

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Betina Iser

**Avaliação dos efeitos do sulfato de dehidroepiandrosterona (SDHEA) em células do
cumulus oophorus no estágio *early antral***

Porto Alegre

2017

Betina Iser

**Avaliação dos efeitos do sulfato de dehidroepiandrosterona (SDHEA) em células do
cumulus oophorus no estágio *early antral***

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Área de habilitação: Biologia Molecular

Orientador: Prof^a Dr^a Ilma Simoni Brum da Silva
Co-orientador: M.Sc. Júlia Schneider

Porto Alegre

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

CIP - Catalogação na Publicação

Iser, Betina

Avaliação dos efeitos do sulfato de dehidroepiandrosterona (SDHEA) em células do cumulus oophorus no estágio early antral / Betina Iser. -- 2017.

77 f.

Orientadora: Ilma Simoni Brum. Coorientadora: Júlia Schneider.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Reprodução Assistida. 2. Sulfato de Dehidroepiandrosterona. 3. Cumulus oophorus. I. Brum, Ilma Simoni, orient. II. Schneider, Júlia, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Betina Iser

**Avaliação dos efeitos do sulfato de dehidroepiandrosterona (SDHEA) em células do
cumulus oophorus no estágio *early antral***

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Aprovado em: ____ de _____ de ____.

BANCA EXAMINADORA

Gustavo Dias Ferreira - UFPel

Gisele Branchini - UFCSPA

Ilma Simoni Brum - UFRGS

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à minha querida orientadora Prof^a Dr^a Ilma Simoni Brum pela oportunidade de desenvolver este trabalho em seu laboratório, pela confiança em mim depositada e pelo acolhimento que, com certeza, fez toda a diferença.

Agradeço imensamente à minha co-orientadora MSc. Júlia Schneider que não mediu esforços para a execução deste trabalho, por estar ao meu lado me ajudando sempre, por ter me tranquilizado tantas vezes, e, enfim, pela paciência e pelo carinho.

Um agradecimento especial ao Dr. Diego Alcoba por compartilhar seu vasto conhecimento na área comigo, pela grande ajuda e pelos ensinamentos de vida e da área acadêmica.

Agradeço à MSc. Letícia Arruda e ao Dr. Milvo, além de toda a equipe da clínica de reprodução assistida ProSer pelo acolhimento e pelo auxílio na execução deste trabalho.

Agradeço também à Lolita, à Elvira e à Gabriela, que me auxiliaram a conduzir este projeto e estiveram sempre prontas a me ajudar. Agradeço à Paula e à Vitória, que, além de colegas, se tornaram grandes amigas e foram essenciais nesta etapa da minha vida. Um agradecimento especial aos meus colegas de laboratório Bruna, Zhao, Rafael, Andressa, Charles, Vânia, Ana Caroline, Matheus e Letícia, que me auxiliaram no decorrer da execução deste trabalho e pelo apoio pessoal.

Agradeço aos meus amigos-irmãos João Pedro e Vinícius pela amizade verdadeira de anos e pelo apoio de sempre. Agradeço aos meus amigos da biomedicina Luiza, Luana, Tailene, Matheus e Micaela, que me acompanharam desde o início dessa jornada biomédica. Vocês foram essenciais no decorrer de minha vida acadêmica. Um agradecimento mais que especial à Micaela, pela amizade sincera, pelas muitas conversas e conselhos, e pelo carinho que sempre me fortaleceu.

Agradeço a todos os meus familiares e amigos que, de uma forma ou outra, estiveram presentes e contribuíram para o meu crescimento durante esta etapa. Agradeço imensamente aos meus pais pelo apoio emocional, pelo amor e carinho que me possibilitaram concluir mais uma etapa de minha vida e por lutarem junto comigo pelos meus sonhos. Nunca haverá palavras que possam descrever o amor e gratidão que sinto por vocês.

E por último, mas não menos importante, quero agradecer ao meu namorado Ciro, meu fiel companheiro, que esteve sempre ao meu lado durante esta etapa, que me confortou nos momentos difíceis e vibrou comigo nos momentos de alegria. Obrigada pela paciência e pelo amor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desenvolvimento folicular.....	13
Figura 2 – Comunicação entre as células do <i>cumulus oophorus</i> e o oócito.....	17
Figura 3 – Biossíntese de hormônios esteroides sexuais femininos.....	20
Figura 4 – Modelo duas células – dois hormônios.....	21
Figura 5 – Efeito sinérgico de <i>feedback</i> entre androgênios e FSH.....	26

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	4
LISTA DE FIGURAS	6
ÍNDICE GERAL	7
RESUMO	8
1 INTRODUÇÃO COMPREENSIVA.....	9
1.1 REPRODUÇÃO ASSISTIDA	9
1.1.1 INFERTILIDADE.....	9
1.1.2 TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA.....	10
1.2 FOLÍCULO OVARIANO	12
1.2.1 <i>Cumulus oophorus</i>	16
1.3 HORMÔNIOS ESTERÓIDES SEXUAIS	18
1.3.1 ANDROGÊNIOS.....	23
1.3.1.1 DEHIDROEPIANDROSTERONA (DHEA) E SEU SULFATO (SDHEA).....	27
1.4 PROTOCOLO DE DESLUTEINIZAÇÃO.....	29
1.5 GENES ALVO UTILIZADOS NESTE EXPERIMENTO	29
1.6 JUSTIFICATIVA	32
1.7 OBJETIVOS.....	33
1.7.1 <i>Objetivo geral</i>	33
1.7.2 <i>Objetivos específicos</i>	33
2 ARTIGO CIENTÍFICO:	34
2.1 INTRODUÇÃO	37
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
2.3 RESULTADOS.....	43
2.4 DISCUSSÃO.....	45
REFERÊNCIAS	58
3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	61
BIBLIOGRAFIA ADICIONAL.....	62
ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA <i>REPRODUCTIVE BIOLOGY</i>	65
ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	76

RESUMO

Devido ao panorama de infertilidade mundial, que afeta cerca de 15% dos casais, as técnicas de reprodução assistida (TRAs) vêm assumindo um importante papel no âmbito da saúde pública. Contudo, alguns casais, mesmo após a realização de TRAs, não obtêm sucesso no tratamento de infertilidade, o que pode ocorrer aos casais em que a mulher apresenta reserva ovariana diminuída (ROD). Estudos com este tema vêm sendo realizados e a suplementação oral com dehidroepiandrosterona (DHEA) em pacientes com ROD tem demonstrado elevação das taxas de gravidez e aumento do número de oócitos recrutados. A DHEA já é amplamente utilizada (aproximadamente 1/3 das clínicas de reprodução assistida no mundo utilizam), apesar de não se ter conhecimento, até o presente momento, de seu exato mecanismo de ação para o favorecimento do sucesso no tratamento de infertilidade em determinadas pacientes. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da exposição do SDHEA em células do *cumulus* em estágio semelhante ao *early antral* do desenvolvimento folicular. A avaliação da exposição celular ao SDHEA se deu através de dosagens hormonais de estradiol (E₂), de progesterona (P) e de SDHEA, bem como através da expressão de alguns genes que estão relacionados à qualidade folicular: receptor de FSH (hormônio folículo estimulante) (*rFSH*), receptor β de estrogênio (*ER β*), molécula de adesão celular vascular 1 (*VCAM-1*) e receptor de androgênio (*AR*). Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que a exposição ao SDHEA promoveu aumento da secreção de E₂ (em pg/mL), observado nos dias 6 e 8 do grupo tratado (dia 6: 473,76 \pm 76,43; dia 8: 655,42 \pm 85,37) em comparação ao grupo controle (dia 6: 71,38 \pm 7,89; dia 8: 141,67 \pm 32,48). A secreção de P (ng/mL) não se alterou com a suplementação de SDHEA (grupo controle: dia 6 - 671,45 \pm 149,04 e dia 8 - 991,35 \pm 226,92; grupo tratado: dia 6 - 594,05 \pm 113,70 e dia 8: 920,3 \pm 212,70). A expressão dos genes *rFSH*, *AR* e *ER β* não foi alterada com a exposição celular ao SDHEA; porém, a expressão de *VCAM-1* se mostrou reduzida no grupo tratado em comparação ao grupo controle. A partir deste estudo, conclui-se que o tratamento com SDHEA em células do *cumulus* de estágio *early antral* foi capaz de aumentar a secreção celular de estradiol e, portanto, supõe-se que um dos mecanismos pelo qual a DHEA administrada oralmente às pacientes exerça seu papel seja pelo aumento deste hormônio. No entanto, outros estudos devem ser feitos a fim de investigar melhor o papel da DHEA no sistema reprodutor feminino.

1 INTRODUÇÃO COMPREENSIVA

1.1 REPRODUÇÃO ASSISTIDA

1.1.1 INFERTILIDADE

Atualmente a infertilidade é considerada um problema de saúde mundial, sendo reconhecida como tal pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Definem-se como inférteis os casais que, em idade reprodutiva, não alcançam a gravidez após 12 meses ou mais de relação sexual regular desprotegida (DATTA *et al.*, 2016; NARDELLI *et al.*, 2014). Dados mostram que a infertilidade afeta cerca de 15% dos casais em idade reprodutiva no mundo todo, gerando implicações sociais e financeiras, que vêm aumentando cada vez mais os esforços médicos para a prevenção destas alterações e para a busca por tratamentos adequados para a população (UYAR; TORREALDAY; SELI, 2013). Cerca de 35 a 40% dos casais inférteis apresentam como causa da alteração reprodutiva, fatores femininos, 20 a 40% apresentam como causa fatores masculinos e 20 a 30% apresentam como causa da infertilidade ambos os fatores, havendo ainda uma pequena percentagem de alterações reprodutivas de causa desconhecida. Os fatores femininos que predisõem à ocorrência de infertilidade incluem disfunções ovarianas, como a síndrome do ovário policístico (SOP) e a falência ovariana precoce (FOP); as obstruções tubárias e/ou endometriose. As disfunções masculinas, que, por sua vez, possuem maior influência nas taxas de fertilização, são anormalidades na produção de espermatozoides e/ou bloqueio na passagem do esperma (FOUANY; SHARARA, 2013; NARDELLI *et al.*, 2014).

Em um estudo realizado por MASCARENHAS *et al.*, com o objetivo de determinar a prevalência da infertilidade no mundo, demonstrou-se que, embora a estimativa global de casais inférteis seja de 15%, alguns países possuem taxas mais elevadas. Por exemplo, regiões como o sul e o centro da Ásia, a África Subsaariana, o norte africano, o Oriente Médio e a porção central e leste da Europa apresentam taxas de infertilidade de aproximadamente 30% (MASCARENHAS *et al.*, 2012). A elevada percentagem de infertilidade observada nestas regiões pode ser parcialmente explicada por fatores como a alta prevalência de infecções do trato reprodutivo, causadas em sua maioria por *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* e HIV (vírus da imunodeficiência humana). Estas enfermidades quando não tratadas de forma adequada contribuem para uma redução significativa da fertilidade nestas populações. Além

disto, técnicas ilegais de aborto ou práticas obstétricas inadequadas têm grande influência no aumento das taxas de infertilidade nestes locais do mundo (MASCARENHAS *et al.*, 2012). Por outro lado, países desenvolvidos, que apresentam taxas inferiores de infertilidade, exibem um padrão distinto de fatores que predispõem à ocorrência desta anormalidade se comparado ao observado em países subdesenvolvidos. Grande parte destes fatores estão atrelados a implicações do mundo moderno, como é o caso da obesidade, que aumenta os riscos de ocorrência de anovulação e de SOP, alterações reprodutivas que podem dificultar as mulheres no desejo de obter sua gestação (INHORN; PATRIZIO, 2014; MASCARENHAS *et al.*, 2012). O adiamento da maternidade, em decorrência da vida moderna, a qual relaciona-se com uma busca por estabilidade financeira e profissional, retarda o início da formação de uma família. A idade materna avançada, portanto, contribui com o aumento das taxas de infertilidade, pois mulheres com idade de 35 anos ou mais apresentam, muitas vezes, envelhecimento ovariano, o que dificulta ainda mais o alcance da gravidez. Estes fatores contribuem, conseqüentemente, para uma busca crescente por técnicas de reprodução assistida como forma de tratamento da infertilidade. Assim, além de haver um aumento da utilização destes serviços na prática clínica, há um esforço muito grande em aprimorar estas técnicas, com o objetivo de aumentar a taxa de nascidos vivos com a sua utilização (DATTA *et al.*, 2016; DZIK; FERNANDES DONADIO; CAVAGNA, 2012).

