaram a minha escolha, com muito amor...
Às minhas pacientes, pelo aprendizado diário
e motivo de maior dedicação aos estudos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, mas primeiramente à Deus, por reger absolutamente tudo que faço e ao Espírito Santo por iluminar minhas mãos e minhas escolhas.

À minha orientadora, Professora Márcia Cristina França Ferreira, pelos ensinamentos, por acreditar neste projeto e aceitar orientar este trabalho, por trazer maturidade científica e pela oportunidade de vivenciar o doutorado.

À minha coorientadora, Professora Helen Lima Del Puerto, pela sua amizade, disponibilidade, dedicação e ajuda imprescindível em cada etapa deste trabalho.

Ao Professor Fernando Reis, por ser um grande exemplo de dedicação ao mundo acadêmico, por ter me apresentado a pesquisa científica, pelos inúmeros ensinamentos e por sua participação, disponibilidade e poderações neste projeto.

À Camila Almeida, Felipe, Santuza, Rafaela, Pedro, Emerson, Prof Enio e toda a equipe do Laboratório do Comportamento Celular do ICB pelo apoio, auxílio e disponibilidade que foram fundamentais para a execução deste trabalho.

Ao Dr. Leonardo Meyer pelo apoio e incentivo, por acreditar no meu trabalho e abrir todas as oportunidades para meu crescimento profissional.

À Luciana Pompermeyer, Erika Brescia, Gabriella Oliveira, Dra. Iara Couy e toda a equipe da Fertibaby pelo profissionalismo e por terem permitido nossa participação direta dentro do laboratório, apoiando e participando desde o recrutamento de pacientes à coleta de células para a execução do nosso trabalho.

Aos meus amigos, que mesmo longe, participam ativamente de todos os meus passos, como Alice, Vivian, Mariana, Gabriell, Ana Cândida. À Julia, pela parceria e por dividir minhas angústias. Às MMSF que se tornaram tão importantes na minha vida.

Ao meu marido Marcos, pelo amor, cumplicidade e apoio incondicional na realização de todos os meus sonhos e projetos. Principalmente por ser um pai tão presente que permitiu minha dedicação a este projeto. Sem você nada teria sido possível.

À Letícia e Giovana, que me apresentaram o maior amor do mundo e são o principal motivo da minha busca por ser uma pessoa melhor a cada dia. Entederam todas as minhas ausências e retribuíram com amor e admiração. Também é por vocês!

Aos meus pais Dayse e Paulo, por serem uma base sólida de amor e a origem de todos os ensinamentos, por terem me mostrado que com dedicação e estudo eu teria subsídios para buscar todos os meus sonhos e objetivos. E que o meu futuro sempre estaria em minhas mãos.

Aos meus avós Elenice e Alcides, pelo carinho, incentivo e presença constante na minha vida.

Aos meus irmãos Juliana e Rafael, Gabri, Mari, Duda e minha afilhada Isabela. Pela base e multiplicação do amor.

Às minhas pacientes, que me ensinam diariamente com histórias de resiliência e dedicação em busca de sonhos, e que me dão forças para seguir firme neste propósito de trabalhar com infertilidade.

À vida, por ter me direcionado nesta caminhada, por estar me permitindo concluir esta realização pessoal e profissional. Sou muito grata a todos que participaram deste processo e estou muito feliz por estar aqui, hoje.

Trabalho realizado na Clínica Fertibaby em Belo Horizonte, Minas Gerais e no Laboratório do Comportamento Celular do Departamento de Patologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Apoio financeiro: Programa de Pós Graduação em Saúde da Mulher da Universidade Federal de Minas Gerais e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Citrato de clomifeno.....	17
1.2 Letrozol.....	19
1.3 Relação entre espécies reativas de oxigênio e apoptose.....	21
1.4 Ciclo celular.....	24
1.5 Clomifeno, letrozol, e apoptose.....	25
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 Objetivo geral.....	27
2.2 Objetivos específicos.....	27
3 METODOLOGIA.....	28
3.1 Pacientes.....	28
3.2 Considerações éticas.....	29
3.3 Aspiração folicular e fertilização <i>in vitro</i>	29
3.4 Separação das células da granulosa.....	30
3.4.1 Coleta e cultivo das células da granulosa do cumulus oophorus.....	30
3.4.2 Avaliação da pureza das células através da coloração das lamínulas com Giemsa e imunocitoquímica (ICC) para alfa inibina.....	32
3.4.3 Ensaio MTT: efeitos na viabilidade e metabolismo mitocondrial celular...	34
3.4.4 Cultivo das células da granulosa do cumulus oofurus.....	36
3.4.5 Análise das fases do ciclo celular.....	36
3.4.6 Leitura no citômetro de fluxo.....	37
3.4.7 Extração RNA, transcrição reversa e PCR em tempo real.....	38
3.5 Análise estatística.....	40
4 RESULTADOS.....	41
4.1 Dados clínicos, comparação entre o grupo avaliado pela citometria de fluxo e o grupo avaliado por meio da PCR.....	41
4.2 Imunocitoquímica para alfa inibina.....	42
4.3 Ensaio com MTT: citotoxicidade.....	42

4.4 Avaliação do ciclo celular pela citometria de fluxo.....	43
4.5 PCR em tempo real.....	45
5 DISCUSSÃO.....	47
6 CONCLUSÕES.....	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
APÊNDICE A - Modelo de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	59
APÊNDICE B - Modelo de termo de consentimento livre e esclarecido para a realização de ICSI da Clínica <i>Fertibaby</i>	61
ANEXO A - Parecer do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia.....	64

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Ilustração do desenvolvimento folicular e variação hormonal no período ovulatório.....	16
FIGURA 2 – Representação do efeito do citrato de clomifeno no eixo hipotálamo-hipófise-ovário	18
FIGURA 3 – Representação do mecanismo de ação dos inibidores de aromatase	20
FIGURA 4 – Descrição das vias de apoptose	23
FIGURA 5 - Fases do ciclo celular.....	24
FIGURA 6 – Estrutura do folículo	26
FIGURA 7 – Ilustração do óvulo com as células do <i>cumulus</i> e após denudação.....	30
FIGURA 8 - Etapas da coleta das células do <i>cumulus</i>	31
FIGURA 9 - Montagem da placa para cultura primária de células do <i>cumulus</i> ...	34
FIGURA 10 - Esquema para o ensaio com o MTT.....	35
FIGURA 11 - Diagrama representativo das fases do ciclo celular a partir da citometria de fluxo.....	37
FIGURA 12 - Estratégia utilizada para os ensaios de ciclo celular e para análise no citômetro de fluxo.....	38
FIGURA 13 - Estratégia utilizada para os ensaios de PCR em tempo real.....	39
FIGURA 14 - Imunomarcação de alfa inibina em células da granulosa do <i>cumulus</i>	42

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - Percentual de viabilidade celular obtido pelo ensaio de MTT em células após tratamento com CC ou LE.....	43
GRÁFICO 2 - Médias dos percentuais de células viáveis por fase do ciclo celular, por grupo de estudo, após 24 horas de tratamento com as drogas.....	44
GRÁFICO 3 - <i>Fold change</i> observados para a expressão de Casp3, BAX e SOD2, em relação ao tratamento com CC, LE e E.....	46

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - <i>Primers</i> para PCR em tempo real.....	40
TABELA 2 - Medidas descritivas dos dados clínicos das pacientes alocadas no grupo PCR e grupo citometria de fluxo.....	41
TABELA 3 - Comparação de médias entre pacientes do grupo destinado à citometria de fluxo e à PCR.....	41
TABELA 4 - Medidas descritivas do percentual de células viáveis no ensaio de MTT de células submetidas ao tratamento com CC e LE.....	43
TABELA 5 - Medidas descritivas do percentual de células viáveis por fase do ciclo celular, por grupo de estudo, após 24 horas de tratamento.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aGnRH	Análogo do hormônio liberador de gonadotrofinas
APAF-1	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i>
ATP	Trifosfato de adenosina
Bcl-2	<i>B cell CLL/lymphoma 2</i>
CAPI	Centro de Aquisição e Processamento de Imagens
CC	Citrato de clomifeno
cdks	Proteínas-quinase dependentes de ciclinas
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CO ₂	Dióxido de carbono
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAse	Desoxirribonuclease
dp	Desvio-padrão
E	Estradiol
EUA	Estados Unidos da América
FAZ	<i>Type-II transmembrane protein</i>
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FOX01	<i>Foxhead box 01</i>
FSH	Hormônio folículo-estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
GOB	Ginecologia e Obstetrícia
GP _{ER}	<i>Protein-coupled estrogen receptor</i>
GPx	Glutathione peroxidase
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
HFS	Solução fluorocrômica hipotônica
hGLC	<i>Human primary granulosa lutein cells</i>
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
ICC	Imunocitoquímica
ICSI	Injeção intracitoplasmática de espermatozoides
LE	Letrozol

LH	Hormônio luteinizante
LIF	<i>Leukemia-inhibiting factor</i>
MAP	<i>Mitogen-activated protein</i>
MHM	<i>Multipurpose handling mediumtrade</i>
MI	Metáfase I
MII	Metáfase II
Mn	Manganês
MPF	<i>M-phase promoting factor</i>
MTT	Ensaio colorimétrico brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5difeniltetrazolio]
NF-κB	Fator nuclear kappa B
pAKT	<i>Protein kinase B</i>
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> - Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
RNAse	Ribonuclease
rpm	rotação por minuto
SBF	Soro bovino fetal
SOD2	Superóxido dismutase 2

RESUMO

Citrato de clomifeno (CC) e letrozol (LE) são indutores de ovulação que, apesar das altas taxas de ovulação confirmada, atingem baixas taxas de gravidez. Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos de CC e LE *in vitro*, isoladamente ou em combinação com estradiol (E), na apoptose de células do *cumulus oophorus* humano. Realizamos um estudo prospectivo controlado utilizando culturas primárias de células do *cumulus* de pacientes submetidas à fertilização *in vitro* (n=22). A coloração com Giemsa e a imunocitoquímica para alfa-inibina foram utilizadas para avaliar a pureza e a morfologia da cultura celular. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio MTT, o ciclo celular por citometria de fluxo e a expressão gênica de Caspase-3, Bax e Superóxido dismutase 2 (SOD-2) e S26 por reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real. As células foram tratadas por 24 horas em 5 grupos de tratamento: CC, CC + E, LE, LE + E e controle. Nenhum dos tratamentos afetou a viabilidade celular, mas o LE reduziu a porcentagem média de células na fase S em relação ao controle (24,79 versus 21,70, $p=0,0014$). O tratamento com CC aumentou a expressão gênica de Bax (4 vezes) e SOD-2 (2 vezes), que foi revertida quando adicionado E à cultura. A expressão de SOD-2 aumentou em células tratadas com LE quando comparado ao controle (4 vezes), que foi também revertida por adição de E. Estes achados sugerem que CC e LE não afetam significativamente a viabilidade das células do *cumulus* humana. Porém, houve modulação na expressão de genes envolvidos na apoptose por essas drogas isoladamente e em associação com E, sugerindo que CC e LE podem ter efeitos diretos nas células do *cumulus* além de seus mecanismos de ação conhecidos.

Palavras-chave: Citrato de clomifeno, Letrozol, Apoptose, Células do *cumulus*, Ciclo celular.

ABSTRACT

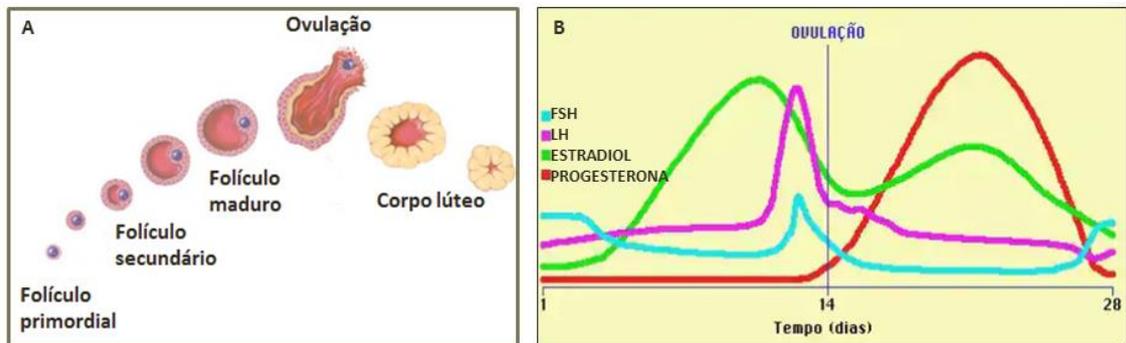
Clomiphene citrate (CC) and letrozole (LE) are ovulatory stimulants that, despite high ovulation rates, achieve low pregnancy rates. This study aimed to investigate the *in vitro* effects of CC and LE, alone or in combination with estradiol (E), on apoptosis in human *cumulus cells*. We performed a controlled prospective study using primary *cumulus cell* cultures from patients undergoing *in vitro* fertilization (n=22). Giemsa stain and alpha-inhibin immunocytochemistry was used to assess *cell* culture purity and morphology. *Cell* viability was evaluated by MTT assay, *cell* cycle status by flow cytometry, and Caspase-3, Bax and superoxide dismutase 2 (SOD-2), and S26 gene expression by real-time polymerase chain reaction (qPCR). *Cells* were treated for 24 hours in 5 conditioned media: CC, CC + E, LE, LE + E and control. None of the treatments affected *cell* viability, but LE reduced the mean percentage of *cells* in the S phase compared to control (24.79 versus 21.70, p=0.0014). CC treatment increased mRNA expression of Bax (4 fold) and SOD-2 (2 fold), which was reversed by co-treatment with E. SOD-2 expression increased in *cells* treated with LE compared to control (4 fold), which was also reversed by E. These findings suggest that CC and LE do not significantly affect the viability of human *cumulus cells*. Still, the expression of genes involved in apoptosis was modulated by these drugs alone and in association with E, suggesting that CC and LE may have direct effects on *cumulus cells* beyond their known mechanisms of action.

Keywords: Clomiphene citrate, Letrozole, Apoptosis, *Cumulus cells*, *Cell* cycle.

1 INTRODUÇÃO

Ovulação é um evento do ciclo menstrual normal que ocorre 34 a 36 horas após o início da elevação do hormônio luteinizante (do inglês *luteinizing hormone* - LH) e aproximadamente 10 a 12 horas após seu pico (FRITZ; SPEROFF, 2011). É consequência do recrutamento folicular e da seleção do folículo dominante, que produz estrogênio e induz uma liberação abrupta do LH, resultando na ruptura do folículo com consequente liberação de um óvulo maduro (SU *et al.*, 2017).

FIGURA 1: Ilustração do desenvolvimento folicular e variação hormonal do período ovulatório



A Figura 1A representa o desenvolvimento folicular e a figura 1B representa a variação hormonal nas fases do ciclo menstrual, demonstrando o pico de estradiol levando ao início da elevação de hormônio luteinizante e posterior ovulação. Figura 1A foi adaptada de “*The Free Dictionary*”, disponível em: <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com> e a figura 1B adaptado de Patton, Kevin T.; Thibodeau, Gary A. Sistema Genital. In: Estrutura e funções do corpo humano. P 468 – 472. 2002. 1ª Edição.

Indução de ovulação é parte fundamental dos tratamentos de reprodução assistida e refere-se à utilização de medicamentos para estimular o crescimento folicular e a ovulação. Indutores podem ser utilizados em tratamentos de baixa complexidade, como orientação de coito programado e inseminação intrauterina, como também alta complexidade, como o tratamento de fertilização *in vitro* (CUNNINGHAM; WILLIAMS, 2010; HOFE; BATES, 2015).

Existem indutores de ovulação injetáveis, como hormônio folículo estimulante (FSH - do inglês *follicle stimulating hormone*) urinário, altamente purificado, recombinante e orais, como citrato de clomifeno e letrozol. Os indutores orais, classicamente utilizados nos tratamentos de baixa complexidade, são indicados para pacientes

normogonádicas e normogonadotróficas (grupo II da Organização Mundial da Saúde), porque agem estimulando secreção endógena gonadotrofinas. Esse grupo de pacientes apresenta nível sérico normal de FSH e estradiol e concentração normal ou elevada de LH. Esses medicamentos agem estimulando o funcionamento endócrino normal do eixo hipotálamo-hipófise-ovário (FRITZ; SPEROFF, 2011).