1.1.2 TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA

O advento da reprodução assistida foi um marco na ciência mundial. A possibilidade de realização da fertilização *in vitro* (FIV) criou novas expectativas aos casais inférteis. O tema já era amplamente estudado no século passado e, especialmente a partir do nascimento do primeiro bebê de proveta, Louise Brown, em 1978, muitos outros experimentos foram realizados. Antes disto, técnicas de fertilização manipuladas *in vitro* eram, geralmente, realizadas em coelhos, como foi o caso do experimento realizado por Min Chueh Chang, no qual este pesquisador obteve nascidos vivos através da manipulação *in vitro* de oócitos e espermatozoides obtidos de coelhos de pelagem escura e que foram implantados em coelhas de pelagem branca (CHANG, 1959). Outros estudos também foram realizados desde então, como por exemplo, a investigação

para a descoberta de fármacos para indução ovariana, o congelamento de embriões, a técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), dentre outros (KAMEL, 2013).

As tecnologias de reprodução assistida são todas as formas de tratamentos para infertilidade em que ocorra manipulação de oócitos, espermatozoides ou ambos (QUAAS; HANSEN, 2016). Estas técnicas constituem uma linha de tratamento para indivíduos que possuam alguma anormalidade reprodutiva que os impossibilitem de conceber descendentes de forma natural. Elas podem ser classificadas conforme seu grau de complexidade, o qual irá depender, principalmente, de seu aprimoramento tecnológico. Dentre as técnicas mais utilizadas e que apresentam maior taxa de nascidos vivos, estão as técnicas de alta complexidade conhecidas como FIV e a ICSI. Estas técnicas simulam em laboratório as condições necessárias para que ocorra a fecundação e as primeiras etapas do desenvolvimento embrionário (DZIK; FERNANDES DONADIO; CAVAGNA, 2012). As técnicas de baixa complexidade também são amplamente utilizadas, justamente devido ao seu baixo custo e ao fato de serem menos invasivas em relação à FIV e à ICSI. A inseminação artificial, por exemplo, se caracteriza por aumentar a densidade do gameta masculino no local em que ocorre a fertilização, sendo assim o sêmen pode ser injetado próximo ao cérvix, que caracteriza a inseminação intracervical (ICI) ou no interior da cavidade uterina, que define a inseminação intrauterina (IIU). Em ambas as técnicas o esperma é purificado, ficando livre de proteínas e prostaglandinas que possam interferir na sua motilidade e capacidade de fertilização. As taxas de fertilização para IIU são cerca de 2 a 3 vezes maiores que para as de ICI, sendo a IIU a mais utilizada atualmente dentre as técnicas de baixa complexidade (AGARWAL; ALLAMANENI, 2007).

A fertilização *in vitro* exige que se obtenham gametas tanto femininos quanto masculinos. Os espermatozoides, na maioria dos casos, são de fácil obtenção através do sêmen, que é coletado por masturbação masculina. A obtenção dos gametas femininos, por sua vez, é mais complexa, sendo necessária a realização de punção ovariana, com anterior estimulação ovariana hormonal da paciente, com o objetivo de que inúmeros folículos sejam maturados concomitantemente (NARDELLI *et al.*, 2014).

1.2 FOLÍCULO OVARIANO

Uma vez descrita a FIV, é indispensável caracterizar o folículo ovariano, assim como os ovários, órgãos que abrigam os folículos e que contribuem para o seu desenvolvimento. Os ovários são órgãos endócrinos complexos responsáveis pela produção de hormônios sexuais femininos, como os progestágenos e estrógenos que, juntamente com as gonadotrofinas, têm a finalidade de regular a foliculogênese e favorecer o desenvolvimento do oócito para torná-lo apto à fertilização (BAYASULA *et al.*, 2012; MOORE; PERSAUD, 2008). O folículo ovariano é a unidade fundamental do ovário, sendo que este fornece um microambiente estrutural e funcional necessário ao desenvolvimento do gameta feminino. O oócito, então, recebe nutrientes e moléculas sinalizadoras das células somáticas que compõem o folículo ovariano e que, portanto, estão dispostas ao seu redor: as células da granulosa e as células da teca (BAYASULA *et al.*, 2012; FINDLAY *et al.*, 2009). As células da granulosa (CG) compõem o folículo ovariano desde o estágio de folículo primordial e elas se diferenciam a partir das células fusiformes do estroma ovariano ainda na vida fetal (GILCHRIST; RITTER; ARMSTRONG, 2004; KHAMSI; ROBERGE, 2001). As CGs possuem como principal função a produção de estrogênio no ovário, o que desencadeia a estimulação da síntese de LH pela hipófise. Os altos níveis de LH favorecem a maturação do oócito, a expansão das células do *cumulus* e consequente ovulação (DZIK; FERNANDES DONADIO; CAVAGNA, 2012). A partir da demonstração das funções desempenhadas pelas células da granulosa e de sua relevância no folículo, fica evidente sua importância na manutenção do desenvolvimento folicular e sua contribuição à qualidade do oócito (UYAR; TORREALDAY; SELI, 2013). Além disto, acredita-se que as células da granulosa sejam responsáveis por secretar sinais parácrinos que estimulam a diferenciação de células mesenquimais presentes no tecido conjuntivo adjacente ao folículo em células da teca. As células da teca localizam-se, portanto, na região interfolicular e diferenciam-se em células da teca interna e externa, de acordo com sua proximidade ao folículo (MAGOFFIN, 2005). As células da teca interna constituem um tecido vascularizado e glandular, que está em contato íntimo com a lâmina basal do folículo ovariano. Este tecido é formado por células contendo características específicas para secreção dos hormônios esteroides, como por exemplo, elevada concentração de mitocôndrias, retículo endoplasmático agranular e vesículas lipídicas. As mitocôndrias destas células contêm em seu interior a enzima CYP11A1, pertencente à família do citocromo P450, que é responsável pela clivagem do colesterol (primeira etapa da via esteroideogênica), enquanto que as vesículas lipídicas possuem

como principal função o armazenamento de ésteres de colesterol para a síntese destes hormônios (FORD, 2013; MOORE; PERSAUD, 2008). A teca externa, por sua vez, é uma camada celular folicular composta por células aglandulares dispostas de forma desordenada e que se localiza entre a teca interna e o estroma interfolicular (MAGOFFIN, 2005).

O ciclo ovariano regular é classificado em três fases distintas: folicular, ovulatória e lútea. A fase folicular, ou período pré-ovulatório, dura cerca de 9 a 23 dias e durante este período ocorre o recrutamento e o desenvolvimento dos folículos ovarianos, havendo predomínio das ações do estrogênio. A fase ovulatória, por sua vez, dura cerca de 1 a 3 dias e se caracteriza pelo pico hormonal pré-ovulatório de gonadotrofinas, após o qual dá-se a ovulação. A fase lútea, ou período pós-ovulatório, por fim, inicia após a ovulação e dura cerca de 14 dias, terminando com o início da menstruação. Nesta fase há predomínio das ações da progesterona (MELLO AIRES, 2012). Para que o ciclo ovariano ocorra de maneira adequada, é necessário que a foliculogênese, a qual se inicia ainda na vida intrauterina, se desenvolva corretamente. Esta inicia a partir dos folículos primários, desenvolvendo-se, então, folículos secundários, folículos antrais e folículos pré-ovulatórios (figura 1) (MELLO AIRES, 2012). Concomitantemente ao desenvolvimento folicular, ocorrem modificações morfológicas e bioquímicas no oócito, com o propósito de prepará-lo para que alcance a ovulação (CHAVES *et al.*, 2010).

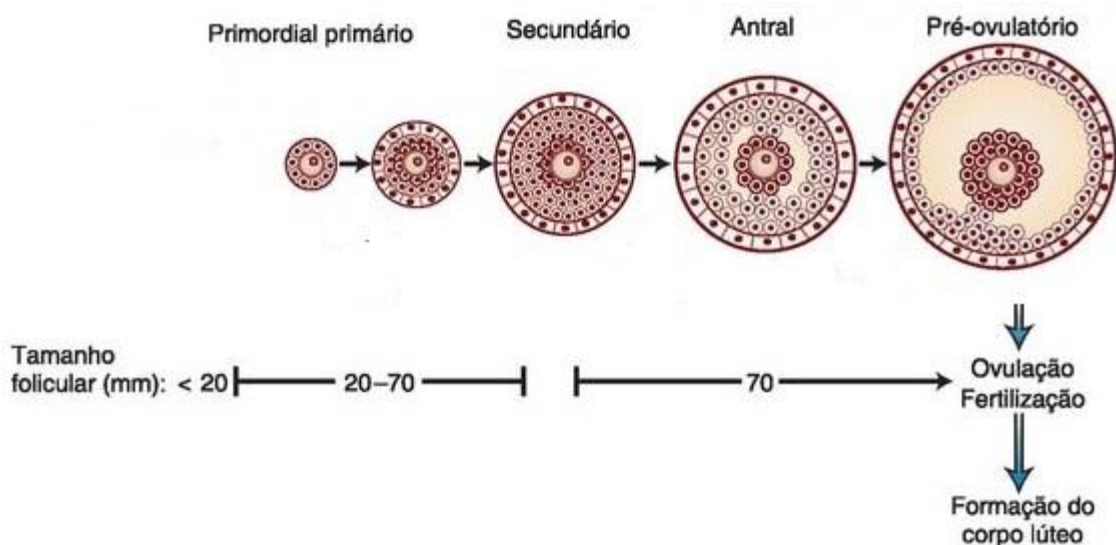


Figura 1: Desenvolvimento folicular: folículos primordial, secundário, antral e pré-ovulatório. Modificado de Kronenberg, H. M. *et al.*, 2010. (KRONENBERG, 2010).

Os folículos primordiais correspondem à reserva ovariana feminina que dará origem aos gametas femininos. Estes folículos contêm o oócito primário, o qual é formado através da divisão meiótica de oogônias ainda na vida fetal (porém, esta divisão é interrompida em prófase I até o momento da ovulação) (LIMA-VERDE; ROSSETTO; FIGUEIREDO, 2011; MELLO AIRES, 2012; MOORE; PERSAUD, 2008). Estes folículos se caracterizam pelo formato pavimentoso das células fusiformes do estroma ovariano, também denominadas de células pré-granulares, que englobam o oócito primário imediatamente após a sua formação (LIMA-VERDE; ROSSETTO; FIGUEIREDO, 2011; MOORE; PERSAUD, 2008).

A partir da puberdade, um *pool* de cerca de 10 folículos primordiais são recrutados mensalmente, devido a altos níveis de FSH (hormônio folículo estimulante), dentre inúmeros folículos presentes no ovário que permanecem quiescentes por meses ou anos até que sejam enfim recrutados (MCGEE; HSUEH, 2000; UYAR; TORREALDAY; SELI, 2013). Por ciclo, geralmente apenas um folículo completa totalmente o seu desenvolvimento, sendo que inúmeros folículos recrutados acabam sofrendo atresia (MCGEE; HSUEH, 2000). Os oócitos se desenvolvem conforme a foliculogênese vai ocorrendo e permanecem na fase meiótica estacionária de prófase I até que ocorra total diferenciação folicular. O folículo dominante tende a crescer mais rapidamente que os outros que foram também recrutados e produz uma grande quantidade de estrogênio e de inibinas – responsáveis pelo *feedback* negativo sobre a secreção do FSH. Acredita-se que este folículo tenha maior sensibilidade à ação do FSH, por possuir maior quantidade de receptores de FSH e de LH (hormônio luteinizante). A grande produção de estrogênio e de inibinas gera uma retroalimentação negativa que suprime a liberação de FSH pela hipófise, havendo menor fornecimento de FSH aos outros folículos em crescimento, que, por terem menor quantidade de receptores para este hormônio em comparação ao folículo dominante entram em atresia (MCGEE; HSUEH, 2000).

O folículo primário se caracteriza pelo formato cuboide das suas células foliculares. Nesta fase da foliculogênese ocorre formação da zona pelúcida, a qual é composta por um material glicoproteico acelular e amorfo que se localiza ao redor do oócito (LIMA-VERDE; ROSSETTO; FIGUEIREDO, 2011; MOORE; PERSAUD, 2008). A elevada taxa de multiplicação celular nesta fase de desenvolvimento favorece a formação de duas camadas de células da granulosa, o que, quando se concretiza, caracteriza o alcance do estágio de desenvolvimento folicular secundário (LIMA-VERDE; ROSSETTO; FIGUEIREDO, 2011;

MOORE; PERSAUD, 2008). É a partir deste estágio do desenvolvimento folicular que ocorre a formação das células da teca (MOORE; PERSAUD, 2008).

O desenvolvimento do folículo secundário leva à formação de espaços entre as células foliculares, que são preenchidos por fluido folicular e que acabam coalescendo e formando uma cavidade denominada antro. Neste estágio de desenvolvimento, denominado por muitos autores de *early antral* (por ser a fase inicial de formação do antro) tem-se o folículo antral. Com a formação do antro ocorre a diferenciação das células da granulosa em células do *cumulus oophorus* (CC), que estão imediatamente em contato com o oócito, e em células murais da granulosa (MGC), as quais circundam o antro e formam um epitélio estratificado delimitado por uma lâmina basal (GILCHRIST; RITTER; ARMSTRONG, 2004; KHAMSI; ROBERGE, 2001). O crescimento do oócito culmina na formação da zona pelúcida, caracterizada por uma espessa camada de glicoproteínas que se localizam ao redor do oócito, sendo de grande importância durante a fertilização (MCGEE; HSUEH, 2000). Sob estímulo do FSH, o antro do folículo antral aumenta de tamanho, resultando na formação do folículo pré-ovulatório, que também pode ser denominado de folículo de *Graaf* (UYAR; TORREALDAY; SELI, 2013).

Durante o desenvolvimento folicular ocorre a produção de hormônios androgênicos pelas células da teca interna, os quais se difundem através do fluido folicular e adentram o citoplasma das células da granulosa. Estes hormônios têm a função de potencializar os efeitos do FSH, favorecendo o aumento da atividade de enzimas, como a aromatase (CYP19A1), que converte os androgênios em estrógenos (LIMA-VERDE; ROSSETTO; FIGUEIREDO, 2011). Após o aumento elevado da quantidade de estrogênios na corrente sanguínea, ocorre o pico de LH, que favorece a maturação do oócito que se encontra em prófase da meiose I. Um dos efeitos do LH é estimular a progressão da meiose no oócito primário, sendo que assim este completa a primeira divisão meiótica e, então, libera o primeiro corpúsculo polar. Logo, o oócito secundário inicia a segunda divisão meiótica, progredindo até metáfase II, que é interrompida e somente completada quando da fertilização oocitária por um espermatozoide (MOORE; PERSAUD, 2008; UYAR; TORREALDAY; SELI, 2013).

As CCs são as principais células responsáveis por promover o desenvolvimento e o crescimento do oócito (DIAZ; WIGGLESWORTH; EPPIG, 2007). Além disto, alterações na expressão gênica que ocorrem no oócito influenciam na proliferação, diferenciação e função

das CCs e das MGCs, o que mostra a íntima relação entre estes três tipos celulares (UYAR; TORREALDAY; SELI, 2013).

1.2.1 *Cumulus oophorus*

As células do *cumulus oophorus*, que estão em contato íntimo com o oócito e formam o complexo *cumulus*-oócito CCO (figura 2), são indispensáveis para a sobrevivência e para o desenvolvimento do oócito (DIAZ; WIGGLESWORTH; EPPIG, 2007; MOORE; PERSAUD, 2008; ORTIZ-ESCRIBANO *et al.*, 2015). Estas células mantêm o oócito viável, uma vez que são responsáveis pelo fornecimento de substratos energéticos ao mesmo (UYAR; TORREALDAY; SELI, 2013). A comunicação entre as células do *cumulus* e o oócito se dá através de junções intercomunicantes (GAP), que são constituídas por hexâmeros de proteínas denominadas de conexinas (UYAR; TORREALDAY; SELI, 2013). Estas junções GAP ficam localizadas ao final dos processos citoplasmáticos transzonais (TZP), que são especializações das células do *cumulus* que penetram na zona pelúcida e entram em contato com a membrana do oócito. Assim, as junções GAP permitem a transferência de moléculas de baixo peso molecular, como íons, metabólitos, aminoácidos e pequenas moléculas regulatórias entre estes dois tipos celulares, enquanto que moléculas maiores são transportadas através de endocitose. As junções GAP são importantes por manterem a conexão entre o oócito e as células do *cumulus*, assim como das células do *cumulus* entre si (GILCHRIST; RITTER; ARMSTRONG, 2004). Estas comunicações são consideradas essenciais durante a maturação do oócito, sendo que estudos desenvolvidos em bovinos já revelaram que a remoção das células do *cumulus* antes da realização da técnica de MIV (maturação *in vitro*) impede a adequada maturação do oócito (ATEF *et al.*, 2005). Através desta íntima conexão, o oócito é nutrido de moléculas indispensáveis ao seu crescimento e à sua adequada maturação. Contudo, as conexões GAP não são as únicas que mantêm o constante contato entre as células do *cumulus* e o oócito. Existe, também, uma comunicação através de sinais parácrinos, em que ocorre a transmissão de moléculas sinalizadoras entre as células, como é o caso das proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), de grande importância no crescimento folicular. A BMP-15, por exemplo, é necessária para que ocorra adequada diferenciação e expansão das células do *cumulus* (BAYASULA *et al.*, 2012; DIAZ; WIGGLESWORTH; EPPIG, 2007). A maioria destes sinais parácrinos são

secretados pelo próprio oócito e se caracterizam por pertencerem à família dos fatores de transformação do crescimento beta (TGF β). Dentre suas inúmeras funções, estão a de regular e promover a proliferação das células da granulosa, prevenir a apoptose em células do *cumulus*, além de regular o metabolismo e inibir a luteinização destas células (KORDUS; LAVOIE, 2017). Esses sinais são fundamentais para o desenvolvimento folicular, uma vez que sem a adequada proliferação e diferenciação das células da granulosa, atresia folicular pode acontecer (BAYASULA *et al.*, 2012).

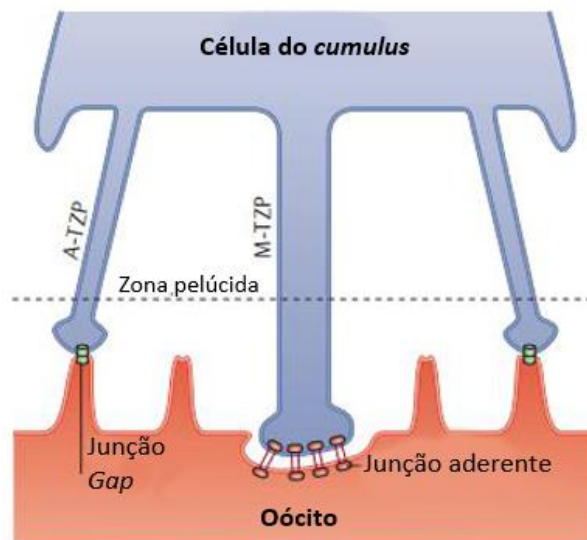


Figura 2: Comunicação entre as células do *cumulus oophorus* e o oócito: presença das junções comunicantes que existem entre estas células, as quais permitem contato constante entre o oócito e as células do *cumulus*. Modificado de Li, *et al.*, 2013 (LI, R.; ALBERTINI, 2013).

A conexão que ocorre entre as células do *cumulus* e o oócito demonstra a relevância das CCs para a manutenção do desenvolvimento folicular e, por conseguinte, da fertilidade feminina. Além disto, estas células são as responsáveis por manter o bloqueio da primeira divisão meiótica do oócito, quando este encontra-se parado na fase de prófase I. Isto ocorre porque as células do *cumulus* fornecem ao oócito, através das junções GAP, monofosfato de guanosina cíclica (cGMP), que tem como função impedir que a enzima fosfodiesterase PDE3A realize a hidrólise do monofosfato de adenosina cíclica (cAMP) no interior do oócito. Assim, tem-se altos níveis de cAMP no interior do gameta feminino, o que acaba por bloquear a

progressão da meiose. Para que ocorra a ovulação, o pico elevado do LH bloqueia estas junções GAP, impedindo a passagem de cGMP das células do *cumulus* para o oócito e a consequente hidrólise de cAMP, o que, então, possibilita a conclusão da meiose I do oócito e a ovulação folicular (UYAR; TORREALDAY; SELI, 2013). A importância das células do *cumulus* também pode ser demonstrada por sua expansão (que ocorre apenas após o pico de LH) constituir uma etapa fundamental da foliculogênese e determinante da qualidade do oócito. O estudo realizado por Veeck L. L. *et al* evidenciou menores taxas de implantação de oócitos que apresentaram, durante a maturação, baixa expansão das células do *cumulus* (CILLO *et al.*, 2007).

A pesquisa realizada por Kim *et al* apresentou um panorama sobre a expressão dos transportadores de glicose (GLUTs) em células foliculares de pacientes submetidas à fertilização *in vitro*. Foi observado que tanto as células do *cumulus* quanto as MGCs desempenham um papel fundamental na captação de glicose, uma vez que o oócito não expressa GLUTs e, desta forma, não realiza glicólise. Portanto, a expressão dos GLUTs é essencial em ambas as células foliculares para que ocorra adequada captação de glicose e o consequente abastecimento de piruvato ao oócito, a fim de que este o transforme em energia. Além disso, o oócito também não possui capacidade de realizar a biossíntese de colesterol e o transporte de alguns aminoácidos, necessitando das MGCs e das CCs para sua subsistência (KIM *et al.*, 2014).

1.3 HORMÔNIOS ESTEROIDES SEXUAIS

Além de abrigarem o gameta feminino e permitirem sua adequada maturação, os ovários possuem a função de secretar substâncias como os hormônios esteroides sexuais, que se classificam, conforme suas características, em estrogênios, progestágenos e androgênios (MELLO AIRES, 2012). No organismo feminino são secretados três diferentes tipos de estrogênios: β -estradiol, estrona e estriol. O mais importante é o estradiol, secretado principalmente pelos ovários e em parte pela glândula suprarrenal; a estrona, por sua vez, também é secretada pelo ovário, embora em pequenas quantidades. Os estrogênios atuam através de sua ligação aos receptores ER α (receptor de estrogênio α) e ER β (receptor de estrogênio β), sendo que o ER β é expresso nas células da granulosa e o ER α é expresso por

todas as células do eixo hipotálamo-hipófise-ovário, tendo, portanto, o ER β maior relevância sobre os efeitos diretos dos estrogênios nos ovários (JAMNONGJIT; HAMMES, 2006; MELLO AIRES, 2012). Dentre os progestágenos secretados, o mais importante é a progesterona e sua principal função consiste em desencadear a ovulação, juntamente com o LH. Estudos realizados em roedores puderam comprovar isto quando demonstram que na administração de antagonistas de receptores de progesterona (PR) houve bloqueio da ovulação e, além disto, ratos *knockout* para PR não ovularam mesmo sob indução de gonadotrofinas (JAMNONGJIT; HAMMES, 2006). A terceira classe de hormônios citada anteriormente, os androgênios, será descrita no tópico seguinte.