Amplamente utilizado por ginecologistas, o coito programado é um tratamento de baixa complexidade em reprodução assistida, geralmente com a utilização de indutores orais como citrato de clomifeno e letrozol, seguido de ultrassonografia seriada para acompanhar o crescimento folicular. O objetivo desse tratamento é estimular o desenvolvimento de um ou mais folículos por ciclo, associado a um cronograma de relações sexuais no período fértil, aumentando assim, a probabilidade de gestação (DONADIO *et al.*, 2020). Esse tratamento é indicado para pacientes com distúrbios ovulatórios, como as portadoras da síndrome dos ovários policísticos, como também para mulheres jovens com infertilidade sem causa aparente e casais com baixa frequência sexual (PROPST; BATES Jr., 2012).

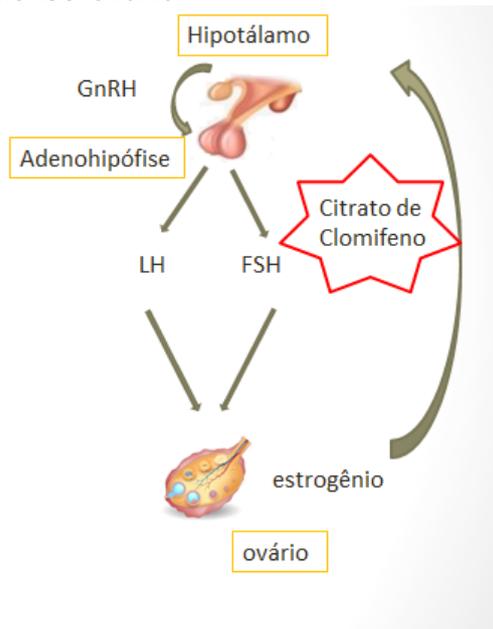
O citrato de clomifeno foi considerado a primeira escolha de tratamento para indução de ovulação em pacientes anovulatórias por décadas, atingindo altas taxas de ovulação confirmada, porém com taxas de gravidez menores do que o esperado, além de maior taxa de abortamento quando comparado à população geral (FRANKS, S. *et al.* 1985; KAR, 2012; SAYEDOSHADAIEI *et al.*, 2016). Muitos estudos surgiram avaliando o letrozol como equivalente e até mesmo superior ao citrato de clomifeno como indutor de ovulação, atingindo maiores taxas de gravidez (KAR, 2012; SAYEDOHADAIEI *et al.*, 2016) e menores taxas de abortamento (AKBARI, AYAZI; AYAZI, 2012).

1.1 Citrato de clomifeno

O citrato de clomifeno pertence à classe dos moduladores seletivos dos receptores de estrogênio. É um derivado não esteroide de trifeniletileno e apresenta propriedades agonistas e antagonistas (CLARK; MARKAVERICH, 1981). Apresenta propriedade antiestrogênica em ambiente estrogênico normal e se apresenta como agonista quando o nível sérico de estradiol está muito baixo (BARBIERI, 1999).

É composto de dois isômeros, enclomifeno e zuclomifeno, aproximadamente na proporção 3:2 (HOMBURG, 2005). Seu mecanismo de ação não é totalmente elucidado, mas sabe-se que envolve um bloqueio no mecanismo de autorregulação negativa, o que leva a aumento na secreção de FSH (THESSALONIKI, 2008). Aproximadamente 85% da dose administrada é eliminada em seis dias (MIKKELSON *et al.*, 1986).

FIGURA 2: Representação do efeito do citrato de clomifeno no eixo hipotálamo-hipófise-ovário



Mecanismo de ação do citrato de clomifeno, que se liga aos receptores hipotalâmicos de estrogênio, bloqueando-os. A percepção de hipoestrogenismo sérico leva à secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) que estimula a secreção de hormônio luteinizante (LH) e foliculo-estimulante (FSH) pela hipófise, que agem no ovário, estimulando a esteroidogênese e o crescimento folicular. Adaptado de ASRM 2013.

O citrato de clomifeno era considerado a primeira linha de medicamento para induzir ovulação em pacientes anovulatórias (PRACTICE COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY OF REPRODUCTIVE MEDICINE, 2013) até os estudos mais recentes reconhecerem o letrozol como o mais efetivo agente oral para tratar distúrbios ovulatórios (WANG *et al.*, 2021). Por apresentar estrutura similar à do estrogênio, o clomifeno se liga aos receptores estrogênicos em nível hipotalâmico e impede a correta análise dos níveis estrogênicos circulantes. Como resposta a esse nível estrogênico reduzido, ocorre secreção do hormônio liberador de gonadotrofina hipotalâmica (do inglês *Gonadotropin Releasing hormone* - GnRH). O aumento na

secreção do GnRH estimula a secreção de gonadotrofinas hipofisárias. Níveis séricos aumentados de LH e FSH levam ao crescimento e desenvolvimento de folículos ovarianos e estimulam a esteroidogênese (Figura 2). A elevação progressiva de estrogênio sérico desencadeia o pico de LH e consequente ovulação (REBAR; VANDENBERG; NAFTOLIN, 1976).

O efeito esperado da medicação é o surgimento de um ou mais folículos dominantes, seguido de amadurecimento e ruptura, que irá resultar na liberação de um oócito maduro (PRACTICE COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY OF REPRODUCTIVE MEDICINE, 2013).

Apesar das altas taxas de ovulação com o uso do citrato de clomifeno, as taxas de gravidez após ovulação confirmada são baixas e estão relacionadas a maiores taxas de abortamento (FRANKS *et al.*, 1985; KAR, 2012; MITWALLY; CASPER, 2001; SAYEDOSHOHADAEI *et al.*, 2016).

O efeito antiestrogênico do clomifeno poderia afetar os estágios finais da foliculogênese, uma vez que ele parece induzir apoptose nas células da granulosa e no oócito, em estudos animais (CHAUBE *et al.*, 2005), além do efeito antiestrogênico no muco cervical e endométrio bem descrito em humanos (LI; WARREN; MURPHY, 1999; RANDALL; TEMPLETON, 1991).

Permanece incerto se o tratamento in vivo com citrato de clomifeno induz, de fato, apoptose no folículo pré-ovulatório e no *cumulus oophorus* em humanos e se o estradiol teria algum efeito protetor. Chaube *et al.* (2005), em estudo realizado em ratas, identificaram que o tratamento com citrato de clomifeno poderia induzir apoptose nas células da granulosa e níveis reduzidos de estradiol sérico e ovariano, o que afetaria a qualidade do complexo *cumulus oophorus* ao provocar apoptose em suas células após ovulação. Nesse estudo, a suplementação de estradiol se mostrou capaz de reduzir este efeito.

1.2 Letrozol

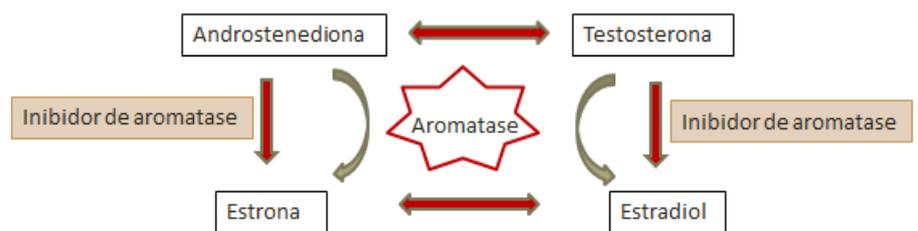
O letrozol, um inibidor de aromatase, foi primeiramente descrito para indução de ovulação em 2001, como uma forma de mimetizar a ação do clomifeno sem a

depleção dos receptores de estrogênio (MITWALLY; CASPER, 2001). As pesquisas foram motivadas considerando-se que os efeitos antiestrogênicos do citrato de clomifeno no endométrio e muco cervical e taxas maiores de abortamento também poderiam estar relacionados à sua longa meia-vida e à depleção duradoura dos receptores de estrogênio (MIKKELSON *et al.*, 1986) e também como uma alternativa ao clomifeno devido à persistência de 20 a 25% de anovulação, apesar da administração de doses adequadas dessa medicação (HUGHES; COLLINS; VANDEKERCKHOVE, 2000).

Pertencente à terceira geração dos inibidores de aromatase, que são derivados triazólicos, o letrozol é um supressor específico e reversível da biossíntese de estrogênio que inibe a enzima aromatase por se ligar competitivamente ao heme do citocromo P-450, resultando no bloqueio da conversão de androgênios em estrogênios, com subsequente aumento nos androgênios ovarianos (AKHTAR; WRIGHT, 1993; BEDAIWY; MOUSA; CASPER, 2009 GARCÍA-VELACO *et al.*, 2005) (Figura 3). Apresenta meia-vida de aproximadamente 45 horas (SAYEDO SHOHADEI *et al.*, 2106) e foi inicialmente aprovado para uso em mulheres após a menopausa com câncer de mama, na tentativa de suprimir a produção de estrogênio (SIOUFI *et al.*, 1997; WINER *et al.*, 2002). Sua indicação para indução de ovulação não está descrita em bula, tratando-se de um uso *off label* desta droga.

Seu mecanismo de ação promove *feedback* negativo de estrogênio no eixo hipotálamo-hipófise, semelhante ao citrato de clomifeno, porém sem o efeito de *down-regulation* nos receptores de estrogênio, com subsequente aumento na secreção de gonadotrofinas e estímulo ao desenvolvimento folicular ovariano, além de aumentar a sensibilidade folicular ao FSH (MITWALLY; CASPER, 2001). Devido à sua meia-vida mais curta e por não ter ação antiestrogênica, não apresenta o efeito negativo na espessura endometrial e muco cervical descritos com o clomifeno (SAKAR; OGLAK, 2020). Outro benefício é sua tendência ao crescimento monofolicular, resultando em menor risco de gestação gemelar (PETERSEN *et al.*, 2016) e síndrome de hiperestímulo ovariano (SAYEDOHHADEI *et al.*, 2016).

FIGURA 3: Representação do mecanismo de ação dos inibidores de aromatase



Mecanismo de ação do letrozol, demonstrando o bloqueio da enzima aromatase, que é responsável pela conversão de androgênios em estrogênios. Adaptado de Akhtar *et al.* 1993.

1.3 Relação entre espécies reativas de oxigênio e apoptose

Espécies reativas de oxigênio (do inglês *reactive oxygen species* – ROS) podem ser classificadas em radicais livres e compostos não radiculares. Entre estes, destacam-se os superóxidos ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio singlete (1O_2) e os radicais hidroxila ($\bullet OH$) por seu potencial citotóxico (GOUVEIA; LIMA, 2017). ROS são produzidos principalmente pelas mitocôndrias em condições fisiológicas e patológicas, através da respiração celular, ação de lipooxigenases e ciclooxygenases (HANSEN *et al.*, 2006) e sua remoção e degradação é feita por enzimas como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx), protegendo contra danos celulares (DEPONTE, 2013).

Desequilíbrios entre os níveis de oxidantes e antioxidantes, ou seja, entre a produção de ROS e sua depuração (PIZZINO *et al.*, 2017), leva a uma condição conhecida como estresse oxidativo, o que pode induzir à morte celular por apoptose (CIRCU; AW, 2010).

As células da granulosa desempenham papel fundamental no desenvolvimento e maturação oocitária. As células do *cumulus* interagem diretamente com o oócito e promovem atividade metabólica essencial a partir da liberação de hormônios e fatores de crescimento. Dessa forma, qualquer alteração que leve a aumento na taxa de apoptose dessas células pode impactar negativamente na qualidade do óvulo (ALMEIDA *et al.*, 2018; MATSUDA *et al.*, 2012).

Durante o crescimento folicular e ovulação, ocorre geração de espécies reativas de oxigênio que têm seus efeitos neutralizados por uma cadeia de antioxidantes.

Apesar de baixos níveis de radicais livres serem importantes para o processo de sinalização celular, promovendo sobrevivência, proliferação e diferenciação celular fundamentais para a divisão meiótica dos oócitos (LU *et al.*, 2018; RIZZO *et al.*, 2012), sua produção excessiva, acompanhada da diminuição da sua eliminação pelos sistemas antioxidantes, desencadeia estresse oxidativo que pode resultar em estímulo à apoptose de células da granulosa, prejuízo para o ambiente ovariano e impacto na qualidade oocitária, além de degeneração acelerada do corpo lúteo e prejuízo nas taxas de fertilização e gravidez. (TRIPATHI *et al.*, 2011, YANG *et al.*, 2021).

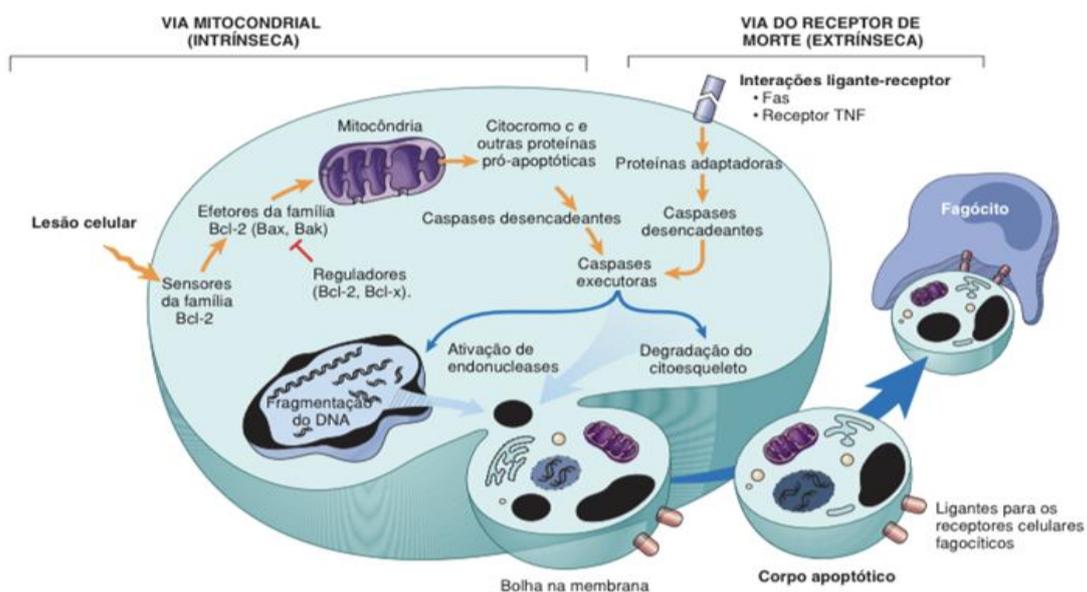
O trifosfato de adenosina (ATP) é produzido pelas mitocôndrias durante o metabolismo energético a partir de reação redox localizada em sua membrana. O metabolismo via mitocondrial parece ser o principal responsável pela produção de espécies reativas de oxigênio, que são contrabalanceadas por enzimas antioxidantes (ALMANSA-ORDONEZ *et al.*, 2020). Durante a foliculogênese ovariana, a produção de ATP e piruvato ocorre pela metabolização da glicose e aumenta nas fases finais do desenvolvimento folicular e ovulação, induzindo apoptose e permitindo a quebra da parede do folículo e consequente liberação do complexo *cumulus-oophorus* (CUMMINS, 2002). Porém, altas concentrações de radicais livres podem induzir a vários defeitos no oócito, como uma possível desestabilização no fator promotor de mitose (do inglês *M-phase promoting factor* - MPF), impactando nas fases do ciclo celular e nos fatores que promovem sobrevivência, levando à apoptose desencadeada pela mitocôndria (ALMANSA-ORDONEZ *et al.*, 2020; SASAKI *et al.*, 2019).

A apoptose é um evento de morte celular programada na ausência de reações inflamatórias, que pode estar relacionada a várias condições fisiológicas e patológicas (WU; ZHANG; WANG, 2000). Eventos celulares sequenciais resultam na ativação de caspases, determinando o processo de proteólise que resulta em morte celular. A proteína Bax associa-se à Bcl-2 (*B cell CLL/lymphoma 2*), induzindo a liberação do fator de ativação de protease associada à apoptose 1 (apoptotic protease activating factor 1 - APAF-1), que ativa a caspase-9, induzindo a apoptose (GRIVICICH *et al.*, 2007). A ativação das caspases ocorre por duas vias principais: uma via extrínseca, mediada por receptores localizados na membrana celular chamados receptores da morte, ou por via intrínseca, mediada por estímulos

internos de estresse intracelular tais como lesão do ácido desoxirribonucleico (DNA) ou perturbações no ciclo celular ou nas vias metabólicas. Ambas as vias irão ativar caspases, que levarão à ativação de outros membros dessa família, resultando na amplificação da cascata proteolítica (LUCHS; PANTALEÃO, 2010).