Visto isso, tem-se que estes hormônios (estrogênios e progestágenos), os quais são secretados de acordo com a fase do ciclo menstrual, desempenham um importante papel no microambiente folicular durante a foliculogênese, além de serem essenciais a outras partes do corpo, como o útero, as glândulas mamárias, o cérebro e o esqueleto. A nível sistêmico, estes hormônios atuam desenvolvendo características sexuais femininas secundárias e regulando a secreção das gonadotrofinas pela glândula hipófise, enquanto que a nível de microambiente folicular, atuam como fatores parácrinos que mantêm o desenvolvimento do oócito (GERVÁSIO *et al.*, 2014; JAMNONGJIT; HAMMES, 2006; MELLO AIRES, 2012).

A síntese dos esteroides se inicia a partir do precursor comum colesterol (figura 3), que pode ser obtido através da dieta, sendo captado pelo sangue circulante, ou através da produção endógena que ocorre no fígado. A primeira etapa da esteroidogênese é, portanto, a conversão da molécula de colesterol em pregnenolona através da ação da enzima CYP11A1, que possui a função de clivar a cadeia lateral de 6 carbonos da molécula do colesterol. Esta reação, que depende da ação do LH, ocorre na mitocôndria tanto das células da teca interna, durante toda a fase folicular, quanto das células da granulosa, principalmente na fase folicular tardia, além de ocorrer em ambos os tipos celulares na fase lútea (MELLO AIRES, 2012).

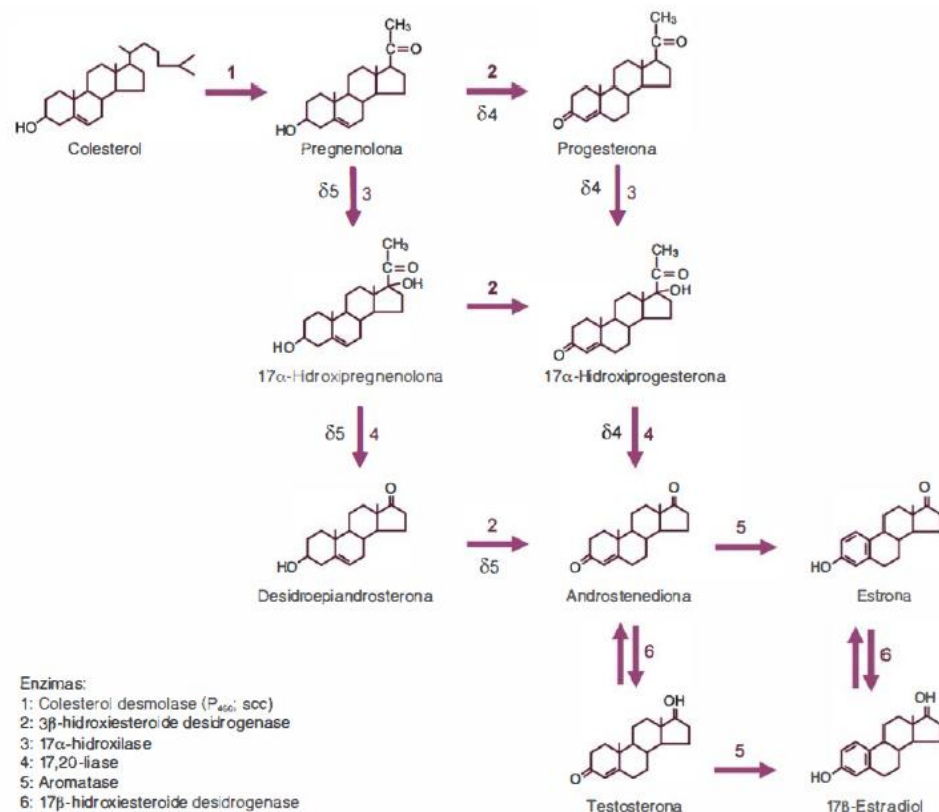


Figura 3: Biossíntese de hormônios esteroides sexuais femininos(retirado de MELLO AIRES, 2012).

A entrada do colesterol no interior da mitocôndria depende da proteína StAR, que é um transportador primário de colesterol localizado na membrana mitocondrial. A expressão da proteína StAR é crítica para a síntese de hormônios esteroides e é regulada através da ação de LH, que estimula o aumento de AMPc intracelular, promovendo aumento da expressão da proteína StAR. Portanto o AMPc promove a esteroidogênese por aumentar a síntese da proteína StAR, além de regular a atividade e a expressão da enzima aromatase nas células da granulosa, a qual é necessária para conversão de androgênios em estrogênios (JAMNONGJIT; HAMMES, 2006). O fator de crescimento insulina-like (IGF) também possui um importante papel na síntese dos hormônios esteroides, visto que ele atua aumentando os níveis de expressão e de atividade de enzimas essenciais a este processo, como a 17α-hidroxiase (CYP17) e aromatase. Além disto, o IGF-1 possui a capacidade de aumentar a transcrição do gene do receptor de LH, o que, indiretamente, acaba aumentando a expressão da proteína StAR (JAMNONGJIT; HAMMES, 2006).

A síntese dos hormônios esteroides consiste em um modelo de duas células – dois hormônios, que ocorre de maneira coordenada e envolve as células foliculares da teca e da

granulosa, assim como os hormônios FSH e LH (figura 4) (MELLO AIRES, 2012). Nas células da teca, sob estímulo do LH, ocorre a síntese de androgênios, como testosterona e androstenediona, a partir do colesterol, enquanto que nas células da granulosa, sob estímulo do FSH, ocorre a conversão dos androgênios a estrogênios por ação da aromatase. Os androgênios, portanto, provêm principalmente das células da teca e se difundem através das junções GAP até a camada de células da granulosa (JAMNONGJIT; HAMMES, 2006; MELLO AIRES, 2012). Os hormônios androgênicos, portanto, modulam o efeito do FSH nas células da granulosa, através de sua ação nos receptores de androgênios (AR), gerando aumento de AMPc intracelular, o que favorece a ação do FSH nestas mesmas células (JAMNONGJIT; HAMMES, 2006). Os estrogênios, por sua vez, representados principalmente pelo β -estradiol, atuam estimulando a proliferação das células do *cumulus* e também aumentando a expressão dos receptores de FSH (rFSH), o que potencializa o efeito deste hormônio. Além disto, a alta concentração de β -estradiol causa um *feedback* negativo na hipófise que é responsável por controlar a produção de gonadotrofinas nesta glândula (JAMNONGJIT; HAMMES, 2006; MELLO AIRES, 2012).

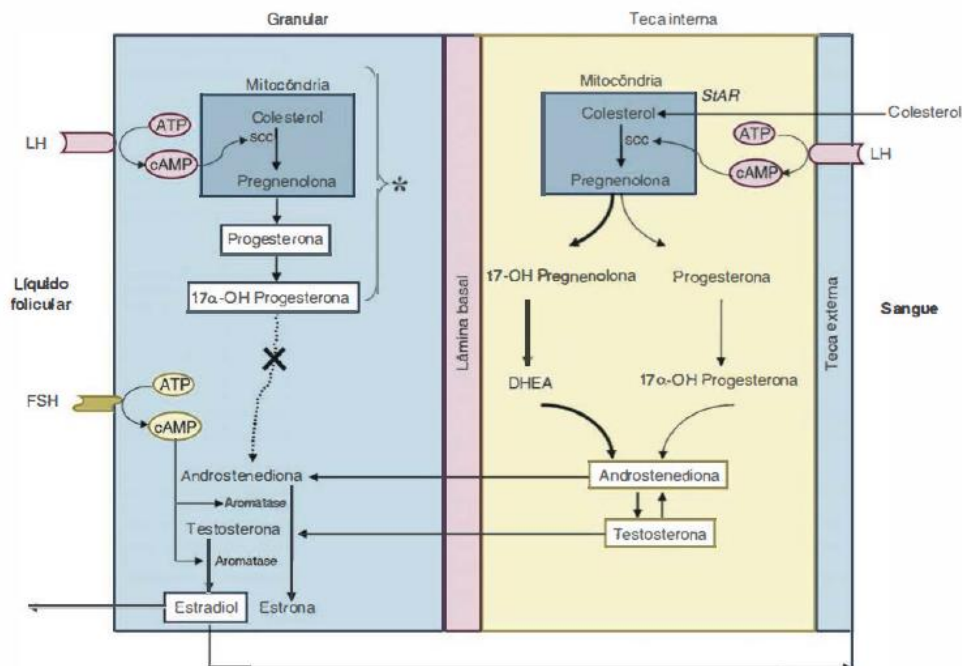


Figura 4: Modelo duas células – dois hormônios. As etapas entre a chave (*) tornam-se mais significativas na fase folicular e fase lútea. A 17 α -OH Progesterona não é metabolizada em androgênios (linha pontilhada) pois as células da granulosa não produzem 17 α -hidroxilase e 17,20-liase (Retirado de MELLO AIRES, 2012).

A diferença de função entre esses dois tipos de células foliculares é determinada principalmente por padrões distintos de expressão gênica. Como as células da teca interna têm a função de produzir androgênios, estas expressam principalmente receptores de LH e a enzima CYP17, responsável em transformar a pregnolona em 17α -hidroxipregnenolona e a progesterona em 17α -hidroxiprogesterona. Já as células da granulosa, que apresentam como uma de suas funções converter os androgênios em estrogênios, possuem uma maior expressão de receptores de FSH e da enzima aromatase. Além disso, ambas as células expressam proteínas que permitem a síntese de pregnolona e de progesterona a partir do colesterol, como a proteína regulatória StAR, a CYP11A1 e a 3β -HSB (3β -hidroxiesteroide desidrogenase) (JAMNONGJIT; HAMMES, 2006).

Há diferentes padrões na secreção dos hormônios esteroides durante o ciclo ovariano. Durante a fase inicial, denominada de folicular, que ocorre em momento anterior à ação das gonadotrofinas sob as células da granulosa, as células da teca interna são responsáveis pela produção da maior parte dos hormônios esteroides. Isto ocorre porque nesta fase as células da granulosa estão relativamente avascularizadas e possuem baixo aporte de oxigênio e de nutrientes como o colesterol, ficando limitadas a sintetizar pregnenolona e progesterona. Porém, após exposição às gonadotrofinas, as células da granulosa tornam-se luteinizadas e passam a produzir grandes quantidades de pregnenolona e progesterona a partir do colesterol, fornecendo assim a maior parte da progesterona necessária para que ocorra a ovulação e maturação do oócito (JAMNONGJIT; HAMMES, 2006). Antes do término da fase folicular, em que o folículo está em crescimento, há um grande aumento na secreção de estrogênio, até que um dos folículos que foram recrutados assume dominância e passa a sintetizar uma grande quantidade de enzima aromatase, o que leva a um aumento ainda maior na secreção de estrogênios por este folículo. Acredita-se que esta capacidade dos folículos dominantes seja determinada, dentre outros fatores, pelo grande aumento da vascularização que ocorre nestes folículos, o que permite que o dominante tenha um maior aporte de gonadotrofinas. No período pré-ovulatório, que antecede o pico de LH e a ovulação, as células da granulosa passam a sintetizar receptores de LH, principalmente por estímulo dos altos níveis de estrogênio e da ação do FSH. A presença dos receptores de LH e a ação deste hormônio sob as células da granulosa aumenta a expressão da enzima colesterol desmolase, que converte colesterol em pregnenolona. Porém, embora estas células apresentem expressão da enzima 3β -HSB, que

converte pregnenolona em progesterona, não apresentam grandes quantidades da enzima 17,20-liase, que é capaz de converter 17α -hidroxiprogesterona em androstenediona, e, por este motivo, há um aumento na concentração de progesterona e de 17α -hidroxiprogesterona nas células da granulosa. Este aumento da síntese de progestágenos pode se dar pelo fato de que no período pré-ovulatório a camada de células da granulosa é invadida por vasos sanguíneos provenientes da teca interna, o que contribui também para um aumento na exposição às gonadotrofinas. A partir da produção de progesterona pelas células da granulosa, estas acabam perdendo receptores de FSH e de estrogênio, havendo aumento da produção de progesterona que acaba coincidindo com uma queda da produção de estrogênio. A partir do período pré-ovulatório, então, as células foliculares passam a ser mais refratárias à ação do FSH. É este aumento de progesterona e de estrogênio que induz o pico de LH, o qual causa, dentre outros, maior produção de líquido folicular que acaba culminando em ruptura da parede folicular e consequente ovulação (MELLO AIRES, 2012).

A partir da liberação folicular do oócito, inicia a fase lútea, na qual ocorre a formação do corpo lúteo, que se forma a partir das células da teca e das células da granulosa. As células da granulosa luteinizadas passam a produzir progesterona e 17α -hidroxiprogesterona em grandes quantidades, embora também produzam o 17β -estradiol em pequenas quantidades (sendo assim, a fase lútea é caracterizada por elevada concentração de progestágenos e baixa de estrogênios em relação aos progestágenos). Já as células da teca luteinizadas passam a produzir progesterona e androgênios, como androstenediona e testosterona. Além disso, nesta mesma fase do ciclo ovariano ocorre uma queda nos picos das gonadotrofinas (MELLO AIRES, 2012).

Dados os parágrafos acima, acerca dos hormônios esteroides sexuais, é possível observar a relevância da classe de hormônios androgênios, os quais estão presentes na maior parte do ciclo menstrual. Além de exercerem seus efeitos de forma direta nas células, eles são o substrato necessário para a síntese de estrogênio, o que potencializa o papel dos androgênios sobre o organismo feminino.

1.3.1 ANDROGÊNIOS

Durante décadas, as evidências sobre a ação dos hormônios androgênicos no desenvolvimento folicular mostraram que esta era prejudicial à foliculogênese normal. Parte desta teoria se deve ao fato de que alterações endócrinas envolvendo os androgênicos, como a síndrome dos ovários policísticos (SOP), causam, em sua maioria, baixa qualidade do gameta feminino. Na SOP, por exemplo, ocorre aumento dos níveis de androgênicos, gerando um quadro de hiperandrogenismo que pode causar consequências como a infertilidade. Isto ocorre principalmente devido ao fato de que quando em concentrações supra fisiológicas, os androgênicos afetam a capacidade de divisão meiótica do oócito (GLEICHER; WEGHOFER; BARAD, 2011). Atualmente, porém, muitos estudos vêm sendo realizados na tentativa de entender a real ação dos androgênicos no desenvolvimento folicular, uma vez que a ativação do receptor de androgênio (AR) em células da granulosa tem função de modular a expressão e a atividade de genes importantes na manutenção folicular, o que vem alterando a ideia exposta anteriormente do efeito prejudicial desses hormônios (GERVÁSIO *et al.*, 2014). O AR faz parte da família de receptores nucleares e sua ativação ocorre mesmo na presença de quantidades nanomolares de androgênicos que estejam presentes no citoplasma celular. Esta ação desencadeia na ativação de vias de sinalização que irão alterar a expressão de genes que modulam a atividade do FSH nas células da granulosa, promovendo a diferenciação e maturação folicular (GLEICHER; WEGHOFER; BARAD, 2011; WALTERS, 2015). Gervásio *et al* citaram estudos realizados em mamíferos nos quais foi observada uma associação entre a deficiência do AR e a falência ovariana prematura (FOP), demonstrando a importância da ação dos androgênicos na regulação do desenvolvimento folicular (GERVÁSIO *et al.*, 2014). Também foi observado que a ativação do AR é capaz de promover o crescimento de folículos pré-antrais e prevenir a atresia folicular (GLEICHER; BARAD, 2011).

Durante a maior parte do ciclo folicular, o aporte principal de androgênicos necessários para o desenvolvimento folicular é realizado pelas células da teca, sob estímulo de baixas concentrações de LH, pois em altas concentrações deste hormônio ocorre maior secreção de progesterona, desencadeando a luteinização das células da teca (GLEICHER; WEGHOFER; BARAD, 2011). O efeito dos androgênicos sobre a maturação dos folículos ovarianos ocorre principalmente em estágios iniciais do desenvolvimento folicular (GLEICHER; WEGHOFER; BARAD, 2011). A avaliação de seus efeitos sobre os diferentes estágios de maturação se dá através da detecção da expressão do AR. A expressão deste receptor se dá a partir do folículo primário, não sendo detectada em quantidades significativas em folículos primordiais,

demonstrando que o efeito dos androgênios ocorre principalmente enquanto os folículos encontram-se em desenvolvimento. No entanto, alguns estudos realizados em camundongos demonstraram que a administração dos androgênios testosterona e di-hidrotestosterona (DHT) estimulou o desenvolvimento dos folículos primordiais, e uma vez que não há expressão de AR neste estágio, acredita-se que a ação dos androgênios se dê através de mecanismos parácrinos indiretos mediados pelo IGF-1 (WALTERS, 2015). Além disto, a detecção de maior concentração de RNAm de AR e da proteína que forma o receptor hormonal ocorre em ovários que contenham, em sua maioria, folículos pré-antrais e *early* antrais. Estes folículos, inclusive, são os que constituem a reserva ovariana funcional (ROF) (GLEICHER; WEGHOFER; BARAD, 2011). Conforme os folículos desenvolvem-se, ocorre uma redução nos níveis de expressão do AR, demonstrando que os androgênios possuem maior relevância nos estágios iniciais da foliculogênese (GLEICHER; WEGHOFER; BARAD, 2011). Além disto, acredita-se que o efeito dos androgênios tenha sido conservado ao longo da evolução, principalmente pelo fato de a sequência gênica do AR ser semelhante entre outras espécies de mamíferos, como ovinos e bovinos (WALTERS, 2015). O efeito dos androgênios sobre o AR possui capacidade de modular o efeito do FSH sobre as células da granulosa. A interação entre estes hormônios é descrita como um efeito sinérgico de *feedback*, uma vez que estas células são responsivas ao FSH nos estágios do desenvolvimento em que ocorrem alterações no metabolismo androgênico (figura 5) (GLEICHER; WEGHOFER; BARAD, 2011). Além dos efeitos diretos observados pelos androgênios há, ainda, os efeitos indiretos, que ocorrem devido ao fato de os androgênios serem convertidos, nas células da granulosa, em estrogênios por ação da enzima aromatase. Neste caso, os efeitos indiretos dos androgênios se dão via receptor de estrogênio (WALTERS, 2015).

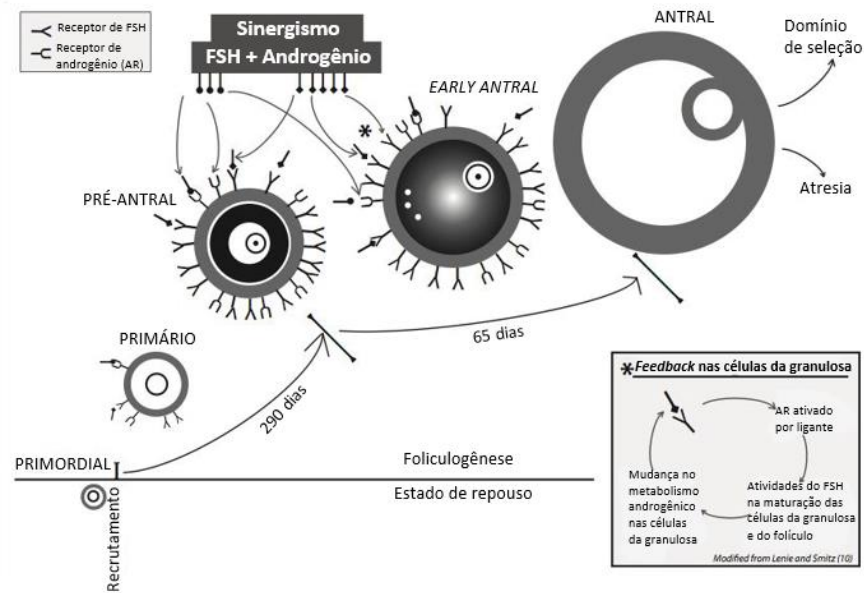


Figura 5: Efeito sinérgico de *feedback* entre androgênios e FSH: este efeito sinérgico entre estes hormônios é observado nos estágios iniciais da foliculogênese, com uma maior intensidade nos estágios pré-antral e *early antral*. Na figura vê-se uma maior concentração de receptores de AR no estágio pré-antral e uma diminuição destes no estágio subsequente, demonstrando a importância principal dos androgênios em estágios iniciais da foliculogênese. O efeito da ativação do AR possui a capacidade de modular a ação do FSH e com isso ocorrem alterações no metabolismo dos androgênios como uma forma de *feedback*. Modificado de GLEICHER *et al* 2011.

Portanto, os androgênios desempenham papel de otimizar o crescimento folicular e a ovulação, de forma a manter a qualidade do oócito e a função ovariana. Porém, é importante ressaltar que o efeito dos androgênios em grandes concentrações pode ser prejudicial à qualidade reprodutiva, uma vez que quando há altos níveis androgênicos no organismo pode ocorrer SOP, por exemplo (WALTERS, 2015). O androgênio fisiológico deve se manter em níveis homeostáticos, ou seja, suas funções fisiológicas ocorrem dentro de uma faixa estreita, sendo tanto concentrações altas ou baixas prejudiciais ao desenvolvimento folicular (GLEICHER; WEGHOFER; BARAD, 2011). Dois androgênios que vêm sendo amplamente estudados são a deidroepiandrosterona (DHEA) e seu sulfato (SDHEA), devido ao fato de que suplementação oral com estes hormônios é feita em algumas pacientes submetidas à FIV (GLEICHER; BARAD, 2011).

1.3.1.1 DEHIDROEPIANDROSTERONA (DHEA) E SEU SULFATO (SDHEA)

A dehidroepiandrosterona (DHEA) é o hormônio esteroide mais comum no organismo feminino, sendo secretado majoritariamente pela glândula adrenal (85%) e pelos ovários (15%). Sua produção no ovário ocorre nas células da teca a partir do estágio de folículo secundário, havendo um pico em sua síntese nos folículos antrais (FORD, 2013; FOUANY; SHARARA, 2013; SCIARD *et al.*, 2016). Ela constitui uma parcela dos androgênios, porém é descrita como sendo um androgênio fraco, devido à sua incapacidade de ativar, de forma isolada, o AR, sendo necessário, portanto, que ela seja convertida em testosterona, para que a testosterona e a DHT ativem o AR (FOUANY; SHARARA, 2013; LI, J. *et al.*, 2015; WALTERS, 2015). Portanto, a DHEA atua como um precursor intracelular de androgênios e de estrogênios, uma vez que ela origina a androstenediona, que faz parte da produção da testosterona e da estrona, que irá originar o estradiol (FOUANY; SHARARA, 2013; SCIARD *et al.*, 2016). O SDHEA é o sulfato de dehidroepiandrosterona e sua síntese ocorre da mesma forma que a DHEA, porém a intensidade com que interagem com a globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG) é diferente. Enquanto a DHEA interage de forma fraca com a SHBG, a SDHEA se liga fortemente. Assim a DHEA torna-se mais ativa metabolicamente, estando presente em menores concentrações no plasma sanguíneo, enquanto os níveis de SDHEA estão presentes em maiores quantidades (FOUANY; SHARARA, 2013).

Casson *et al* foram os primeiros a sugerir efeitos terapêuticos da suplementação com DHEA em mulheres com diminuição da reserva ovariana (GLEICHER; BARAD, 2011). A partir deste estudo demonstrou-se que a administração oral de DHEA em pacientes com reserva ovariana diminuída aumentava a responsividade ovariana às gonadotrofinas, demonstrando um efeito sinérgico entre estes hormônios (figura 5) (CASSON *et al.*, 2000). Portanto, a suplementação com DHEA revela uma forma de potencializar a resposta ovariana à indução hormonal, além de reduzir a dose de gonadotrofinas necessárias para tal finalidade e, portanto, diminuir as chances de hiperestimulação ovariana (CASSON *et al.*, 2000). Grande parte dos ensaios clínicos de suplementação com DHEA realizam a administração deste hormônio cerca de 12 semanas antes da FIV, demonstrando a importância dos androgênios nas fases iniciais do desenvolvimento folicular. A dose oral utilizada nestes ensaios é, normalmente, de 75 mg diárias (FORD, 2013; FOUANY; SHARARA, 2013). Porém, o exato mecanismo pelo qual a DHEA é capaz de modular os efeitos das gonadotrofinas ainda é desconhecido, embora Casson

et al tenham demonstrado que a administração de DHEA gera um aumento de 150% na secreção do IGF-1, e, portanto, estes autores acreditam que o mecanismo de ação da DHEA se dê através desta molécula (CASSON *et al.*, 2000).