Existem 14 caspases descritas, das quais seis participam desse processo, que são as caspases 3, 6, 7, 8, 9, 10 (BOATRIGT; SALVESEN, 2003). A via extrínseca é iniciada pela ligação a receptores na superfície celular, como proteína transmembrana tipo II (receptor de morte FAS) ou fator de necrose tumoral (do inglês *tumor necrosis factor* - TNF), evento que promove a ativação da caspase-10 (em humanos), a qual ativa as caspases diretamente ou cliva membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 que promovem a liberação de citocromo C da mitocôndria. Na mitocôndria, a liberação de citocromo C é regulada pelos membros da família Bcl-2, que possui proteínas pró e antiapoptóticas. Em resposta ao estresse, membros pró-apoptóticos dessa família são translocados do citoplasma para a mitocôndria, onde promovem a liberação do citocromo C. No citoplasma, o citocromo C liga-se à APAF-1 e à pró-caspase-9, ativando a caspase-9 que, por sua vez, ativa a caspase-3; e inicia-se a clivagem de substratos específicos que resultam na morte celular (LUCHS; PANTALEÃO, 2010).

FIGURA 4: Descrição das vias de apoptose



Descrição das vias de apoptose (intrínseca e extrínseca) e seus mediadores. Adaptado de Patologia – Bases patológicas das doenças – Robbins 8ª Ed. 2010.

A família Bcl-2 possui membros pró-apoptóticos (Bax, Bid e Bak) e antiapoptóticos, que participam ativamente da regulação da apoptose, tendo em seu equilíbrio a manutenção da homeostase. Bcl-2 e Bcl-XL inibem a apoptose, prevenindo a ligação das proteínas pró-apoptóticas à membrana externa da mitocôndria e consequente liberação de citocromo C (GRIVICICH *et al.*, 2007). Alterações biológicas como superexpressão de proteínas Bax e ativação de caspase-3 estão relacionadas à apoptose no oócito (CHAUBE *et al.*, 2005).

1.4 Ciclo celular

O ciclo celular é o mecanismo essencial de reprodução celular no qual ocorre duplicação do genoma durante a fase S e subsequente divisão da célula, permitindo que o DNA duplicado dos cromossomos seja segregado em cópia para duas células filhas geneticamente idênticas durante a mitose ou fase M. Em um ciclo celular normal, a fase S é sempre precedida pela fase M, que não ocorre até que a fase S se complete. Entre essas duas principais etapas existem duas fases de intervalo. G1 separa fase M de fase S e G2 está entre S e M. G1 também exerce papel de importante decisão celular, permitindo que a célula continue sua proliferação ou retire-se do ciclo, permanecendo em estado quiescente, também conhecido como G0 (PUCCI; KASTEN; GIORDANO, 2000).

O controle do ciclo celular ocorre a partir dos pontos de checagem ou restrição que ocorrem no final de G1, na transição de G2/M e no meio da fase M e são ativados por proteínas-quinase dependentes de ciclinas (cdks). Os pontos de checagem são pontos de parada onde ocorre análise da estrutura do material genético, controlando a proliferação celular e permitindo o reparo no DNA. Quando o defeito não pode ser reparado, a célula é eliminada por meio da apoptose (ALBERTS *et al.*, 2017).

FIGURA 5: Fases do ciclo celular

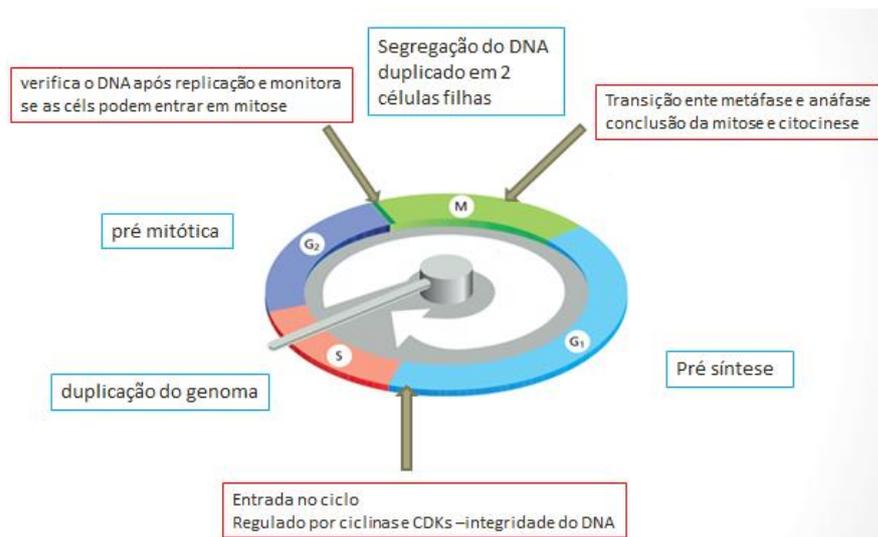


Ilustração das fases do ciclo celular onde fase S representa a duplicação do genoma, fase M representa a segregação do DNA em 2 células filhas, duas fases de intervalo G₁ e G₂ e os pontos de restrição. Adaptado do Livro *Biologia molecular da Célula*. Alberts et al, 2017, cap 17 pag 968.

1.5 Clomifeno, letrozol e apoptose

Tomando por base resultados de estudos animais, formula-se a hipótese de que a suplementação exógena de 17-beta-estradiol possa prevenir o estabelecimento do ambiente hipoestrogênico induzido pelo citrato de clomifeno, impedindo que as células da granulosa entrem em apoptose, o que também seria um fator de proteção contra a deterioração da qualidade oocitária (CHAUBE *et al.*, 2005; Chaube *et al.*, 2006). Sayedoshohadei *et al.* (2016) verificaram aumento na espessura endometrial quando se associou estradiol ao citrato de clomifeno para indução de ovulação em mulheres anovulatórias, porém não identificaram aumento nas taxas de gravidez.

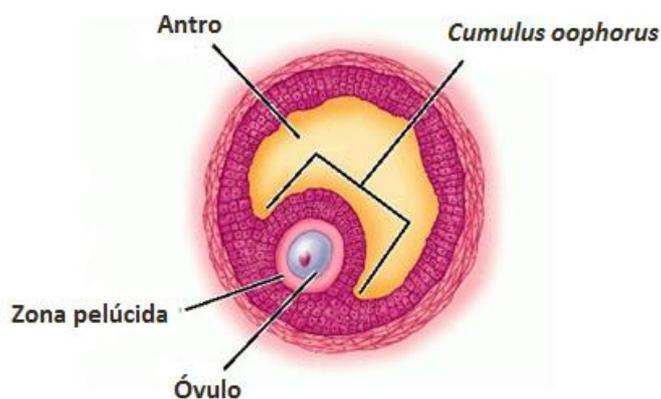
Apesar de ser amplamente utilizado para indução de ovulação, não está descrito na literatura se o letrozol poderia promover apoptose das células da granulosa e interferir nos estágios finais da foliculogênese como descrito com o citrato de clomifeno em ratas (CHAUBE *et al.*, 2005).

Dessa forma, considerando o elevado número de pacientes anovulatórias que poderiam se beneficiar de tratamento de baixa complexidade e baixo custo através do coito programado e, motivados por tentar entender as baixas taxas de gravidez com o uso de indutores de ovulação orais mesmo com ovulação confirmada ao ultrassom, buscamos esclarecer se a ocorrência de apoptose nas células do

cumulus oophorus poderia ser um mecanismo causador desses resultados indesejados, e seus reflexos no microambiente ovariano.

Uma vez que com o tratamento de coito programado não há manipulação folicular, as células do *cumulus oophorus* estudadas foram obtidas por punção folicular para o tratamento de fertilização *in vitro* (FIV). Contudo, citrato de clomifeno e letrozol não são administrados isoladamente nesta modalidade de tratamento. Sendo assim, procuramos analisar concentrações fisiológicas dessas drogas em culturas de células da granulosa denudadas de oócitos aspirados na punção folicular. Estas células, que são descartadas para o tratamento de FIV por meio da técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), foram utilizadas *in vitro* para análise de apoptose sob efeito do citrato clomifeno (CC) e letrozol (LE) em concentrações semelhantes às encontradas no soro de pacientes após administração de doses usuais, bem como um possível efeito protetor da adição de estradiol (E) descrito na literatura.

FIGURA 6: Estrutura do folículo



A figura descreve o folículo e seus constituintes: óvulo, zona pelúcida, *cumulus oophorus* e antro. Adaptado de "The Free Dictionary", disponível em: <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com>

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar se o citrato de clomifeno e o letrozol estimulam a apoptose nas células do *cumulus oophorus in vitro* e quais os mecanismos envolvidos neste processo.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar se há aumento da ocorrência de apoptose nas células do *cumulus* cultivadas na presença de citrato de clomifeno e letrozol, com e sem estradiol, por citometria de fluxo.
- b) Avaliar se a expressão de genes envolvidos na regulação da apoptose como SOD2, Bax e caspase-3 se altera, por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real.

3 METODOLOGIA

3.1 Pacientes

No presente estudo prospectivo e comparativo foram avaliadas vinte e uma pacientes entre 27 e 41 anos, que foram encaminhadas para tratamento de infertilidade conjugal com FIV/ICSI na Clínica Fertibaby, Belo Horizonte, Brasil. Células do *cumulus oophorus* de algumas dessas pacientes (n=3) foram destinadas para cultivo celular e avaliação de pureza da cultura por imunocitoquímica e Giemsa, outras (n=3) para o teste de toxicidade das drogas. Outras amostras (n=7) foram alocadas para cultivo celular e citometria de fluxo e as restantes (n=8) foram alocadas para extração de ácido ribonucleico (RNA), transcrição reversa e PCR em tempo real entre abril e novembro de 2019.

Foram consideradas elegíveis para participar do estudo as pacientes que concordaram em participar e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Todas as pacientes incluídas tinham indicação prévia de tratamento de FIV/ICSI por motivos diversos (fator masculino ou tubário, infertilidade inexplicada) e seguiram o protocolo de estimulação individualizado prescrito pelo médico assistente. Para a hiperestimulação ovariana, foram utilizadas doses diárias de 150-300 UI de FSH recombinante (Gonal-F, Merck-Serono, Espanha), FSH urinário (Fostimon, IBSA Institut Biochimique, Suíça), gonadotrofina menopáusic humana (do inglês *human menopausal gonadotropins hMG* - Merional, IBSA Institut Biochimique, Suíça) ou alfacorifolitropina (Elonva, Vetter Pharma-Fertigung GmbH & Co. KG, Alemanha), dependendo da idade, índice de massa corporal (IMC) e resposta ovariana em ciclos anteriores. Doses diárias de 0,25 mg de antagonista do hormônio liberador de gonadotropina (do inglês *gonadotropin-releasing hormone* - GnRH) ganirelix (Orgalutran, Vetter Pharma-Fertigung GmbH & Co. KG, Alemanha) foram iniciadas quando o diâmetro médio do folículo dominante atingiu 14 mm. Quando três ou mais folículos atingiram um diâmetro médio de 17 mm, a gonadotrofina coriônica humana (do inglês *human chorionic gonadotropin* - hCG - Choriomon-M, 10.000UI; IBSA Institut Biochimique SA, Suíça) ou agonista do hormônio liberador de gonadotropina

triptorelina (Gonapeptyl daily 0,2 mg, Ferring, German) foi administrado por via subcutânea, e a coleta oocitária foi realizada 34-36 horas após.

Foram excluídas do estudo as pacientes que usaram clomifeno e/ou letrozol durante a estimulação ovariana controlada, e aquelas que desistiram de participar e revogaram o consentimento.

3.2 Considerações éticas

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais sob o parecer Ginecologia e Obstetrícia (GOB) 033/2016 (ANEXO A).

Foi apresentado o termo de consentimento livre e esclarecido a todas as pacientes convidadas a participar do estudo (APÊNDICE A).

3.3 Aspiração folicular e fertilização *in vitro*

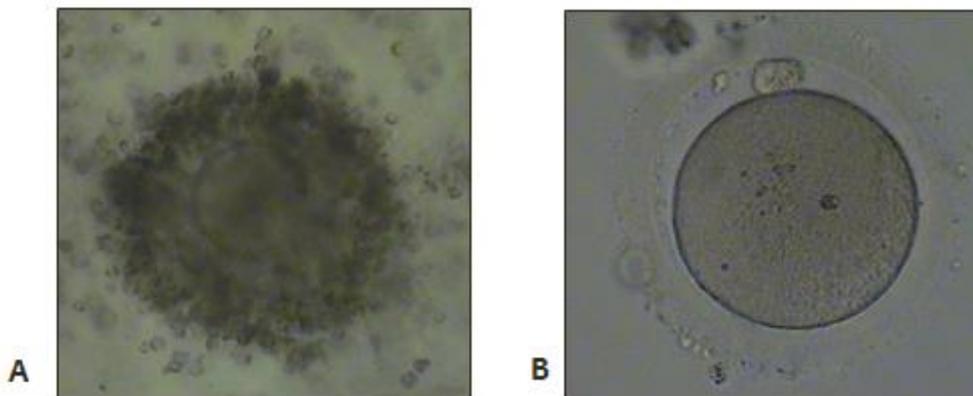
A aspiração dos folículos foi realizada com agulha de 17 Gauge guiada por ultrassom transvaginal (USTV), utilizando-se pressão negativa artificial constante de 180 mmHg para aspiração do líquido folicular, cerca de 34 a 36 horas após a administração do hCG ou análogo do GnRH. O líquido foi coletado em tubos de ensaio estéreis e os oócitos foram imediatamente encaminhados ao laboratório e identificados com o auxílio de uma lupa, em capela de fluxo laminar para manter o ambiente estéril e equilibrado a 8,1% CO₂, 5%O₂, 37°C e incubados no meio *multipurpose handling mediumtrade* (MHM - FUJIFILM Irvine Scientific, Estados Unidos da América – EUA).

3.4 Separação das células da granulosa

3.4.1 Coleta e cultivo das células da granulosa do cumulus oophorus

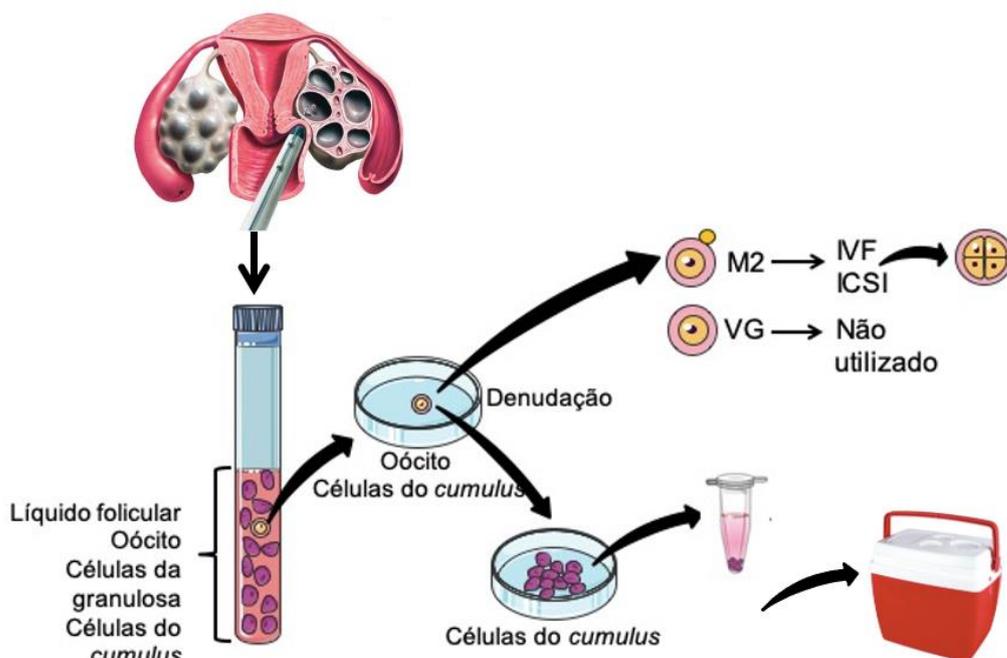
A denudação dos oócitos pela embriologista ocorreu entre 30 e 60 minutos após o término da punção ovariana. Para a retirada das células do *cumulus* foi realizada a denudação enzimática com hialuronidase (HyaseTM-10X-Vitrolife, Suécia) por no máximo 60 segundos. Após a denudação enzimática, os óvulos foram transferidos para outro meio com MHM (FUJIFILM *Irvine Scientific*, EUA), quando foi realizada a denudação mecânica para a retirada das células da corona radiata com pipetas Pasteur, afiladas, de vidro, com diferentes diâmetros, do maior para o menor. Os oócitos, a seguir, foram classificados quanto ao seu grau de maturação: metáfase II (MII), metáfase I (MI) e vesícula germinativa (VG). Os oócitos classificados como MII e os MI que por ventura se tornaram MII durante o cultivo de quatro horas até o momento da ICSI foram utilizados para o tratamento das pacientes.

FIGURA 7: Ilustração do óvulo com as células do *cumulus* e após denudação



A figura 7A representa o óvulo após a separação do líquido folicular e a figura 7B representa o óvulo após denudação, em 200x.