A DHEA pode estimular a produção de PPAR α (receptor α ativado por proliferador de peroxissomo), que promove o transporte de ácidos graxos através de membranas, como ocorre na mitocôndria e regula genes que codificam enzimas como delta-6 e delta-9 desaturases, que fazem parte da reação de fosforilação mitocondrial oxidativa (FORD, 2013). Assim, a redução dos níveis de PPAR α pode ser um fator que predisponha à disfunção citoplasmática em oócitos, comumente encontrada em mulheres com idade avançada (FORD, 2013). A importância do PPAR α e sua estimulação a partir da DHEA demonstram que a suplementação oral com este hormônio está diretamente relacionada com a qualidade do oócito, o que corrobora com resultados de outros estudos, que mostram que a administração com DHEA foi capaz de aumentar o número de oócitos recrutados, assim como as taxas de fertilização e de implantação (FORD, 2013; GLEICHER; BARAD, 2011).

Assim sendo, a utilização de DHEA como um adjuvante às técnicas de reprodução assistida tem como objetivo melhorar a performance ovariana de mulheres com reserva ovariana reduzida ou de mulheres com idade superior a 38 anos (FOUANY; SHARARA, 2013; GLEICHER; BARAD, 2011). Cerca de um terço das clínicas de reprodução assistida no mundo vêm utilizando DHEA nos protocolos de suas pacientes, na tentativa de aumentar as chances de gestação (GLEICHER; BARAD, 2011). A administração de DHEA parece aumentar a qualidade do oócito, assim como dos embriões, possivelmente por este hormônio ter um papel direto no microambiente folicular, o que ocorre por ele estimular, através da testosterona, o AR. Assim, a DHEA gera um aumento no número de folículos antrais, por atuar, possivelmente, no recrutamento dos folículos. Como consequência, há um aumento da quantidade de hormônio AMH (hormônio anti-Mülleriano), o qual é secretado pelas células da granulosa de folículos em estágios pré-antral e *early antral* e aumenta a produção de inibina B (FOUANY; SHARARA, 2013; GLEICHER; BARAD, 2011). Tanto o número de folículos antrais quanto a dosagem do AMH, são características que definem a reserva ovariana, sendo que níveis baixos de AMH podem inferir falência ovariana precoce, enquanto que a administração de DHEA, ao contrário, gera um aumento na concentração de AMH (FOUANY; SHARARA, 2013). Além disso, a administração de DHEA aumenta as chances de gravidez, assim como reduz o número

de abortos espontâneos, o que parece estar relacionado aos efeitos da DHEA sobre a segregação cromossômica no momento da divisão meiótica dos oócitos, o que diminui as chances de que os embriões sejam aneuplóides (GLEICHER; BARAD, 2011). Portanto, a utilização de DHEA como adjuvante nas técnicas de reprodução assistida pode reduzir as taxas de infertilidade, porém o mecanismo exato pelo qual este hormônio é capaz de realizar seus efeitos ainda é desconhecido.

1.4 PROTOCOLO DE DESLUTEINIZAÇÃO

As células do *cumulus oophorus* fazem parte do microambiente folicular, desta forma sua utilização permite avaliar os efeitos da DHEA sobre o folículo ovariano. As pacientes que realizam FIV, passam pelo processo de indução hormonal o que leva as células foliculares a um estágio luteinizado quando coletadas. Portanto, a utilização deste modelo de cultivo celular acaba sendo limitado, pois, da maneira como são recuperadas, não é possível utilizar estas células em estágios anteriores ao de luteinização da foliculogênese (OPHIR *et al.*, 2014).

Considerando os efeitos da DHEA em estágios iniciais do desenvolvimento folicular, nosso estudo baseou-se no protocolo de desluteinização desenvolvido por Ophir *et al.*, em 2014. Este protocolo tem o objetivo de estimular as células do estágio luteinizado a se diferenciarem em células semelhantes às do folículo *early antral* e restaurar a responsividade hormonal destas células (OPHIR *et al.*, 2014).

1.5 GENES ALVO UTILIZADOS NESTE EXPERIMENTO

Para avaliar os efeitos da exposição do SDHEA sobre as células do *cumulus oophorus*, utilizou-se *probes* TaqMan® com a finalidade de verificar se este hormônio tinha a capacidade de modificar a expressão de algum dos genes avaliados. O gene normalizador foi o HPRT1, baseado no trabalho de Alcoba D. e colaboradores (dados ainda não publicados).

O VCAM1 (molécula de adesão celular vascular 1) é uma glicoproteína transmembrana que pertence à superfamília das imunoglobulinas e que atua como mediadora essencial da

adesão das células brancas sanguíneas, assim como no extravasamento vascular destas células, sendo muito importante em reações inflamatórias e imunes (BENIFLA *et al.*, 2001). Além disso, esta molécula desempenha um importante papel no reconhecimento e nas interações intracelulares que ocorrem no interior do ovário, participando também do processo de remodelamento da regulação do ciclo ovariano (FORNARO *et al.*, 2007). Estudos realizados em pacientes submetidas à FIV demonstraram forte correlação entre os níveis de VCAM1 no líquido folicular e as taxas de fertilização, evidenciando que esta molécula pode estar envolvida no controle do desenvolvimento folicular, assim como da esteroidogênese. Ainda, ela mostrou maior expressão em folículos de maior diâmetro, comprovando sua maior importância em fases mais tardias do desenvolvimento folicular (BENIFLA *et al.*, 2001; FORNARO *et al.*, 2007). Portanto, a expressão gênica de VCAM1 em células foliculares pode ser um preditivo da qualidade oocitária.

O FSH é um hormônio de extrema importância para o funcionamento reprodutivo normal, estando associado ao recrutamento folicular e à maturação oocitária. O mecanismo pelo qual o FSH contribui com a foliculogênese está relacionado principalmente por seu estímulo à produção de fatores de crescimento e por sua ação na esteroidogênese, na qual estimula a conversão de androgênios em estrogênios (GROMOLL *et al.*, 1996). O FSH também é responsável por promover a diferenciação e a proliferação celular que ocorrem durante a foliculogênese nas células foliculares, da mesma forma que estimula a formação do antro folicular. Além disto, ele promove a extensão das junções GAP que ligam as CCs e o oócito (FRAGOULI; LALIOTI; WELLS, 2014). As ações celulares deste hormônio se dão após sua ligação ao seu receptor, o rFSH. Este está acoplado à proteína G e, quando ativado pela ligação do FSH, sofre uma mudança conformacional que causa um aumento de AMPc no citoplasma celular. Portanto, é a partir deste mecanismo (de aumento de AMPc) que o FSH causa seus efeitos na célula (GROMOLL; SIMONI, 2005). Dada a gama de contribuições do FSH à manutenção do folículo e ao seu correto desenvolvimento, especialmente por contribuir com a maturação oocitária (que é indispensável para que o oócito esteja apto para a fecundação), a avaliação do seu receptor permite avaliar sua adequada ação nas células.

O estradiol atua através de dois receptores no organismo feminino, o ER α e o ER β . O ER α é amplamente expresso em células que fazem parte do eixo hipotálamo-hipófise-ovário,

não sendo específico dos ovários. Contrariamente, o ER β é expresso principalmente e em maior abundância nas células da granulosa e, por este motivo, possui maior relevância no ambiente intraovariano (COUSE *et al.*, 2005; JAMNONGJIT; HAMMES, 2006). O ER β medeia a estimulação das células da granulosa por estradiol e modula a ação do FSH nestas células (JAMNONGJIT; HAMMES, 2006). Estudos realizados utilizando camundongos *knockout* para ER β demonstraram uma redução na massa celular de *cumulus* e no crescimento de células da granulosa, com conseqüente redução da fertilidade das fêmeas. Ainda, foi vista uma redução significativa das taxas de ovulação, visto que sem a adequada ação do estradiol no ambiente ovariano ocorreram ciclos anovulatórios e, mesmo com estímulo de gonadotrofinas exógenas, não ocorreu ovulação de maneira adequada, o que reduziu o número de oócitos passíveis de fertilização (COUSE *et al.*, 2005; JAMNONGJIT; HAMMES, 2006). Portanto, demonstrada a importância da ação do estradiol no ovário para que ocorra o desenvolvimento normal dos folículos, tem-se que a avaliação da expressão gênica do ER β torna-se um indicador do adequado funcionamento hormonal ovariano, além de que a ação indireta da DHEA, após esta ser convertida em estrogênio, se dá através da ligação ao ER β .

O AR faz parte da família dos receptores nucleares e sua expressão ocorre em células que fazem parte do eixo hipotálamo-hipófise-ovário, sendo ele amplamente expresso na gônada feminina, como nas células da granulosa, por exemplo (WALTERS, 2015). Sua ativação nas células da granulosa modula a expressão e a atividade de genes importantes na manutenção folicular, principalmente por modular a ação do FSH sobre as células da granulosa, favorecendo, assim, a diferenciação destas em células do *cumulus oophorus* (GERVÁSIO *et al.*, 2014; GLEICHER; WEGHOFER; BARAD, 2011). A ação dos androgênios é mais proeminente durante as fases iniciais do desenvolvimento folicular, como é o caso dos folículos pré-antrais e *early antrais* (GLEICHER; WEGHOFER; BARAD, 2011). Portanto, a avaliação dos efeitos do SDHEA sobre a expressão do AR em CCs em estágio *early antral* poderá inferir sobre possíveis benefícios desta administração hormonal, uma vez que os androgênios exercem importantes efeitos em células foliculares em estágios iniciais de desenvolvimento.

1.6 JUSTIFICATIVA

Dados da literatura mostram efeitos positivos da administração de DHEA às pacientes submetidas aos processos de fertilização assistida, aumentando as taxas de fertilização e gestação. No entanto, os mecanismos pelos quais a DHEA e seu sulfato atuam no ambiente ovariano são desconhecidos. A realização deste trabalho justifica-se pela necessidade de estudos que tentem elucidar os mecanismos de ação desses hormônios no ambiente folicular. Este conhecimento, se comprovado, poderá otimizar o uso da DHEA, na busca de melhores resultados nos processos de reprodução assistida.

1.7 OBJETIVOS

1.7.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da exposição do SDHEA em células do *cumulus oophorus* no estágio *early antral* da foliculogênese.

1.7.2 Objetivos específicos

Avaliar a secreção dos hormônios E2, progesterona e SDHEA no sobrenadante do cultivo primário das células do *cumulus oophorus* no estado *early antral*, não luteinizado, nos grupos controle e tratado com SDHEA.

Avaliar a expressão gênica de *rFSH*, de *ER β* , de *AR* e de *VCAM-1* de células do *cumulus oophorus* no estado *early antral*, não luteinizado, nos grupos controle e tratado com SDHEA.

2 ARTIGO CIENTÍFICO:**TRABALHO EXPERIMENTAL
NA FORMA DE ARTIGO CIENTÍFICO**

Com intenção de publicação na revista *Journal of Reproductive Biology*, este artigo está formatado nos moldes exigidos pela revista (normas no anexo A).