As células do *cumulus* e corona radiata foram transferidas para tubos eppendorfs de 1,5 mL (estéreis e livres de desoxirribonuclease - DNase - e ribonuclease - RNase), contendo 500 µL de meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) completo (5% soro bovino fetal - SBF e 1% de antibiótico e antimicótico, *Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium Thermo Fisher*) e mantidos em gelo até o transporte para o Laboratório do Comportamento Celular no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG), onde os experimentos foram realizados.

FIGURA 8: Etapas da coleta das células do *cumulus*

As células do *cumulus* e corona radiata foram transferidas para tubos eppendorfs de 1,5 mL (estéreis e DNase e RNase free) contendo 500 μ L de meio DMEM completo (5% SBF e 1% de antibiótico e antimicótico, Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium Thermo Fisher) e transferidas para plaqueamento em laboratório.

Neste laboratório as células foram centrifugadas por cinco minutos a 2.000 rotações por minuto (RPM) à temperatura ambiente, o meio descartado e acrescentados 30 μ L de tripsina no pellet das células do *cumulus* e incubação à temperatura ambiente por cinco minutos (para desfazer os clusters das células do *cumulus*). Em seguida, as células foram novamente centrifugadas por cinco minutos a 2.000 rpm à temperatura ambiente e o pellet ressuscitado em 500 μ L de meio DMEM completo (5% soro bovino fetal - SBF e 1% de antibiótico e antimicótico, Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium Thermo Fisher), contadas em câmara de Neubauer, e plaqueadas numa quantidade de 5×10^4 células por poço, em placa de 24 poços, em um volume final de 500 μ L de meio DMEM completo (5% soro bovino fetal - SBF e 1% de antibiótico e antimicótico, Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium Thermo Fisher) por poço. As células foram deixadas em cultivo por 48 horas para aderência às placas.

3.4.2 Avaliação da pureza das células através da coloração das lamínulas com Giemsa e imunocitoquímica (ICC) para alfa inibina

Com o objetivo de visibilizar a morfologia das células do *cumulus* e avaliar a pureza da cultura, as células plaqueadas de três pacientes foram fixadas e coradas com Giemsa e submetidas a ICC para alfa inibina.

Giemsa é um sistema de coloração para estudo de elementos celulares utilizado para diagnóstico *in vitro*, onde os núcleos são corados de azul escuro e o citoplasma variando entre o azul e o rosa, de acordo com a acidez do conteúdo citoplasmático (PEREA-SASIAÍN, 2003).

A inibina é secretada pelas células da granulosa dos folículos ovarianos (ZHENG *et al.*, 2003) e a alfa inibina foi escolhida como marcador de pureza destas células, confirmando que estamos trabalhando com as células do *cumulus* e excluindo os demais tipos celulares.

Para coloração com o Giemsa, após 48 horas de aderência e crescimento das células do *cumulus*, o meio foi retirado dos poços e cada poço lavado duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril. Posteriormente às lavagens, as lamínulas foram fixadas com 500 µL de metanol fresco (em cada poço), por 10 minutos. Em seguida, o metanol foi descartado e cada poço lavado uma vez com 500 µL de metanol fresco. Imediatamente o corante Giemsa (200 µL) foi adicionado, de modo a evitar a absorção de água pelo metanol residual. Depois de dois minutos, o corante foi diluído com 800 µL de água destilada e agitado gentilmente por mais dois minutos para remover a camada de resíduos do corante. As células foram então lavadas gentilmente até que toda a coloração rósea fosse removida. Ao término as lamínulas foram retiradas dos poços, a borda seca encostando-as em papel absorvente e montadas em lâminas de microscopia com *Entellan*® (Merck, Darmstadt, Germany) (Figura 9). As lâminas foram digitalizadas no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens do ICB-UFMG (CAPI/ICB/UFMG).

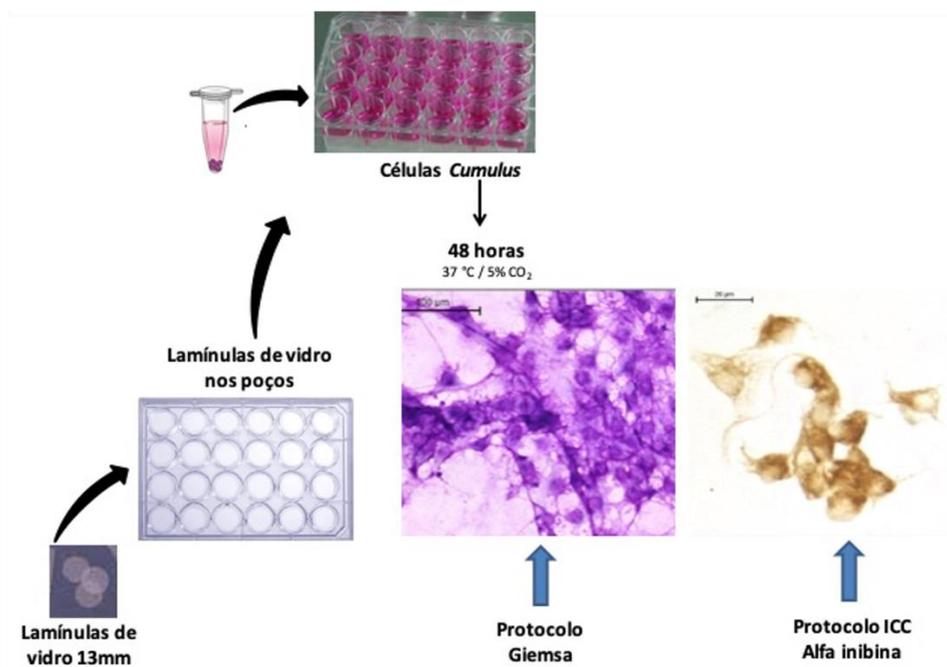
Para a realização da ICC para alfa inibina, as células foram lavadas uma vez com PBS (que em seguida foi removido) e fixadas por duas horas com formaldeído 4%. Os poços foram então lavados por três vezes com PBS. Feita a fixação, as células foram permeabilizadas com PBS+BSA 2% + triton 0,1% por 10 minutos e logo

incubadas com solução de bloqueio de peroxidase por cinco minutos (*Peroxidase Block - Novocastra™ Peroxidase Detection System – RE7101*). Após lavar duas vezes com PBS, as lamínulas foram incubadas por cinco minutos com solução de bloqueio de proteína (*Novocastra™ Peroxidase Detection System - Protein Block – RE7102*). As lamínulas foram, então, lavadas por duas vezes com PBS e incubadas por uma hora com o anticorpo primário anti alfa inibina em diluição 1:100 (Abcam, mouse monoclonal [BC/R1], Cat. No. ab724-500) em câmara úmida.

Ao término da incubação com o anticorpo primário, as lamínulas foram lavadas duas vezes com PBS por cinco minutos, seguindo com a incubação com o anticorpo secundário biotilado (*Novocastra™ Peroxidase Detection System – RE7103*), aplicando-se uma gota sobre o plástico insufilm esticado sobre a tampa da placa e com as lamínulas sendo viradas sobre a gota por 30 minutos à temperatura ambiente. Terminada a incubação e lavado o excedente de anticorpo secundário 2 vezes por cinco minutos com PBS, as lamínulas foram incubadas por 30 minutos com streptavidina-HRP (*Novocastra™ Peroxidase Detection System – RE7104*), com duas lavagens ao final com PBS por cinco minutos.

As lamínulas foram coradas com uma solução contendo 25 µL de 3,3'-diaminobenzidina (cromógeno DAB) (*Novocastra™ Peroxidase Detection System*) em 475 µL de tampão do DAB (*Novocastra™ Peroxidase Detection System – RE7106*), preparado 50 minutos antes e mantido ao abrigo da luz. Concluída a imunocoloração, as lamínulas foram lavadas duas vezes por cinco minutos em PBS e montadas sobre uma lâmina com Entellan® (Merck, Darmstadt, Germany) (Figura 9). As fotos das lâminas foram digitalizadas no CAPI/ICB/UFMG.

FIGURA 9: Montagem da placa para cultura primária de células do *cumulus*



A pureza da cultura foi confirmada por análise morfológica (Giemsa) e a imunocitoquímica (ICC) para alfa inibina, para confirmação de que as células aderidas eram puramente células do *cumulus*.

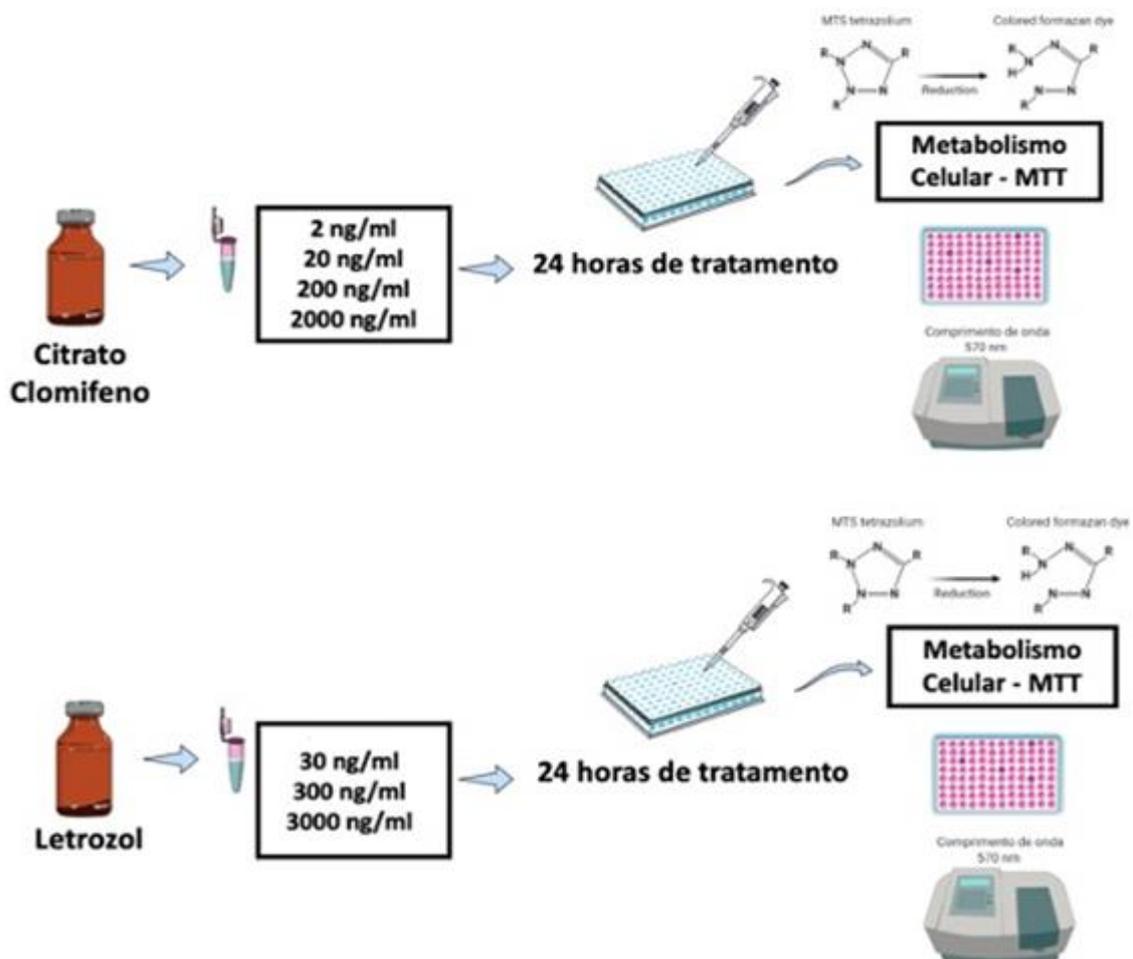
3.4.3 Ensaio MTT: efeitos na viabilidade e metabolismo mitocondrial celular

O ensaio colorimétrico do brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5difeniltetrazolio], conhecido como MTT, mede a viabilidade celular. O resultado está relacionado à capacidade de enzimas desidrogenases, presentes nas mitocôndrias e citoplasma de células viáveis, em reduzir o anel de tetrazólio, formando cristais de formazam de coloração azul. O acúmulo desses cristais em células metabolicamente viáveis é medido a partir da leitura em espectrofotômetro (MOSMAN, 1983).

O ensaio MTT (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EUA) foi utilizado para avaliar a citotoxicidade e efeitos na viabilidade celular do citrato de clomifeno e letrozol nas células do *cumulus*. Depois de contadas, as células foram dispostas em placas de cultivo de 96 poços na densidade de aproximadamente 4.000 células por poço e incubadas 24 horas para aderência. Após esse período, as células foram tratadas com diferentes concentrações de citrato de clomifeno (2, 20, 200 e 2.000 ng/mL) e letrozol (30, 300 e 3.000 ng/mL), em triplicata, e novamente incubadas em estufa por 24 horas. Depois dessa incubação, retirou-se o sobrenadante da placa utilizando uma bomba de vácuo e adicionou-se 100 µL da solução de MTT (*Sigma-Aldrich*,

EUA) na concentração de 0,25 mg/mL, e a placa foi novamente incubada por quatro horas, ao abrigo da luz. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados a cada poço para solubilizar os cristais de formazan. A leitura da absorbância foi realizada em aparelho leitor de microplacas (SpectraMax 190 absorbance microplate reader, *Molecular Devices Corp.*, Sunnyvale, CA.) em comprimento de onda de 570 nm (figura 10). Com a obtenção dos valores de absorbância foi realizada a correção com a subtração da leitura do branco e determinação do percentual de viabilidade celular, sendo o valor de absorbância encontrado para o controle utilizado como referência (100%).

FIGURA 10: Esquema para o ensaio MTT



O ensaio colorimétrico brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5difeniltetrazolio] (MTT) para avaliar a viabilidade celular e o metabolismo mitocondrial após 24 horas de tratamento com o citrato de clomifeno e letrozol.

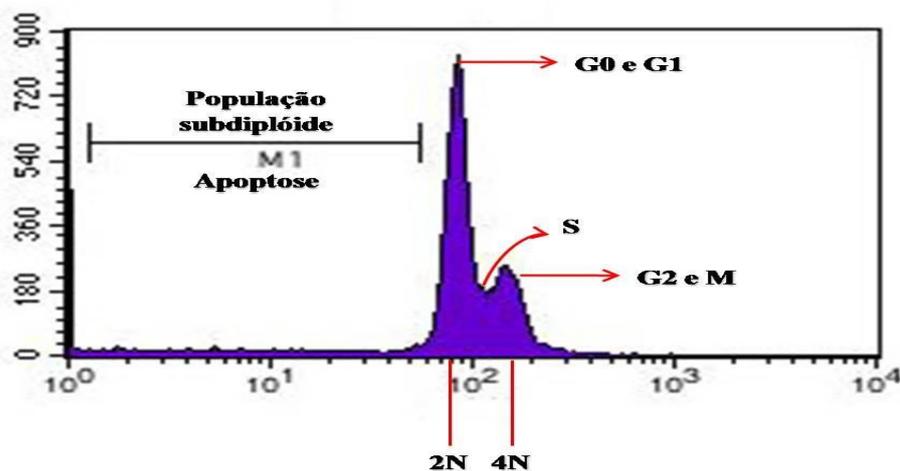
3.4.4 Cultivo das células da granulosa do cumulus ooforus

Após ter permanecido por 48 horas em placas de 24 poços em DMEM completo (5% soro bovino fetal - SBF e 1% de antibiótico e antimicótico, Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium Thermo Fisher) a monocamada de células de oito pacientes foi tratada com CC, CC+E, LE, LE + E, além do seu grupo-controle sem tratamento. O meio com 5% de SBF foi retirado dos poços; e meio DMEM completo contendo a concentração das drogas foi adicionado aos respectivos poços. A concentração utilizada de CC foi de 200 ng/mL, de LE 300 ng/mL e E $3,3 \times 10^3$ ng/mL. A dose escolhida foi baseada no nível sérico encontrado após a administração dessas drogas a seres humanos, nas posologias mais usuais, considerando a administração por via oral de 100mg de citrato de clomifeno, 5mg de letrozol e 2mg de valearato de estradiol, segundo a biodisponibilidade descrita em bula, já que não demonstraram toxicidade. Após 24 horas de tratamento com as drogas incubadas a 5% CO₂ em ar umidificado a 37 °C, as placas foram retiradas para avaliação das células por citometria de fluxo.

3.4.5 Análise das fases ciclo celular

Para analisar as fases do ciclo celular das células da granulosa do *cumulus* tratadas com CC, CC + E, LE e LE + E e das células-controle e observar se houve alteração da proporção de células em cada uma das fases do ciclo celular (G0/G1, S, G2, M) ou apoptose (população subdiploide), foi feita a coloração com iodeto de propídeo (PI) e análise por citometria de fluxo descrita por Vindelov, Christensen e Nissen (1983) (Figura 11). Este método se baseia na lise das membranas celulares e produz núcleos corados em suspensão a partir de três etapas.

FIGURA 11: Diagrama representativo das fases do ciclo celular a partir da citometria de fluxo



Os núcleos encontrados na linha M1 são contados como núcleos apoptóticos. 2N = população diploide, 4N = população tetraploide (logo após a duplicação do DNA na fase S).

3.4.6 Leitura no citômetro de fluxo

Após 24 horas de tratamento, o meio (sobrenadante) foi retirado de cada poço e transferido para um tubo *ependorf* de 2 mL, que em seguida era centrifugado a 3.000 rpm por três minutos. O sobrenadante era descartado e as células eram ressuspensas em 100 µL de solução fluorocrômica hipotônica (HFS, do inglês *hypotonic fluorochromic solution* - 0,1% citrato de sódio, 0,1% Triton X-100, 50 µg/mL iodeto de propídeo). Concomitantemente, 400 µL da solução eram adicionados na monocamada das células, e ambos incubados por no mínimo quatro horas a 4°C e protegidos da luz com papel alumínio. Ao término da incubação retirava-se o volume de 400 µL da placa e transferia-se para o tubo *ependorf* de 2 mL juntamente com o volume de 100 µL armazenado no tubo.

Finalmente, o volume final de 500 µL transferido para um tubo de leitura para o citômetro e as células analisadas quanto à porcentagem de apoptose, de acordo com o protocolo descrito por Nicoletti *et al.* (1991), com algumas adaptações. A leitura foi realizada no citômetro de fluxo da BD LSRFortessa (BD Biosciences), no Laboratório Institucional de Pesquisa em Biomarcadores do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG.

No citômetro de fluxo foram lidos 5.000 eventos (células), e um histograma foi gerado ao final da leitura no *software CellQuest* (WANG; ZHENG, 2002).

FIGURA 12: Estratégia utilizada para os ensaios de ciclo celular e para análise no citômetro de fluxo

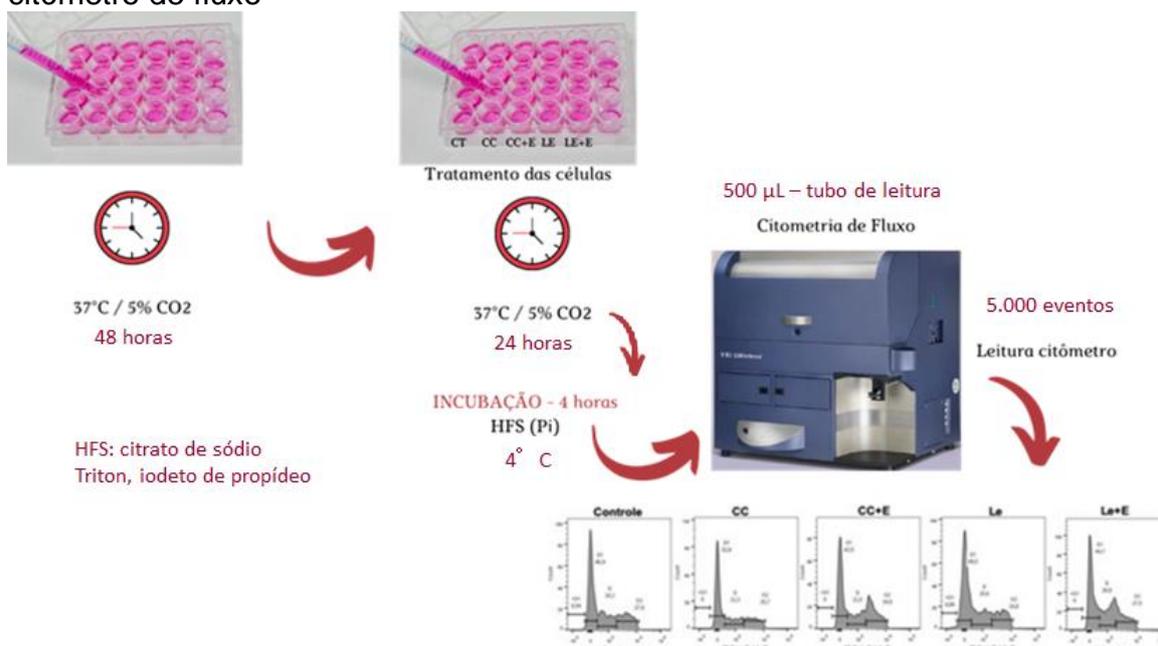


Ilustração representativa do cultivo celular por 48h para aderência à placa seguido de tratamento com as drogas por 24h, incubação com iodeto de propídeo e posterior análise e leitura no citômetro de fluxo.

3.4.7 Extração de RNA, transcrição reversa e PCR em tempo real

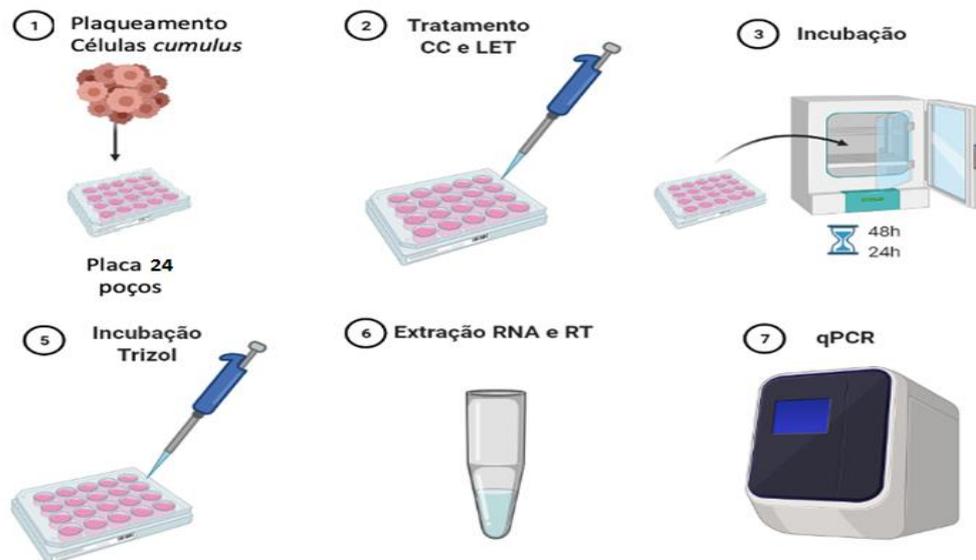
Para avaliar a expressão gênica de caspase-3, Bax, SOD2 e do normalizador S26, realizou-se a extração do RNA total das células do *cumulus* controle (sem tratamento) tratadas com CC, CC + E, LE, LE+E de oito pacientes. O experimento, anteriormente descrito, foi seguido de 24 horas de tratamento com as drogas, nas mesmas concentrações utilizadas, em placas de 24 poços.

O meio foi retirado dos poços, seguido da adição de 500 µL de trizol® (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) ao primeiro poço da duplicata, com diversas “lavagens” com o próprio trizol para a remoção de todas as células. O volume foi então transferido para o segundo poço da duplicata e o processo anterior repetido. Ao final, o volume total de 1.000 µL foi transferido para eppendorfs de 2 mL (livre de DNase e RNase) e armazenado em gelo. Procedeu-se à extração do RNA total de acordo com o protocolo do reagente trizol® (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), sem modificações. A integridade e concentração do RNA foram avaliadas por meio da quantificação em NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, USA).

Para a síntese do ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) realizou-se a transcrição reversa com o kit M-MLV Reverse Transcriptase (*Invitrogen Life Technologies*, Carlsbad, CA, USA), sem modificações, e utilizando-se como iniciadores random hexamers e oligo dT no total de 1.000 ng de RNA, com volume final da reação de 40 μ L. O mix foi então submetido à incubação a 40°C por uma hora no termociclador *MiniAmp™ Plus Thermal Cycler* (*Thermo Fisher Scientific*, Wilmington, Delaware, EUA).

Feita a transcrição reversa, o cDNA gerado foi submetido à PCR em tempo real utilizando-se o kit Power SYBR Green® PCR Master Mix Kit (*Invitrogen Life Technologies*, Carlsbad, CA, USA) usando-se os primers descritos na tabela 1. As amostras (50 ng de cDNA) foram aplicadas em placas de 96 poços (*ABI PRISM® 96-Well Optical Reaction Plate with Barcode*, *Invitrogen Life Technologies*, Carlsbad, CA, USA), em duplicata, reagentes em concentrações e quantidade de acordo com o descrito pelo protocolo do fabricante, com o volume final de 20 μ L. A reação de PCR em tempo real foi realizada no equipamento StepOnePlus™ System (*Thermo Fisher Scientific*, Wilmington, Delaware, USA), seguindo o ciclo termal padrão do equipamento. E ao final, foi realizada a curva de dissociação a 60°C/1 minuto, para determinação da especificidade dos fragmentos amplificados.

FIGURA 13: Estratégia utilizada para os ensaios de PCR em tempo real



Descrição das etapas do experimento: Cultivo celular por 48h em placa de 24 poços seguido do tratamento com as drogas por 24h. Incubação com trizol, extração do RNA, transcrição reversa e CR em tempo real.

TABELA 1 - Primers para PCR em tempo real

Primers	Foward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Tamanho amplicon	nº acesso GenBank
S26	TGTGCTTCCCAAGCTGTATG TGAAG	CGATTCCTGACTACTTTGCTGT GAA	75 bp	NM_001029.3
Bax	TCTACTTTGCCAGCAAAGTGT GTGC	TGTCCAGCCCATGATGGTTCTG AT	80 bp	NM_138765.3
SOD2	CCTACGTGAACAACCTGAAC	GAAGAGCTATCTGGGCTGTA	84 bp	NM_000636.4
CASP3	GTAGATGGTTTGAGCCTGAG	CCAGTGCGTATGGAGAAATG	106 bp	NM_032991.2

Seqüência de nucleotídeos dos primers utilizados para PCR em tempo real.

3.5 Análise estatística

Para verificar se as pacientes alocadas no grupo citometria de fluxo e no grupo PCR representavam um mesmo perfil epidemiológico, foi comparada a média entre os parâmetros idade, número de oócitos coletados e percentual de oócitos maduros. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e ao teste de comparação de médias teste t não pareado.

Para interpretação dos resultados da citometria de fluxo e MTT, os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk, seguido do teste t pareado ou teste de Wilcoxon, de acordo com a normalidade.

Os dados da expressão gênica foram normalizados com o gene housekeeping S26 por meio do método ΔCt (Ct do gene alvo - Ct do gene normalizador), e a expressão gênica relativa avaliada por meio do *fold change* com os dados de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Para a análise estatística a normalidade foi avaliada pelo teste D'Agostino & Pearson seguido do teste t pareado ou teste de Wilcoxon, a depender da normalidade.

O *software* utilizado foi o *GraphPad Prism v8* e foram consideradas como significativos os resultados cuja probabilidade de significância do teste foi de $p < 0,05$ e pelo menos 95% de confiança.

4 RESULTADOS

4.1 Dados clínicos, comparação entre o grupo avaliado pela citometria de fluxo e o grupo avaliado por meio da PCR

Uma paciente foi excluída do grupo avaliado a partir da citometria de fluxo por ter utilizado letrozol durante a estimulação ovariana, avaliando-se, assim, sete pacientes neste grupo e oito pacientes no grupo estudado através do PCR. A tabela 2 apresenta medidas descritivas dos dados clínicos separadas por grupo. Conforme descrito na tabela 3, os grupos são homogêneos e não diferem entre si quando considerados idade, número de oócitos coletados e porcentagem de oócitos maduros.

TABELA 2 - Medidas descritivas dos dados clínicos das pacientes alocadas no grupo PCR e grupo citometria de fluxo

Variável	Medidas descritivas (%)				
	n	Mínimo	Máximo	Média	dp
Grupo PCR					
Idade	8	27	38	33,63	3,85
Nº de oócitos coletados	8	15	30	20,88	4,48
% de oócitos maduros	8	61,11	100	83,68	13,56
Grupo Citometria de fluxo					
Idade	7	34	41	36,29	2,36
Nº de oócitos coletados	7	5	38	16,86	11,13
% de oócitos maduros	7	60,87	100	77,34	14,03

Medidas descritivas do grupo submetido à PCR e citometria de fluxo, em relação à idade, número de oócitos coletados e número de oócitos maduros.

TABELA 3 - Comparação de médias entre pacientes do grupo destinado à citometria de fluxo e à PCR

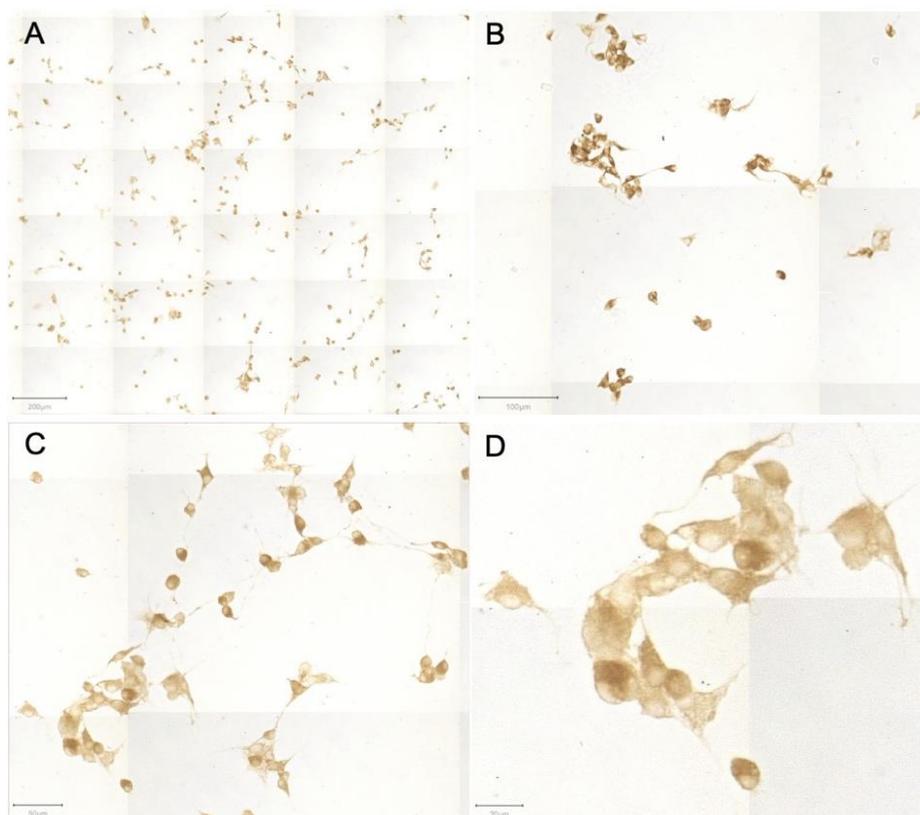
Variável	Grupo PCR		Grupo Citometria de fluxo		p
	Média	dp	Média	dp	
Idade	33,63	3,85	36,29	2,36	0,1377
Nº de oócitos coletados	20,88	4,48	16,86	11,13	0,3636
% de oócitos maduros	83,68	13,56	77,34	14,03	0,3906

Comparação das médias e desvio padrão (dp) em relação à idade, número de oócitos coletados e porcentagem de oócitos maduros, comparando o grupo submetido à PCR e à citometria de fluxo

4.2 Imunocitoquímica para alfa inibina

Após adesão e manutenção das células em cultura por 48 horas, a imunocitoquímica para marcação de alfa inibina demonstrou ser positiva para todas as células e indicou a pureza da cultura para os próximos testes de cultivo e tratamento com as drogas CC e LE (Figura 14).