**SDHEA eleva a secreção de estradiol em células do *cumulus oophorus* no
estágio *early antral***

Betina Iser^{a§}, Júlia Schneider^a, Diego Duarte Alcoba^a, Letícia Arruda^c, Helena von Eye
Corleta^b, Ilma Simoni Brum^a.

a– Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral, Departamento de Fisiologia –
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500 – Bairro Farroupilha - Porto
Alegre – RS – Brasil, 90035-190

b – Serviço de Ginecologia e Obstetrícia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos,
2350 – Bairro Santa Cecília – Porto Alegre - RS – Brasil, 90035-903

c – Clínica de Reprodução Assistida ProSer, Rua Cel. Paulino Teixeira, 97 – Bairro Rio Branco -
Porto Alegre, RS – Brasil, 90420-160

§ - Autor Correspondente:

Endereço de Email: betina_228@hotmail.com

ABSTRACT

Nowadays some researches are showing that supplementation of DHEA (dehydroepiandrosterone) can increase clinical pregnancy rates and the number of oocytes retrieved in patients undergoing assisted reproductive technologies (ART), mainly in women with diminished ovarian reserve (DOR). Despite the benefits of DHEA, its mechanism of action is unknown. Therefore, our study proposes to analyze the effects of SDHEA (dehydroepiandrosterone sulfate) in *cumulus oophorus* cells on early antral stage. The effects of SDHEA in these cells were measured through hormonal dosage of estradiol (E₂), progesterone (P) and SDHEA, besides the gene expression of FSH receptor (*rFSH*), vascular cell adhesion molecule 1 (*VCAM-1*), androgen receptor (*AR*) and estrogen receptor beta (*ERβ*). Our findings demonstrate that the major action of supplementation of SDHEA is to increase the levels of E₂, without alteration on secretion of P. *rFSH*, *AR* and *ERβ* gene expression did not differ between control and treated groups. On the other hand, *VCAM-1* gene expression was higher in control group, compared to treated. Additional studies are necessary to elucidate the exact action mechanism of DHEA, but the present study demonstrates that perhaps this mechanism may be involved with increased production of estradiol.

Keywords: DHEA (dehydroepiandrosterone); SDHEA (dehydroepiandrosterone sulfate); estradiol; *cumulus oophorus*, RT-qPCR;

2.1 INTRODUÇÃO

A infertilidade é uma alteração reprodutiva complexa que afeta cerca de 15% dos casais em idade reprodutiva no mundo todo, gerando implicações sociais e financeiras. Tal fato provoca um aumento na busca por técnicas de reprodução assistida (TRA) [1–3]. Contudo, alguns casais, mesmo após o tratamento com TRAs, permanecem apresentando baixas taxas de implantação e de gravidez. Casos assim são frequentes em mulheres com reserva ovariana diminuída (ROD), que, embora realizem a indução hormonal, apresentam um número reduzido de oócitos recuperados por punção ovariana [4]. Tendo em vista esta perspectiva, muitos estudos estão sendo realizados na tentativa de se conseguir aumentar o número de oócitos recrutados para a realização das TRAs. A DHEA (dehidroepiandrosterona) tem sido empregada em pacientes com ROD para essa finalidade e tem-se observado que a suplementação oral com este hormônio aumenta a responsividade das células foliculares às gonadotrofinas, potencializando os efeitos da indução hormonal [5]. Além disso, estudos demonstraram que mulheres que receberam DHEA antes da realização da FIV apresentaram aumento da qualidade do oócito e maior número de folículos antrais, indicando que este hormônio atua, também, no recrutamento folicular. Desta forma, conclui-se que a DHEA possui capacidade de elevar as chances de gestação a partir das TRAs [5,6]. O sulfato de dehidroepiandrosterona (SDHEA) é sintetizado a partir de uma molécula de DHEA, sob ação da enzima dehidroepiandrosterona sulfotransferase (DHEAST) que realiza a adição de um sulfato à molécula de DHEA [6].

A produção endógena de DHEA ocorre nos ovários, predominantemente nas células da teca, sendo que esta síntese hormonal inicia no estágio de folículo secundário e fornece 15% do aporte total de DHEA necessário para o organismo feminino. O restante da DHEA sintetizado no organismo (85%) é produzido pelas glândulas adrenais [6]. Além de sua ação endócrina, no meio intracelular a DHEA atua como precursora de outros androgênios e de estrogênios. Os androgênios, de forma geral, desempenham os papéis principais de promover o crescimento folicular e a ovulação, de manter a qualidade do oócito e as funções ovarianas, especialmente durante as fases iniciais da foliculogênese [7]. Os estrogênios, por sua vez, potencializam a ação do FSH (hormônio folículo estimulante) sobre as células foliculares por aumentarem a expressão de receptores de FSH (rFSH) e também por estimularem a proliferação de células do *cumulus oophorus* [8].

O folículo ovariano é a unidade fundamental do ovário, pois fornece um ambiente estrutural e funcional necessário ao desenvolvimento do gameta feminino [9]. É composto por células que se dispõem ao redor do oócito, como as células da granulosa e as células do *cumulus oophorus* (CCs). As células da granulosa compõem o folículo ovariano desde o estágio inicial da foliculogênese (folículo primordial). No entanto, durante a formação do antro, que ocorre no estágio de folículo antral, as células da granulosa diferenciam-se em CCs, as quais estão em contato íntimo com o oócito, e em células murais da granulosa (MGCs), as quais circundam o antro [10]. As CCs são indispensáveis para o crescimento do oócito, pois fornecem substrato energético ao gameta feminino, através das junções intercomunicantes (GAP) [3,10]. É também a partir das junções GAP que as CCs controlam a progressão da meiose I do oócito, processo de divisão celular que se inicia ainda na vida fetal e que somente se completa no momento da ovulação [3].

A utilização desse modelo experimental já está bem estabelecida, devido ao fato de que essas células estão em íntimo contato com o oócito e fornecem condições ideais para que o gameta feminino se desenvolva com qualidade [11]. Contudo, o cultivo primário das células da granulosa possui limitações experimentais, visto que sua obtenção se dá por TRAs nas quais estas células são expostas a hormônios (devido à indução hormonal das pacientes). Isso faz com que as células se encontrem em um estágio luteinizado quando recuperadas para a realização de estudos, e, portanto, não é possível avaliá-las em estágios anteriores ao de luteinização [11]. Vista a importância em se estudar e avaliar *in vitro* estágios da foliculogênese anteriores ao de luteinização das células foliculares, Ophir *et al* desenvolveram, em 2014, um protocolo de desluteinização celular [11]. Esse estudo demonstrou que as células murais da granulosa em estágio luteinizado, obtidas através das TRAs, quando cultivadas pelo período de 4 dias em meio de cultura livre de hormônios, com troca diária do meio, diferenciavam-se em células semelhantes às aquelas em estágios anteriores da foliculogênese. A partir desse protocolo pode-se reprogramar as células murais da granulosa a um estágio de desenvolvimento folicular semelhante ao *early antral*, que fisiologicamente é representado pelo folículo antral e que precede o folículo pré-ovulatório [11].

Portanto, o objetivo do presente estudo é avaliar, sob diferentes aspectos, os efeitos da exposição do SDHEA a células do *cumulus* utilizando o protocolo de desluteinização.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Pacientes e aspectos éticos

As amostras de células do *cumulus oophorus* foram obtidas de dez pacientes (com idade entre 25 a 45 anos) que realizaram FIV como tratamento para infertilidade na Clínica de Reprodução Assistida ProSer. A estimulação hormonal foi realizada de acordo com conduta médica independente desse estudo. Excluíram-se deste estudo pacientes portadoras da síndrome do ovário policístico (SOP) ou com número de folículos igual ou inferior a 3. Todas as pacientes que aceitaram participar deste estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (anexo B) para utilização de suas células foliculares.

Este trabalho está de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa envolvendo Seres Humanos (Resoluções 466/12 e 303/00 do Conselho Nacional de Saúde), e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (projeto nº 15-0288).

2.2.2 Punção ovariana e coleta de células do *cumulus oophorus*

As células do *cumulus* foram obtidas através do fluído folicular, o qual é aspirado transvaginalmente com o auxílio de monitoramento por ultrassonografia durante a punção folicular. Após o isolamento do complexo *cumulus*-oócito (CCO) e o desnudamento do gameta (ambos realizados por embriologistas e com protocolo independente deste estudo), esse fluido foi utilizado para obtenção das CCs. A partir deste fluido, então, as CCs foram ressuspendidas em 2 mL de meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) *high* glicose (D5796 – Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF) (Gibco) e 1% de antibiótico (kanamicina) (Gibco). A concentração de células foi determinada em câmara de Neubauer e as células foram semeadas em placas de 6 poços (Kasvi), contendo 2 mL de meio de cultivo por poço, em uma concentração de 8×10^4 células por poço.

2.2.3 Cultivo celular e tratamento experimental

As células recuperadas foram incubadas em estufa a temperatura de 37°C com 100% de umidade relativa do ar e 5% de concentração de CO₂. O meio utilizado para o cultivo foi o DMEM *high* glicose suplementado com 10% de SBF e 1% de antibiótico (kanamicina). Durante os primeiros quatro dias de cultivo (período de desluteinização [11]), as células foram mantidas em meio livre de hormônios, com troca diária do meio. No quarto dia, o grupo tratado foi exposto a 0,08 µM de SDHEA, enquanto que no grupo controle houve reposição do meio livre de hormônios. Os cultivos foram mantidos por oito dias, havendo, ainda, uma troca de meio para ambos os grupos no sexto dia, sendo que o grupo tratado recebeu meio suplementado com SDHEA (protocolo estabelecido por Schneider J. e colaboradores (dados ainda não publicados)).

2.2.4 Extração e quantificação de RNA total

O RNA total foi extraído no oitavo dia do cultivo celular. O meio de cultura presente em cada poço foi desprezado, e as células foram removidas da placa de cultura com o uso de 500 µL de tripsina por poço (Gibco). Após aproximadamente 10 min, adicionou-se 1 mL do meio de cultura descrito anteriormente. O volume total foi centrifugado a 500 rpm durante 6 min, e o sobrenadante desprezado. Por fim, a extração do RNA foi realizada com o kit *RNAqueous® total RNA isolation*, conforme o protocolo fornecido pelo fabricante (ThermoFischer). Após, as amostras de RNA total foram armazenadas a -80°C. A quantificação das amostras de RNA e seu nível de pureza foram determinados por espectrofotometria a 280 nm (NanoDrop, ND-2000).

2.2.5 Síntese de cDNA

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA total utilizando-se o oligonucleotídeo (*primer*) complementar à cauda poli-A característica do RNAm (RNA mensageiro) (Oligo (DT)₁₂₋₁₈), produzindo um cDNA predominantemente a partir de RNAm. A reação de síntese do cDNA foi realizada com o kit GoScript™ Reverse Transcription System, conforme protocolo fornecido pelo fabricante (PROMEGA).

2.2.6 Análise da expressão gênica por RT-qPCR

A análise da expressão gênica foi realizada utilizando os ensaios inventoriados da TaqMan® para os seguintes genes: rFSH (Hs00174865_m1), ERβ (Hs00230957_m1), VCAM1 (Hs01003372_m1), AR (Hs00171172_m1) e, como controle endógeno, HPRT1 (Hs02800695_m1) (Tabela 1). As reações de qPCR foram realizadas com a TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). As amostras de cDNA foram amplificadas pelo aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) em um volume total de 10 µL por reação, sendo 5 µL de Master Mix, 0,5 µL de sonda, 2,5 µL de H₂O e 2 µL de amostra diluída 1:5 para os genes FSHR, VCAM1 e AR, e 5 µL de Master Mix, 0,5 µL de sonda, 0,5 µL de H₂O e 4 µL de amostra diluída 1:5 para o gene ERβ. A amplificação das amostras de cDNA foi realizada em triplicata (FSHR, VCAM1 e AR) ou em duplicata (ERβ) em placas de 96 poços. A leitura da fluorescência emitida pelas sondas TaqMan® nas amostras foi feita ao final de cada ciclo, durante 40 ciclos. Antes da realização dos ensaios, foi feita a curva de padronização para cada gene analisado, com o objetivo de padronizar a diluição das amostras e determinar a eficiência das reações.