FIGURA 14: Imunomarcção de alfa inibina em células da granulosa do *cumulus*



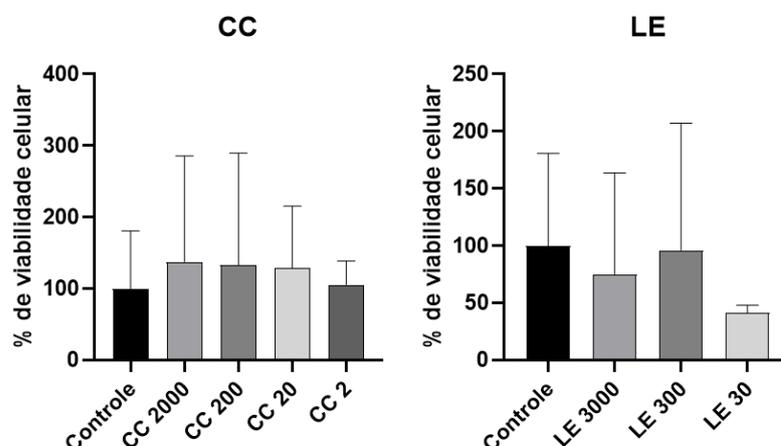
Células obtidas após denudação oocitária, mantidas em cultura por 48 horas e aderidas em lamínulas, foram utilizadas como controle para protocolo de cultura primária das células do *cumulus* e da pureza do tipo celular presente em cultura (sem outros tipos celulares contaminantes), para início dos testes com as drogas CC e LE. Todas as células apresentaram marcação citoplasmática positiva para alfa inibina (A, B, C e D – 200, 100, 50 e 20 μm , respectivamente).

4.3 Ensaio com MTT: citotoxicidade

Conforme observado no gráfico 1, não foi evidenciada diferença estatisticamente significativa no percentual de viabilidade celular após o tratamento com CC ou LE em diferentes concentrações, após 24 horas de tratamento. Na tabela 4 são

apresentados os valores de média e desvio-padrão do percentual de viabilidade celular observados em cada grupo.

GRÁFICO 1 - Percentual de viabilidade celular obtido pelo ensaio de MTT em células após 24h de tratamento com CC ou LE



Demonstração do percentual de viabilidade celular com diferentes concentrações de CC e LE após 24h de tratamento, demonstrando não haver citotoxicidade nas diferentes concentrações utilizadas.

TABELA 4 - Medidas descritivas do percentual de células viáveis no ensaio de MTT de células submetidas ao tratamento com CC e LE

Grupos de estudo	Medidas descritivas (%)	
	Média	dp
• CC		
Controle	100	80,64
2000 ng/mL	137,4	148,1
200 ng/mL	133,3	156,2
20 ng/mL	128,6	86,45
2 ng/mL	105,5	32,88
• LE		
Controle	100	80,64
3000 ng/mL	74,43	89,27
300 ng/mL	95,89	111,1
30 ng/mL	41,05	6,87

Média e desvio padrão do percentual de células viáveis no MTT em diferentes concentrações de CC e LE, demonstrando não haver citotoxicidade em nenhuma das concentrações avaliadas.

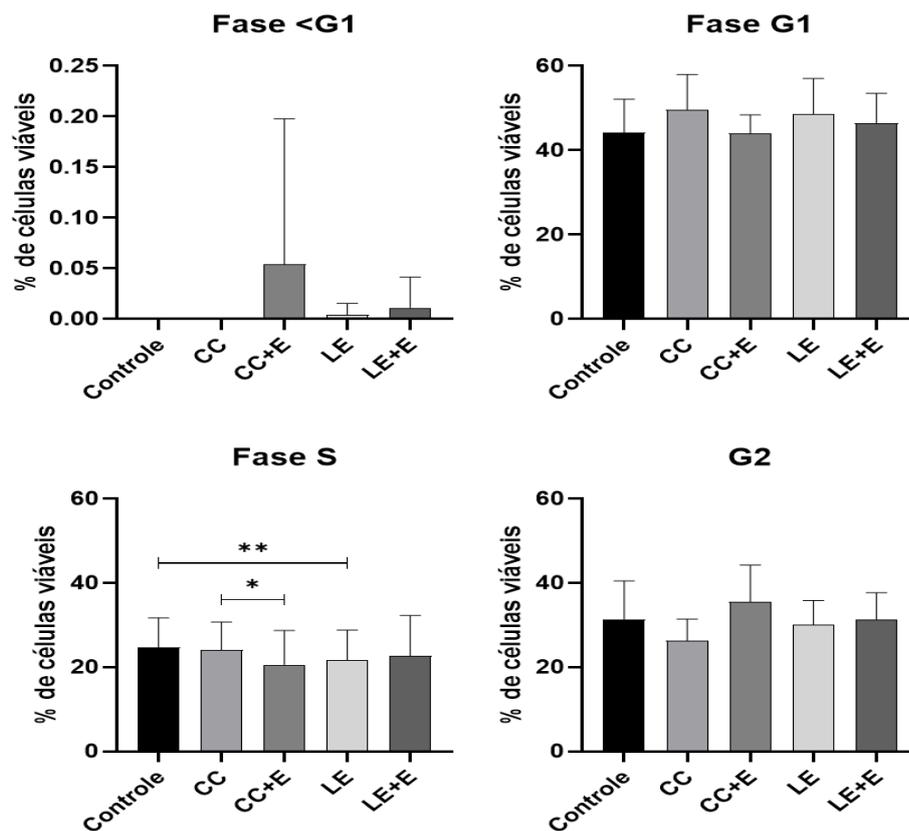
4.4 Avaliação do ciclo celular pela citometria de fluxo

O percentual médio de células em <G1 (subdiploide), G1 e G2 não apresentou diferença estatisticamente significativa em qualquer um dos tratamentos realizados quando comparado ao grupo-controle. Já para a fase S, o tratamento com LE reduziu o percentual médio de células quando comparado ao controle (média grupo-

controle: 24,79, média grupo LE: 21,70, $p=0,0014$) e também apresentou diferença quando comparados entre si os grupos CC e CC + E (média CC: 24,13, média CC+E: 20,61, $p=0,0442$).

Resultados representados no gráfico 2 e os valores de média, mínimo, máximo e desvio-padrão do percentual de todos os grupos estudados são apresentados na tabela 5.

GRÁFICO 2 - Médias dos percentuais de células viáveis por fase do ciclo celular, por grupo de estudo, após 24 horas de tratamento com as drogas.



* $p<0,05$; ** $p<0,01$ (Teste t pareado).

Gráficos descrevem a porcentagem de células viáveis nas fases <G1 (subdiploide), G1, S e G2 do ciclo celular após 24h de tratamento com CC, CC + E, LE, LE + E e grupo controle. Observado raras células em <G1 sem significância estatística e a redução do percentual de células viáveis na fase S quando avaliado o grupo tratado com LE em relação ao controle, e quando avaliado o grupo tratado com CC+E em relação ao grupo CC.

TABELA 5 - Medidas descritivas do percentual de células viáveis por fase do ciclo celular, por grupo de estudo, após 24 horas de tratamento.

Grupos de estudo	N=7	Medidas descritivas (%)			
		Mínimo	Máximo	Média	dp
• <G1					
Controle		0,00	0,00	0,00	0,00
CC		0,00	0,00	0,00	0,00
CC + E		0,00	0,38	0,05	0,14
LE		0,00	0,03	0,004	0,011
LE + E		0,00	0,08	0,011	0,03
• G1					
Controle		32,10	53,13	44,20	7,93
CC		38,40	60,10	49,57	8,38
CC + E		35,90	48,40	44,06	4,38
LE		33,40	56,00	48,57	8,46
LE + E		37,80	54,10	46,45	7,05
• S					
Controle		15,70	33,77	24,79	6,93
CC		14,10	32,03	24,13	6,58
CC + E		8,72	28,00	20,61	8,13
LE		13,00	30,37	21,70	7,15
LE + E		8,69	32,45	22,72	9,57
• G2					
Controle		14,37	42,60	31,40	9,10
CC		18,73	33,90	26,30	5,14
CC + E		24,83	50,70	35,50	8,74
LE		20,97	39,50	30,05	5,80
LE + E		22,50	39,20	31,30	6,46

Medidas descritivas dos grupos de tratamento (controle, CC, CC+E, LE, LE + E) em cada uma das fases do ciclo celular (<G1, G1, S, G2).

4.5 PCR em tempo real

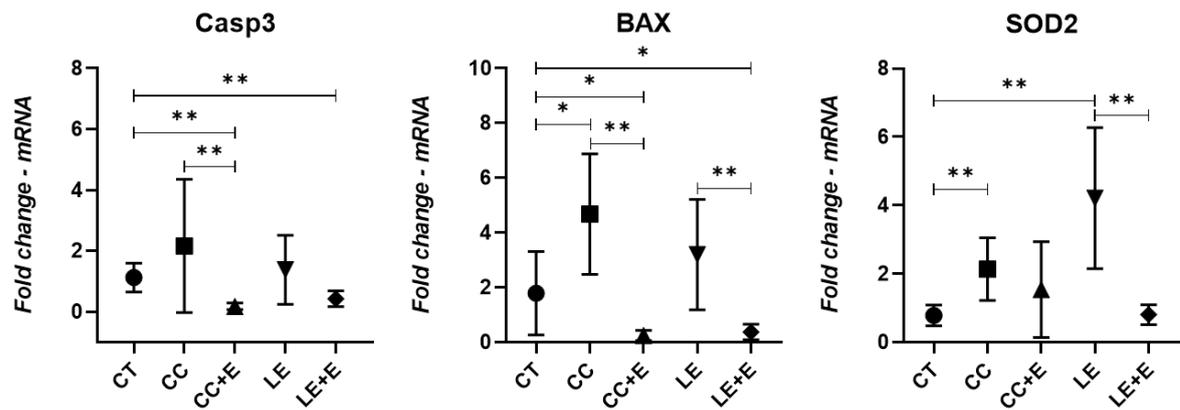
Foi realizada a comparação entre o *fold change* médio de expressão dos genes caspase-3, Bax e SOD2 em células submetidas ao tratamento com CC, LE, CC+E e LE+E em relação ao controle não tratado.

Quando realizada a comparação entre o grupo-controle e o grupo tratado com CC obteve-se aumento na expressão de Bax ($p=0,0119$) e SOD2 ($p=0,0061$) no grupo tratado com o CC em relação ao grupo-controle. No grupo CC+E foi observada modulação na expressão de Bax e caspase-3, reduzindo a expressão de Bax ($p=0,0156$) e caspase-3 ($p=0,0017$) em relação ao controle. Ao comparar o grupo CC e CC+E identificou-se redução na expressão de caspase-3 ($p=0,0078$) e Bax ($p=0,0078$), no grupo tratado adicionalmente com estradiol.

No grupo tratado com letrozol também foi identificado aumento na expressão de SOD2 em relação ao controle ($p=0,0017$). E quando comparado LE e LE+E, além da

redução na expressão de SOD2 ($p=0,0078$), também se apurou redução na expressão de Bax ($p=0,0078$) no grupo adicionalmente tratado com estradiol. No grupo LE+E também foi constatada redução na expressão de caspase-3 ($p=0,0049$) e Bax ($p=0,0391$) em relação ao controle.

GRÁFICO 3 - *Fold change* observados para a expressão de caspase-3, Bax e SOD2, após 24 horas de tratamento com CC, LE e E



* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Graficos demonstram *fold change* para a expressão de Caspase 3, Bax e SOD2 para os 5 grupos estudados: controle (CT) , CC, CC+E, LE, LE+E após 24h de tratamento.

5 DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo com células do *cumulus* humano *in vitro* tratadas com CC, LE e em associação com E, na tentativa de avaliar se estas drogas induzem apoptose nas células do *cumulus* e se o estradiol seria um fator de proteção para esse evento.

Os resultados encontrados a partir da citometria de fluxo não indicaram diferença nas taxas de morte celular por apoptose nas células do *cumulus* tratadas por 24 horas com CC e LE. Nos grupos CC+E, LE e LE+E foram identificadas raras células em <G1 (fragmentação nuclear), mas sem significância estatística, sendo a média de 0,05% no grupo CC+E, 0,004% no grupo LE e 0,011 em LE+E. É sabido que uma pequena porcentagem das células da granulosa fisiologicamente evolui para apoptose (HUGHES; GOROSPE, 1991). E também é possível encontrar algumas células da granulosa em apoptose mesmo em folículos saudáveis sem impacto na qualidade oocitária (ROSE; BROWN, 2020). A redução do percentual médio de células na fase S no grupo LE quando comparado ao controle e no grupo CC+E quando comparado ao CC pode indicar a permanência das células em G1, indicando uma possível parada no ponto de reparo em G1, mas essa hipótese deve ser reproduzida para melhor entendimento desse processo.

A cultura primária de células da granulosa é um processo muito variável e pode ser modificado pelo tipo e tempo de cultivo. Kossowska-Tomaszczuk *et al.* (2009) demonstraram pela primeira vez que as células da granulosa luteinizadas em cultivo prolongado com fator inibidor de leucemia (do inglês *leukemia-inhibiting factor* - LIF) podem se diferenciar em tipos celulares habitualmente inexistentes no ovário, como neurônios, osteoblastos e condrócitos, o que caracterizaria sua multipotência. O cultivo celular em nosso trabalho foi de 48h, seguido de 24h com a adição das substâncias do estudo. Não é esperada essa diferenciação importante em curto período de tempo sem fatores de crescimento que induzam estas transformações, mas é sabido que *in vitro* as células podem se comportar diferentemente do esperado.

Trabalhamos com culturas primárias de células do *cumulus* de pacientes em tratamento de infertilidade, submetidas ao processo de fertilização *in vitro*, não trabalhamos com linhagem imortalizada. Além disso, as concentrações das drogas de estudo foram utilizadas em concentrações fisiológicas, próximo ao valor sérico encontrado após sua administração em humanos.

Para que as células de uma mesma paciente pudessem ser incluídas nos cinco grupos de tratamento e analisadas em duplicata para a extração de RNA e em triplicata para a citometria de fluxo, foi necessário incluir apenas as pacientes com maior número de folículos, já que a escassez de células por grupo impediria a análise correta. Ao considerar apenas pacientes com mais folículos, além de não permitir a adequada análise das pacientes com pior resposta à estimulação, poderia subestimar a ocorrência de apoptose, já que essas pacientes são mais suscetíveis ao desenvolvimento de apoptose nas células da granulosa mesmo sem a adição das drogas em estudo.

Fan (2019) evidenciaram que mulheres com reserva ovariana diminuída têm significativo aumento de apoptose total, precoce e tardia nas células murais da granulosa quando comparadas com pacientes com reserva ovariana normal. Ao analisar a apoptose nas células do *cumulus*, encontraram aumento na apoptose precoce relacionada a idade avançada e comprometimento da reserva ovariana, mas não identificaram essa relação quando avaliadas apoptose tardia ou apoptose total. Isso pode ser explicado por maior suscetibilidade das células murais da granulosa quando comparadas às células do *cumulus*.

Em 1997, Nakahara *et al.* associaram apoptose nas células da granulosa à má resposta à estimulação ovariana em tratamentos de fertilização *in vitro*, correlacionando aumento nas taxas de apoptose a menor número de folículos puncionados, o que poderia impactar em nossos resultados, considerando a população aqui estudada.

A utilização prévia de FSH pelas pacientes durante a estimulação ovariana poderia ter conferido algum grau de proteção para que as células do *cumulus* não sofressem apoptose. Segundo Shen (2014; 2017), o FSH tem a capacidade de antagonizar a apoptose nas células da granulosa por vias não totalmente elucidadas. E em seu

estudo realizado em ratas, a adição de FSH demonstrou a proteção contra apoptose nas células da granulosa pela supressão de FOX 1. Outros estudos sugerem que o FSH possa ter efeitos distintos na expressão de FOX 1 em diferentes estágios foliculares (FAN *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2009).

Ao constatar que a citometria de fluxo não identificou aumento nas taxas de apoptose das células do *cumulus*, buscou-se avaliar por meio da PCR alguma correlação com a via intrínseca da apoptose, quando se conseguiu identificar aumento na expressão gênica de Bax no grupo tratado apenas com o CC, com importante neutralização dessa atividade pela adição do E, sendo, inclusive, inferior ao grupo-controle. Isso se justifica pelo efeito protetor do E ao inibir apoptose. O estrogênio, em condições fisiológicas, não apresenta efeito antioxidante *in vivo*, mas ao se ligar ao seu receptor (ER α , ER β e G *protein-coupled estrogen receptor* - GPER) promove um mecanismo de sinalização celular que resulta na regulação positiva de genes antioxidantes, aumentando a expressão de enzimas como SOD2 e GPx, como demonstrado *in vitro* na adição de estradiol à cultura de células MCF7 (linhagem celular derivada de carcinoma de glândulas mamárias) por ativação de MAP quinase (*mitogen-activated protein MAP kinases*) e NF- κ B (*factor nuclear kappa B*) (MANCINI *et al.*, 2013; VINA *et al.*, 2006).

Chaube *et al.* (2005) identificaram aumento na expressão de Bax nas células da granulosa de ratas tratadas com CC, três vezes maior que o controle, enquanto a adição de E protegeu contra esse evento, apresentando níveis próximos ao controle. Em nosso estudo a adição de E levou a uma expressão de Bax menor que o controle sem tratamento. Em estudo similar, Tripathi *et al.* (2011) relataram que o citrato de clomifeno aumentou de forma significativa a concentração de peróxido de hidrogênio, reduziu a atividade de catalase e induziu a retomada da meiose no ciclo celular.

Casarini *et al.* (2017) postularam que a adição de 17 beta estradiol à cultura de células imortalizadas de hGLC (*human primary granulosa lutein cells*) induziu a ativação de proteína quinase B (do inglês *protein kinase B* - pAKT) e bloqueou a clivagem de pró-caspase-3, revertendo o efeito pró-apoptótico relacionado ao cultivo de 72h com hCG. O nível máximo de fosforilação foi observado após 15 minutos de exposição ao E, porém sua ativação só foi observada após 48h.

A ativação de caspase-9 e caspase-3 depois de 48h de tratamento com CC foi identificada por Li (2019), sugerindo seu papel na via intrínseca da apoptose. No presente trabalho a avaliação foi realizada após 24h de tratamento e não se chegou a detectar aumento da expressão de caspase-3 relacionado à adição de citrato de clomifeno, mas verificou-se sua modulação quando adicionado estradiol à cultura tanto em associação ao CC quanto em associação ao LE quando comparados ao grupo-controle, além de redução em sua expressão quando comparados CC+E e CC isoladamente.

Andrógenos são os primeiros fatores antiapoptóticos nos folículos antrais e pré-antrais, por aumentarem receptores de FSH e estimularem a mitose, além de também inibir a apoptose nas células da granulosa pela produção de microRNA-125b, que suprime a produção de proteínas pró-apoptóticas (ROSE; BROWN, 2020; SEN *et al.*, 2014). Inibidores de aromatase têm efeito comprovado na supressão da produção de estrogênio, por isso sua utilização é bem estabelecida para mulher menopausada após câncer de mama (ESKEW *et al.*, 2019; ROSE; BROWN 2020).

Em culturas que avaliaram proliferação MCF-7, foi referida diminuição da expressão de Bcl2 pelos inibidores da aromatase, enquanto houve aumento na expressão de proteínas Bax e caspase-3 comparado ao controle (ITOH *et al.*, 2005; THIANANAWAT; LONG; BRODIE, 2003). Ao reproduzir o estudo em ratas, Thiantanawat, Long e Brodie acusaram expressão aumentada de Bax de maneira transitória, retornando ao estado inicial após sete e quatorze dias de tratamento com LE. A expressão aumentada de Bax e diminuída de Bcl2 também foi descrita por Xia (2013), ao tratarem implantes endometrióticos de ratos com LE quando comparados aos controles.

SOD2 é um antioxidante enzimático expresso na mitocôndria, que contém manganês (Mn-SOD) e tem sua expressão altamente detectada em células da teca e granulosa luteinizadas, protegendo essas células contra o estresse oxidativo (WANG *et al.*, 2017). SOD e catalase são importantes antioxidantes (YANG *et al.*, 2021) e níveis reduzidos de SOD2 têm sido correlacionados com o avançar da idade e a redução da habilidade das células em remover o dano oxidativo (PERKINS *et al.*, 2019), além de estar relacionado a pior resultado após tratamento de fertilização *in vitro* (YANG *et al.*, 2021). Existe correlação positiva entre atividade enzimática da

SOD e níveis intrafoliculares de estradiol, relacionados à qualidade do oócito após tratamento de fertilização *in vitro* (AMBE *et al.* 2005). Dessa forma, o aumento da expressão de SOD 2 no grupo tratado com LE em nosso trabalho poderia estar associado a um efeito antiapoptótico dos androgênios relacionado à expressão de microRNA 125b (SEN *et al.*, 2014), já que a maioria das SODs pode ser alvo de microRNAs como um mecanismo regulador das suas funções antioxidantes (LU *et al.*, 2020).

Não se pode afirmar que essas drogas causem apoptose nas células do *cumulus*, já que a expressão gênica é um evento inicial e foi avaliado apenas com 24 horas de tratamento. Constatou-se a expressão aumentada de Bax que pode estar sendo modulada por certo estresse oxidativo no ciclo celular e a consequente modulação de SOD2 como uma tentativa de resposta a esse estresse oxidativo.

6 CONCLUSÕES

O presente estudo não comprovou aumento de apoptose nas células do *cumulus oophorus* humanas tratadas com CC e LE por citometria de fluxo, mas observou-se modulação da expressão gênica de Bax, SOD2 e caspase-3 nessas mesmas células por meio da PCR em tempo real, com essas drogas isoladamente e em associação ao E.

O CC aumentou a expressão de Bax e SOD2; o LE aumentou a expressão de SOD2 e a adição de E reduziu a expressão de Bax e caspase-3, tanto em associação ao CC quanto em associação ao LE em relação ao controle. A adição de E reduziu a expressão de Bax e caspase-3 quando comparados CC e CC+E. Quando comparados LE e LE+E observou-se redução na expressão de BAX e SOD2 no grupo tratado com estradiol.

Mais estudos poderão ser realizados com cultivo celular prolongado para confirmar o impacto de CC e LE no ciclo celular, bem como a adição de E em estudos clínicos para avaliar o impacto nas taxas de gravidez clínica em ciclos de indução de ovulação com o uso de indutores orais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKBARI, S.; AYAZI, R.M.; AYAZI, R.F. Comparing of letrozole versus clomiphene citrate combined with gonadotropins in intrauterine insemination cycles. **Iran J Reprod Med**, v. 10, n. 1, p. 29-32, 2012.

AKHTAR, M.; WRIGHT, J.N. Mechanistic studies on aromatase and related clomiphene citrate bond cleaving P-450 enzymes. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v??, 1993.

ALBERTS, B. *et al.* *Biologia molecular da célula*. 6. ed., Porto Alegre: Artmed, p. 999-1007, 2017.

ALMANSA-ORDONEZ, A. *et al.* Oxidative stress in reproduction: A mitochondrial perspective. **Biology**, v. 9, p. 269, 2020. Doi:10.3390/biology9090269.

ALMEIDA, C.P. *et al.* Apoptosis in human granulosa cells. **Cell Biol Int**, v. 10, n. 1002, p. cbin.11036, 2018.

AMBE, A.K. *et al.* Intrafollicular levels of sexual steroids and their relation with the antioxidant enzymes on the oocyte quality in an *in vitro* fertilization program. **Ginecol Obstet de México**, v. 73, pp. 19–27, 2005.

BARBIERI, R.L. Infertility. *In*: YEN, S.S.C.; JAFFE, R.B.; BARBIERI, R.L. (eds.). **Reproductive endocrinology-physiology, pathophysiology, and clinical management**. 4. ed., WB Saunders, Philadelphia, 1999, p. 563-593.

BEDAIWY, M.A.; MOUSA, N.A.; CASPER, R.F. Aromatase inhibitors prevent the estrogen rise associated with the flare effect of gonadotropins in patients treated with GnRH agonists. **Fertil Steril**, v. 91, Suppl. 4, p. 1574-7, Apr. 2009. Doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.09.077.

BOATRRIGHT, K.M.; SALVESEN, G.S. Mechanisms of caspase activation. **Curr Opin Cell Biol**, v. 15, p. 725–731, 2003.

CASARINI, L. *et al.* Estrogen modulates specific life and death signals induced by lh and hCG in human primary granulosa cells *in vitro*. **Int J Mol Sci**, v. 18, p. 926, 2017. Doi: 10.3390/ijms18050926.

CHAUBE, S.K. *et al.* Clomiphene citrate inhibits gonadotropin-induced ovulation by reducing cyclic adenosine 3',5'-cyclic monophosphate and prostaglandin E2 levels in rat ovary. **Fertil Steril**, v. 86, p. 1106–1111, 2006.

CHAUBE, S.K. *et al.* Hydrogen peroxide modulates meiotic cell cycle and induces morphological features characteristics of apoptosis in rat oocytes cultured *in vitro*. **Apoptosis**, v. 10, p. 863–874, 2005.

CIRCU, M. L., AW, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 48, p. 749–762, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.022>

CLARK, J.H.; MARKAVERICH, B.M. The agonist-antagonistic properties of clomiphene: A review. **Pharmacol Therap**, v. 15, p. 467-519, 1981. [http://dx.doi.org/10.1016/0163-7258\(81\)90055-3](http://dx.doi.org/10.1016/0163-7258(81)90055-3).

CUMMINS, J.M.; The role of maternal mitochondria during oogenesis, fertilization and embryogenesis. **Reprod Biomed Online**, v. 4, n. 2, p. 176-82, Mar-Apr 2002. doi: 10.1016/s1472-6483(10)61937-2. PMID: 12470582.

CUNNINGHAM, F.G.; WILLIAMS, J.W. Williams obstetrics. 23. ed., New York: McGraw-Hill Medical, 2010, xv, p. 1385.

DEPONTE, M. Glutathione catalysis and the reaction mechanism of glutathione-dependent enzymes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 3217–3266, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.018>

DONADIO, N.F. *et al.* Reprodução assistida na baixa complexidade: coito programado e inseminação intrauterina. Manual prático da Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Disponível em: www.sbrh.org.br. 2020. Acesso em: abril de 2021.

ESKEW, A.M. *et al.* Letrozole compared with clomiphene citrate for unexplained infertility. **Obstet Gynecol**, v. 133, n. 3, p. 437–43, 2019.

FAN, H.Y. *et al.* Apoptosis of mural granulosa cells is increased in women with diminished ovarian reserve. **J Assist Reprod Genet**, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10815-019-01446-5>.

FAN, H. Y. *et al.* Catenin (CTNNB1) promotes preovulatory follicular development but represses lh-mediated ovulation and luteinization. **Mol Endocrinol**, v. 24, n. 8, p. 1529–1542, 2010. ISSN Print 0888-8809 ISSN Online 1944-9917.

FRANKS, S. *et al.* Ovulatory disorders in women with polycystic ovary syndrome. **Clin Obstet Gynaecol**, v. 12, n. 3, p. 605-632, Sep. 1985.

FRITZ, M.A.; SPEROFF, L. Clinical gynecologic endocrinology and infertility. 8. ed., Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2011.

GARCIA-VELASCO, J.A. *et al.* The aromatase inhibitor letrozole increases the concentration of intraovarian androgens and improves *in vitro* fertilization outcome in low responder patients: a pilot study. **Fertil Steril**, v. 84, n. 1, July, 2005.

GOUVEIA, S.S., LIMA, A.A. Relação entre espécies reativas de oxigênio e a promoção carcinogênica. **J. Surg. Clin. Res.**, v 20,n.3,p.174-179, Set – Nov 2017.

GRIVICICH, I. *et al.* Morte celular por apoptose. **Rev Bras Cancerol**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

HANSEN, J. N. *et al.* Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signalling. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 46, p. 215–234, 2006.

HOFE, J.V.; BATES, G.W. Ovulation Induction. **Obstet Gynecol Clin N Am**, v. 42, p. 27–37, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ogc.2014.09.007>.

HOMBURG, R. Clomiphene citrate: End of an era?: A mini review. **Hum Reprod**, v. 20, p. 2043-2051, 2005. <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/dei042>.

HUGHES JR., F.M.; GOROSPE, W.C. Biochemical identification of apoptosis (Programmed *Cell* Death) in granulosa *cells*: Evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia endocrinology. **The Endocrine Society**, v.129, n.5, 1991.

HUGHES, E; COLLINS, J.; VANDEKERCKHOVE, P. Clomiphene citrate for ovulation induction in women with oligo-amenorrhoea. **Cochrane Database Syst Rev**, 2000 p. CD000056.

ITOH, T. *et al.* Letrozole, anastrozole, and tamoxifen-responsive genes in MCF-7 *cells*: A microarray approach. **Mol Cancer Res**, v. 3, n. 4, Apr. 2005.

KAR, S. Clomiphene citrate or letrozole as first-line ovulation induction drug in infertile PCOS women: A prospective randomized trial. **J Hum Reprod Sci**, v. 5, n. 3, p. 262-265, 2012. Doi 10.4103/0974-1208.106338.

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

LI, W. *et al.* Clomiphene citrate induces nuclear translocation of the TFEB transcription factor and triggers apoptosis by enhancing lysosomal membrane permeabilization. **Biochem Pharmacol**, v. 162, p. 191–201, 2019.

LI, T.C.; WARREN, M.A.; MURPHY, C. A prospective, randomized, cross-over study comparing the effects of clomiphene citrate and cytophenil on endometrial morphology in the luteal phase of normal fertile women. **Fertil Steril**, v. 71, p. 639-644, 1999.

LIU, Z. *et al.* FSH and FOXO1 regulate genes in the sterol/steroid and lipid biosynthetic pathways in granulosa *cells*. **Mol Endocrinol**, v. 23, p. 649–661, 2009.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). **Method**, v. 25, n. 4, p. 402-8, 2001. Doi: 10.1006/meth.2001.1262.

LU, C. *et al.* Crosstalk of microRNAs and oxidative stress in the pathogenesis of cancer. **Hindawi Oxid Med Cell Long**, 2020. 13p. <https://doi.org/10.1155/2020/2415324>.

LU, J. *et al.* A novel and compact review on the role of oxidative stress in female reproduction. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 16, p. 80, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0391-5>.

LUCHS, A.; PANTALEÃO, C. Apoptosis and in vivo models to study the molecules related to this phenomenon. **Einstein**, v. 8, n. 4 Pt 1, p. 495-7, 2010.

MANCINI, A. *et al.* Estrogens as antioxidant modulators in human fertility. - Hindawi Publishing Corporation. **Int J Endocrinol**, art. ID 607939, p. 6, 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/607939>.

MATSUDA, F. *et al.* Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: Regulation by survival and death of granulosa cells. **J Reprod Dev**, v. 58, p. 44–50, 2012.

MIKKELSON, T.J. *et al.* Single-dose pharmacokinetics of clomiphene citrate in normal volunteers. **Fertil Steril**, v. 46, p. 392-39, 1986.

MITWALLY, M.F.; CASPER, R.F. Use of an aromatase inhibitor for induction of ovulation in patients with an inadequate response to clomiphene citrate. **Fertil Steril**, v. 75, p. 305–09, 2001.

MOSMAN, T.J. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxic assays. **J Immunol Methods**, v. 65, p. 55, 1983.

NAKAHARA, K. *et al.* The incidence of apoptotic bodies in membrana granulosa can predict prognosis of ova from patients participating in *in vitro* fertilization programs. **Fertil Steril**, v. 68, p. 312–7, 1997.

NICOLETTI, I.; MIGLIORATI, G.; PAGLIACCI, M. C.; GRIGNANI, F.; RICCARDI, C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **J Immunol Methods**, v. 139, n. 2, p. 271-279, 1991 Jun. doi: 10.1016/0022-1759(91)90198-o.

PEREA-SASIAÍN, J. Cien años del colorante de Giemsa [Giemsa stain's 100th year]. **Biomedica**, v. 23, n. 1, p. 5-18, 2003.

PERKINS, A.T. *et al.* Increased levels of superoxide dismutase suppress meiotic segregation errors in aging oocytes. **Chromosoma**, v. 128, p. 215–222, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00412-019-00702-y>.

PETERSEN, K.B. *et al.* Mono-ovulation in women with polycystic ovary syndrome: a clinical review on ovulation induction. **Elsevier on behalf of Reproductive Healthcare**, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2016.03.0061472-6483>.

PIZZINO, G. *et al.* Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. **Oxid Med Cell Longev**, 2017. <http://dx.doi.org/10.1155/2017/8416763>.

PRACTICE COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY OF REPRODUCTIVE MEDICINE. Use of clomiphene citrate in infertile women: A committee opinion. **Fertil Steril**, v. 100, p. 341-348, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.05.033>.

PROPST, A.M.; BATES JR., G.W. Evaluation and treatment of anovulatory and unexplained infertility. **Obstet Gynecol Clin N Am**, v. 39, p. 507–519, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ogc.2012.09.008>.

PUCCI, B., KASTEN, M.; GIORDANO, A. *Cell cycle and apoptosis*. **Neopalsia**, v. 2, n. 4, p. 291-299, July- Aug., 2000.

RANDALL, J.M.; TEMPLETON, A. Cervical mucus score and *in vitro* sperm mucus interaction in spontaneous and clomiphene citrate cycles. **Fertil Steril**, v. 56, p. 465-468, 1991.

REBAR, R.; VANDENBERG, G.; NAFTOLIN, F. Characterization of the inappropriate gonadotropin secretion in polycystic ovary syndrome. **J Clin Invest**, v. 57, n. 5, p. 1320-1329, 1976. <https://doi.org/10.1172/JCI108400>.

RIZZO, A. *et al.* Reactive oxygen species (ROS): involvement in bovine follicular cysts etiopathogenesis. *Immunopharmacol*. **Immunotoxicol**, v.31, p.631–635, 2009.

ROSE, B.I.; BROWN, S.E. A review of the physiology behind letrozole applications in infertility: are current protocols optimal? **J Assist Reprod Gens**, v. 37, p.2093–2104, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10815-020-01892-6>.

SAKAR, M.N.; OGLAK, S.C. Letrozole is superior to clomiphene citrate in ovulation induction in patients with polycystic ovary syndrome. **Pak J Med Sci**, v. 36, n. 7, p. 1460-1465, 2020. Doi: <https://doi.org/10.12669/pjms.36.7.3345>.

SASAKI, H. *et al.* Impact of oxidative stress on age-associated decline in oocyte developmental competence frontiers in endocrinology. **Front Org**, v. 10, art. 811, Nov. 2019.

SAYEDOSHOHADAEL, F. *et al.* Comparison of the effect of clomiphene- estradiol valerate vs letrozole on endometrial thickness, abortion and pregnancy rate in infertile women with polycystic ovarian syndrome. **J Clin Diagn Res**, v. 10, n. 8, p. QC10-QC13, Aug. 2016. Doi: 10.7860/JCDR/2016/20954.8324.

SEN, A. *et al.* Androgens regulate ovarian follicular development by increasing follicle stimulating hormone receptor and microRNA-125b expression. **PNAS**, v. 111, n. 8, p. 3008–13, 2014.

SHEN, M. *et al.* Involvement of FoxO1 in the effects of folliclestimulating hormone on inhibition of apoptosis in mouse granulosa *cells*. **Cell Death and Dis**, v. 5, p. 5, e1475, 2014. Doi:10.1038/cddis.2014.400.

SHEN, M. *et al.* Protective mechanism of FSH against oxidative damage in mouse ovarian granulosa *cells* by repressing autophagy. **Autophagy**, v. 13, n. 8, p. 1364–1385, 2017. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1327941>.

SENA, A. *et al.* Androgens regulate ovarian follicular development by increasing follicle stimulating hormone receptor and microRNA-125b expression. **PNAS**, v. 111, n. 8, p. 3008–3013, Feb. 2014. Disponível em: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1318978111. Acesso em> abril de 2021.

SU, H.W. *et al.* Detection of ovulation, a review of currently available methods. **Bioeng Transl Med**. v. 2, n. 3, p. 238-246, 2017. doi:10.1002/btm2.10058

THESSALONIKI, ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS, Consensus Workshop Group. Consensus on infertility treatment related to polycystic ovary syndrome. **Fertil Steril**, v. 89, p. 505–22, 2008.

THIANTANAWAT, A.; LONG, B.J.; BRODIE, A.M. Signaling pathways of apoptosis activated by aromatase inhibitors and antiestrogens. **Cancer Res**, v. 63, p. 8037–8050, Nov. 2003.

TRIPATHI, A. *et al.* Melatonin protects against clomiphene citrate-induced generation of hydrogen peroxide and morphological apoptotic changes in rat eggs. **Eur J Pharmacol**, v. 667, p. 419–424, 2011.

VINA, J. *et al.* Role of reactive oxygen species and (phyto)estrogens in the modulation of adaptive response to stress. **Free Rad Res**, v. 40, n. 2, p. 111–119, Feb. 2006.

VINDELOV, L.L.; CHRISTENSEN, I.J.; NISSEN, N.I. A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. **Cytometry**, v. 3, n. 5, p. 323-7, Mar. 1983. Doi: 10.1002/cyto.990030503.

WANG, L. *et al.* Letrozole versus clomiphene citrate and natural cycle: Endometrial receptivity during implantation window in women with polycystic ovary syndrome. **Front Endocrinol Org**, v. 11, 2021. Doi: 10.3389/fendo.2020.532692.

WANG, S. *et al.* The role of antioxidant enzymes in the ovaries. **Oxidat Med Cell Long**, art. ID 4371714, 2017. 14 p. <https://doi.org/10.1155/2017/4371714>.

WANG, Y.Y.; ZHENG, X.X. A flow cytometry-based assay for quantitative analysis of cellular proliferation and cytotoxicity *in vitro*. **J Immunol Meth**, v.268, n.2, p.179-188, 2002.

WINNER, E.P. *et al.* American Society of Clinical Oncology technology assessment on the use of aromatase inhibitors as adjuvant therapy for women with hormone receptor positive breast cancer. **J Clin Oncol**, v. 20, p. 3317–27, 2002.

WU, J.; ZHANG, L.; WANG, X. Maturation and apoptosis of human oocytes *in vitro* are age-related. **Fertil Steril**, v. 74, p. 1137–41, 2000.

XIA, X. *et al.* Effect of letrozole on endometriosis and apoptosis of ectopic endometrial cells in rats. **J Cent South Univ (Med Sci)**, v. 38, n. 1, 2013. Doi: 10.3969/j.issn.1672-7347.2013.01.010.

YANG, L. *et al.* The role of oxidative stress and natural antioxidants in ovarian aging frontiers in pharmacology. **Front Org**, v. 11, art. 617843, Jan. 2021.

ZHENG, W. *et al.* Inhibin Immunohistochemical Staining: A Practical Approach for the Surgical Pathologist in the Diagnoses of Ovarian Sex Cord-Stromal Tumors. **Adv Anat Pathol**. v. 10, n. 1, p.27-38, 2003. doi: 10.1097/00125480-200301000-00003.

APÊNDICES

Apêndice A - Modelo de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Prezada Senhora,

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

I. INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

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

II. SIGILO DOS DADOS

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

III. BENÉFICIOS DA PESQUISA

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

IV. RISCOS

Os riscos a que as pacientes estão submetidas são aqueles referentes ao tratamento ao qual se submetem para tratamento da infertilidade, na clínica *Fertibaby*. Estes compreendem principalmente a síndrome de hiperestímulo ovariano, que acontece em 1 a 2% dos ciclos e leva ao acúmulo de líquido no abdome (ascite), distensão abdominal e desconforto respiratório. Na grande maioria dos casos, é um transtorno leve e transitório. Há ainda um pequeno risco de formação de hematomas subcutâneos durante a aplicação das gonadotrofinas, assim como infecção, que também pode acontecer durante a punção folicular (eventos muito raros). Esses problemas estão especificados no termo de consentimento livre e esclarecido da clínica, que é assinado por cada paciente, antes do início do tratamento, e são, na verdade, inerentes ao protocolo de tratamento, e não aos procedimentos do estudo celular, objeto deste projeto. O protocolo do estudo científico aqui proposto não acrescenta qualquer risco adicional às pacientes, uma vez que não exerce alguma influência ou modificação no tratamento. Utilizaremos células que recobrem o óvulo e que seriam desprezadas pelo laboratório.

V.RESSARCIMENTO DAS DESPESAS

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

VI.DEMAIS ESCLARECIMENTOS

Você dispõe de total liberdade para esclarecer qualquer dúvida que possa surgir durante a pesquisa. Você poderá recusar-se a participar deste estudo e/ou abandoná-lo a qualquer momento, sem precisar se justificar. A aceitação ou não da participação neste estudo não influenciará no seu tratamento. Não será realizado qualquer tipo de manipulação, experimento ou intervenção direta com o paciente.

Dúvidas éticas podem ser resolvidas com o COEP e as demais com as pesquisadoras, conforme os contatos abaixo.

Assinatura da voluntária:

Assinatura da(s) pesquisadora(s):

TERMO DE CONSENTIMENTO

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

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

Assinatura da voluntária

Assinatura da(s) pesquisadora(s):

Dados para contato:

Dr^a. Camila Oliveira da Silveira Caires Lopes: tel (31) 3335-9274 (Clínica *Fertibaby*);
camila_silveira@yahoo.com.br

Prof^a. Marcia Cristina França Ferreira: (31) 3409-9764 (departamento de GOB);
franca.marcia@gmail.com

Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG: (31) 3499-4592

Av. Antônio Carlos, 6.627, Pampulha - Belo Horizonte - MG - CEP 31270-901

Unidade Administrativa II - 2º andar - sala: 2005

coep@prpq.ufmg.br

Apêndice B - Modelo de termo de consentimento livre e esclarecido para a realização de ICSI da Clínica *Fertibaby*

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA REALIZAÇÃO DE FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* (FIV) E/OU FIV COM MICROMANIPULAÇÃO DE GAMETAS (FIVICSI)

DEFINIÇÕES:

Fertilização *in vitro* (FIV): técnica laboratorial que promove o contato entre óvulos e espermatozoides, com o objetivo de fertilizar os óvulos e produzir embriões.

Fertilização *in vitro* com micromanipulação de gametas (FIV-ICSI): técnica laboratorial que promove a união entre óvulo e espermatozoide a partir da inserção de um único espermatozoide diretamente dentro do óvulo, utilizando um micromanipulador de gametas.

Embrião: produto da união entre óvulo e espermatozoide.

Gravidez ectópica: gravidez desenvolvida fora da cavidade uterina.

O CASAL AUTORIZA A CLÍNICA A REALIZAR OS SEGUITES PROCEDIMENTOS:

- I- Prescrição de medicamentos para estimulação dos ovários e amadurecimento dos óvulos, com o objetivo de obter quantidade adequada de óvulos para a realização do procedimento.
- II- Monitorização da estimulação dos ovários a partir de exames de ultrassonografia.
- III- Preparo dos espermatozoides coletados pelo marido/companheiro para utilização neste tratamento.
- IV- Coleta dos óvulos por meio de punção transvaginal guiada por ultrassom, realizada sob anestesia geral ou local.
- V- Fertilização dos óvulos utilizando espermatozoides do marido/companheiro por meio de FIV ou FIV-ICSI.
- VI- Cultivo dos embriões resultantes até o momento adequado para a transferência.
- VII- Transferência do(s) embrião(ões) selecionado(s).
- VIII- Armazenamento de dados científicos gerados durante esse ciclo, que eventualmente serão utilizados de forma anônima em levantamentos estatísticos de uso interno da Clínica *Fertibaby* ou em publicações científicas nacionais e/ou internacionais.
- IX- Descarte das amostras não utilizadas durante o tratamento (espermatozoides excedentes, óvulos imaturos ou de má qualidade e embriões considerados inviáveis).

OBS.: o casal fica ciente de que todos os embriões não transferidos deverão ser congelados, de acordo com os termos expostos no TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO E CONTRATO PARA REALIZAÇÃO DE CONGELAMENTO DE EMBRIÕES, exceto embriões inviáveis.

CHANCE DE GRAVIDEZ:

- Varia de 5 a 65%, dependendo da causa da infertilidade conjugal e, principalmente, da idade da mulher.
- A chance de uma gravidez obtida por FIV evoluir para abortamento é igual à de uma gravidez concebida naturalmente e depende principalmente da idade da mulher.

- Existe risco de aproximadamente 1% de a gravidez ser ectópica (gerada fora da cavidade uterina).
- Caso haja transferência de mais de um embrião, a gravidez poderá ser gemelar em cerca de 20 a 30% dos casos.

RISCO DE MALFORMAÇÕES:

A chance de nascer uma criança com alguma malformação após esse procedimento é equivalente à de uma criança concebida naturalmente. Em casos de alterações graves no espermograma, existe chance próxima de 20% de a criança do sexo masculino herdar o problema do pai.

RISCOS DO PROCEDIMENTO:

Raramente, existe chance de:

- I- Os medicamentos para estimulação dos ovários não produzirem o efeito desejado e o tratamento ser cancelado.
- II- Não haver óvulos após o procedimento de punção ovariana transvaginal.
- III- Não haver espermatozoides após a punção/biópsia testicular (em caso de necessidade do marido/parceiro).
- IV- Não haver embrião para transferência.
- V- A paciente desenvolver a síndrome de hiperestimulação ovariana (SHO), caracterizada por resposta exagerada do ovário à estimulação e distensão abdominal por retenção de líquido. Caso, durante a monitorização da estimulação dos ovários por meio dos exames de ultrassonografia, for detectado algum risco de desenvolvimento da SHO, todos os embriões deverão ser congelados. Nesses casos, não ocorrerá a transferência de embriões a fresco, e o risco de desenvolvimento da SHO será mínimo.

Essa conduta tem como objetivo evitar as complicações decorrentes da SHO, tais como desidratação, insuficiência renal e trombose. Caso haja necessidade de internação, a equipe da *Fertibaby* fornecerá assistência médica especializada, sem ônus, cabendo à paciente arcar apenas com os custos referentes à parte hospitalar.

OBS: a adequada monitorização da estimulação dos ovários a partir de exames de ultrassonografia é de fundamental importância para prevenção da SHO.

Belo Horizonte, ____/____/____

Consentimento da paciente:

Eu, _____,
consinto na realização do tratamento acima proposto.

Assinatura:

Consentimento do marido/companheiro:

Eu, _____,
consinto na realização do tratamento acima proposto e entendo que serei o pai legal
da criança concebida.

Assinatura:

Médico Responsável:

TESTEMUNHA

TESTEMUNHA

Informação: este termo é uma exigência do Ministério da Saúde com base na
Regulamentação Federal RDC nº 23 da ANVISA, de 27 de maio de 2011.

ANEXO

Anexo A – Parecer do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia

Faculdade de Medicina da UFMG
 Universidade Federal de Minas Gerais
 Departamento de Ginecologia e Obstetrícia - GOB

Parecer GOB 033/2016

Parecer

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

NOME DO PESQUISADOR: Profª Márcia Cristina França Ferreira.

1) DELINEAMENTO DO ESTUDO

Trata-se de estudo experimental controlado *in vitro*, utilizando células da granulosa humanas em cultura primária, com o objetivo de esclarecer os mecanismos da morte celular programada (apoptose) induzida por citrato de clomifeno (modulador seletivo do receptor estrogênico) ou letrozole (inibidor da síntese de estrogênio), bem como compreender o efeito protetor do estradiol nesse processo.

2) ANÁLISE DO PROJETO:

2.1) Relevância do tema: infertilidade é um problema de saúde pública prevalente em todo o mundo, com custo elevado para o sistema de saúde e a sociedade. Métodos de baixa complexidade para o tratamento da infertilidade, como os indutores de ovulação administrados por via oral, precisam ser aperfeiçoados e, para isso, é fundamental compreender melhor os mecanismos de seus efeitos terapêuticos bem como de seus efeitos colaterais deletérios.

2.2) Avaliação crítica dos objetivos: os objetivos são claros e compatíveis com o delineamento experimental.

2.3) Metodologia: a metodologia proposta é adequada, pois permitirá a avaliação controlada dos efeitos do clomifeno e do letrozole sobre a apoptose de células da granulosa humanas, mapeando as vias moleculares envolvidas e correlacionando o fenômeno com o efeito antiestrogênico desses fármacos.

Av. Professor Alfredo Balena, 190 - sala 213 - Santa Efigênia
 CEP 30130100 - Belo Horizonte MG - Brasil
 ☎ +55 (31) 3409-9764
 www.medicina.ufmg.br

Faculdade de Medicina da UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia - GOB



3) QUALIFICAÇÃO DO SOLICITANTE E EQUIPE DE TRABALHO: A pesquisadora principal possui título de doutorado, experiência profissional e publicações científicas em reprodução humana e biologia molecular.

4) ORÇAMENTO, CRONOGRAMA e VIABILIDADE: O cronograma é adequado e o orçamento é compatível com os experimentos propostos. A infraestrutura existente no Laboratório de Apoptose do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG é apropriada ao desenvolvimento do projeto.

5) DESDOBRAMENTOS: O projeto poderá fornecer informações importantes para o desenvolvimento de novos fármacos e esquemas terapêuticos para estimulação ovariana controlada.

6) PRINCIPAIS ASPECTOS POSITIVOS (pontos fortes): Delineamento experimental robusto, hipótese bem construída, tema relevante.

7) PRINCIPAIS ASPECTOS NEGATIVOS (pontos fracos): Não foram identificados aspectos negativos relevantes no projeto apresentado.

8) COMENTÁRIOS FINAIS E PARECER: Considerando o exposto acima, s.m.j. sou pela aprovação do projeto de pesquisa.

AVALIAÇÃO FINAL DA PROPOSTA

- APROVADO SEM RESTRIÇÕES
 DILIGÊNCIA
 NÃO APROVADO

PARECER APROVADO PELA CÂMARA DEPARTAMENTAL EM 02/12/2016

Marcia
 Profa. Márcia Mendonça Carneiro
 Chefe Departamento de Ginecologia e Obstetrícia
 Presidente da Câmara Departamental

Juliana
 Profa. Juliana Silva Barra
 Subchefe do Departamento
 de Ginecologia e Obstetrícia
 Faculdade de Medicina UFMG

Av. Professor Alfredo Balena, 190 - sala 213 - Santa Efigênia
 CEP 30130100 - Belo Horizonte MG - Brasil

+55 (31) 3409-9764
 www.medicina.ufmg.br