A quantificação das amostras de cDNA se baseou no método de comparação quantitativa ($\Delta\Delta C_T$), em que a expressão dos genes de interesse na amostra é comparada com a de uma amostra calibradora (que consiste de um *pool* de amostras controle). Com o objetivo de avaliar em quantas vezes a expressão gênica foi, ou não, alterada, tendo como base a reação da amostra calibradora normalizada pelo controle endógeno HPRT1, calculou-se o *fold change* (FC) com base na equação: $FC = 2^{-\Delta\Delta C_T}$. A partir desta comparação foi possível observar quantas vezes as amostras foram mais ou menos expressas em relação à amostra calibradora.

2.2.7 Dosagens bioquímicas

O sobrenadante do cultivo primário das células do cumulus foi coletado nos dias 1, 4, 6 e 8. A concentração de E₂, de P e de SDHEA foi determinada através de eletroquimioluminescência (ECL), de ECL competitiva e de imunensaio quimioluminescente de micropartículas Architect, respectivamente, utilizando kits comerciais Cobas e602, Cobas e601 e Ci4100 ABBOTT. Foram realizadas, também, dosagens hormonais do meio de cultura (sem cultivo celular), como forma de controlar possíveis interferências causadas por moléculas

que possam estar presentes no SBF. As dosagens foram realizadas pelo serviço de Bioquímica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

2.2.8 Análise Estatística

A normalidade dos dados foi verificada através do teste de Shapiro-Wilk. Após, os resultados de dosagens hormonais foram analisados pelo teste de Equações de Estimação Generalizadas (GEE), seguido do teste *post hoc* de Bonferroni para as comparações múltiplas, o qual reduz a possibilidade de ser encontrada uma significância ao acaso dos resultados. Para os resultados de expressão gênica, a análise foi feita com o teste não paramétrico de Wilcoxon. As análises estatísticas foram realizadas através do processador de dados SPSS 20.0 (Statistical Package for the Social Sciences) e considerou-se significância estatística quando $p \leq 0,05$.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Descrição das pacientes

A faixa etária das pacientes que participaram deste estudo foi de 25 a 45 anos, com média de $37,5 \pm 4,01$ anos (Tabela 2). O número de oócitos recuperados durante a punção folicular variou de 6 a 17 oócitos por paciente, com uma média de 12,1 oócitos por paciente ($\pm 3,51$) (Tabela 2). Essa grande variabilidade se deu devido a fatores individuais, que influenciam na resposta das pacientes à indução hormonal.

2.3.2 Dosagens hormonais do sobrenadante do cultivo celular de células do *cumulus* em estágio *early antral*

Os valores de SDHEA ($\mu\text{g/dL}$), de progesterona (ng/mL) e de estradiol (pg/mL), obtidos do sobrenadante do cultivo primário de células do *cumulus* (Figura 1) nos dias 1, 4, 6 e 8 estão representados nas tabelas 3, 4 e 5 e nas figuras 2, 3 e 4, respectivamente. O teste estatístico avaliou a interação das variáveis analisadas (tempo*grupo). Os resultados para SDHEA (Figura 2) demonstraram que houve maior concentração de SDHEA no grupo tratado em função do tempo ($p = 0,001$). Os resultados da secreção de estradiol, por sua vez, demonstraram que o tratamento com SDHEA alterou a secreção de estradiol em função do tempo ($p = 0,001$). Enquanto a secreção de progesterona não teve interação entre as variáveis ($p = 0,520$), havendo apenas variação de sua secreção função do tempo ($p = 0,001$).

Os níveis de SDHEA se mostraram elevados em ambos os grupos no dia 1 (Figura 2). No dia 4, no entanto, foi vista uma redução da concentração de SDHEA no sobrenadante celular de ambos os grupos. Nos dias 6 e 8 estes baixos níveis hormonais mantiveram-se constantes no grupo controle, mas, por outro lado, aumentaram significativamente no grupo tratado, uma vez que houve administração de SDHEA a este grupo.

Altos níveis de secreção de progesterona (Figura 3) foram observados no dia 1 nos grupos controle e tratado que se mantiveram semelhantes no dia 4. Nos dias 6 e 8 foi observado um aumento nos níveis de progesterona para ambos os grupos, não apresentando diferença entre o grupo controle e tratado.

Os níveis de estradiol (Figura 4) no dia 1 mostraram-se elevados para ambos os grupos. No dia 4 estes níveis reduziram-se significativamente em relação ao dia 1 em ambos os grupos. No grupo tratado ocorreu aumento dos níveis de estradiol nos dias 6 e 8, que se assemelharam aos valores observados no dia 1. O grupo controle apresentou níveis de estradiol reduzidos nos dias 6 e 8 em relação ao tratado, embora estes valores tenham sido maiores do que os observados no dia 4.

2.3.3 Análise da expressão gênica por RT-qPCR

Os valores de expressão gênica estão representados na Tabela 6 e na Figura 5. A expressão dos genes *rFSH*, *AR* e *ERβ* não foi alterada com a presença do hormônio DHEA, conforme representado na figura 4. A expressão do gene *VCAM-1*, por sua vez, apresentou uma redução no grupo tratado.

2.4 DISCUSSÃO

Nosso estudo demonstrou que o SDHEA foi capaz de aumentar os níveis de estradiol em células do *cumulus* de estágio *early antral*, o que demonstra seus efeitos positivos sobre o ambiente folicular, embora não tenha modulado os níveis de progesterona. Além disto, o SDHEA não alterou a expressão dos genes *rFSH*, *ERβ* e *AR*, no entanto reduziu a expressão do gene *VCAM-1*. O SDHEA foi utilizado neste trabalho com base em evidências que demonstram a eficácia clínica da suplementação oral de pacientes com DHEA em aumentar a responsividade ovariana, especialmente em pacientes com reserva ovariana diminuída. Estudos apontam que a administração de DHEA, em mulheres que realizam TRAs, eleva as taxas de gravidez [6,12], reduz a quantidade de gonadotrofinas necessárias para a indução hormonal ovariana e aumenta o número de oócitos recrutados, provavelmente por uma ação no recrutamento folicular. A influência da DHEA nestes aspectos sugere sua ação no microambiente folicular, embora se desconheça o mecanismo pelo qual este hormônio interfere nos resultados das TRAs. Em cerca de 1/3 das clínicas de reprodução assistida no mundo este hormônio é administrado às pacientes com a intenção de aumentar as taxas de sucesso na fertilização, o que torna importante o conhecimento do mecanismo pelo qual a DHEA atua no ambiente ovariano [4].

Conforme demonstrado por Gleicher *et al*, em 2011, os androgênios, como o SDHEA, desempenham seus principais efeitos quando dos estágios iniciais do desenvolvimento folicular, como por exemplo em folículos pré-antrais ou antrais, contribuindo assim com a maturação folicular [13]. Para avaliar os efeitos da DHEA sobre o folículo ovariano é necessário utilizar células que o compõe, como as células foliculares. Porém a obtenção destas células a partir de técnicas de reprodução assistida, faz com que estas encontrem-se em estágio luteinizado (após indução hormonal das pacientes). E devido à importância de se estudar os efeitos do SDHEA no ambiente folicular em estágios da foliculogênese anteriores à luteinização, nosso estudo baseou-se no protocolo desenvolvido por Ophir *et al* em 2014. Este protocolo tem a finalidade de favorecer a desluteinização das células foliculares [11]. A partir disto, estas células cultivadas, inicialmente em estágio luteinizado, diferenciam-se em células semelhantes às do estágio *early antral* não luteinizado, pertencentes ao folículo antral [11]. Desta forma, o protocolo de desluteinização restaura a responsividade das células foliculares às gonadotrofinas, a qual é perdida quando células luteinizadas são cultivadas *in vitro* [11].

Devido ao fato de a concentração de SDHEA na circulação feminina ser em torno de 10 μM , sendo cerca de 250 vezes maior do que a de DHEA, que é aproximadamente 30 nM, além de seu tempo de meia vida ser mais longo (10 – 20 horas) em comparação ao tempo de meia vida da DHEA (1 – 3 horas), nosso estudo optou pela utilização da suplementação com SDHEA [14,15]. Com base em estudos anteriores realizados por Schneider, J. e colaboradores (dados ainda não publicados), a dose de SDHEA utilizada neste estudo foi 0,08 μM . Grande parte dos estudos que realizaram suplementação com DHEA utilizaram doses diárias de 75 mg cerca de 3 a 4 meses antes da indução hormonal para realização de FIV/ICSI [6,16,17]. Embora a dose utilizada nestes estudos tenha sido inúmeras vezes superior à dose de SDHEA utilizada em nosso estudo, este hormônio irá sofrer metabolização de primeira passagem no fígado, o que irá reduzir em muitas vezes a concentração inicial administrada, sendo que uma quantidade hormonal muito menor alcançará os tecidos alvos (neste caso, o tecido ovariano) [18]. Contudo, uma vez que nosso estudo é realizado *in vitro*, não ocorre metabolismo de primeira passagem, o que permite que a dose hormonal de exposição do SDHEA às células do *cumulus* seja de 0,08 μM .

Como não houve administração de SDHEA durante os quatro primeiros dias de cultivo celular, seus níveis elevados no dia 1 são encontrados devido à presença desse hormônio no fluido folicular coletado. Uma vez que as células da teca e da granulosa produzem SDHEA durante a foliculogênese, este hormônio está presente no microambiente folicular no momento da punção ovariana [17]. No dia 4, no entanto, há redução da concentração de SDHEA no sobrenadante celular de ambos os grupos. Isto ocorre em decorrência da troca diária de meio nos quatro primeiros dias de cultivo, mostrando não haver produção endógena significativa de SDHEA pelas células do *cumulus*. Desta forma, nos dias 6 e 8 estes baixos níveis hormonais mantiveram-se constantes no grupo controle e, por outro lado, aumentaram significativamente no grupo tratado, uma vez que houve administração de SDHEA a este grupo.

Os níveis de secreção de progesterona mostraram-se elevados durante os 8 dias de cultivo celular nos dois grupos experimentais (controle e tratado), revelando que a secreção de progesterona pelas células do *cumulus* não varia devido à exposição ao SDHEA. O aumento da secreção de progesterona observado nos dias 6 e 8 de cultivo celular não é característico do estágio da foliculogênese que foi testado em nosso estudo (*early antral*). No entanto, este aumento de progesterona visto nesses dois dias pode estar relacionado com o aumento do

número de células nestes dias, observado visualmente, sendo a quantidade celular nos dias 6 e 8 maior do que nos dias 1 e 4.

Os níveis de estradiol de mulheres na iminência da ovulação podem variar de 250 a 2000 pg/mL [19]. Os valores encontrados em nosso trabalho no dia 1 de cultivo celular (quando as células estão luteinizadas) estão dentro desta faixa e, após os 4 dias de desluteinização celular, estes valores caem drasticamente, como pode ser observado na tabela 5. Os baixos níveis de estradiol encontrados em nosso estudo para o dia 4 estão de acordo com a desluteinização das células do *cumulus*, visto que no estágio semelhante ao *early antral* os níveis deste hormônio são baixos, e alcançam um pico no período de luteinização [20]. O aumento de estradiol no grupo controle observado nos dias 6 e 8 pode ser explicado pela produção endógena do hormônio nas células do *cumulus*, que proliferaram durante o tempo de cultivo, uma vez que esse grupo não recebeu tratamento hormonal.

Além disto, o presente trabalho permitiu a observação de que as células do *cumulus* expostas ao SDHEA apresentaram maior secreção de estradiol do que as não expostas. O aumento desta secreção pode estar relacionado ao mecanismo pelo qual a DHEA é capaz de aumentar o número de oócitos recrutados nas TRAs, uma vez que os hormônios estrogênicos, principalmente o β -estradiol, desempenham funções indispensáveis ao funcionamento do sistema reprodutor feminino [8]. Estes hormônios atuam de forma indireta sobre a foliculogênese e sobre o desenvolvimento do oócito, uma vez que controlam a liberação de FSH e de LH (hormônio luteinizante) (altos níveis de estrogênio induzem a liberação de LH) por *feedback* na hipófise anterior [20,21]. O estrogênio aumenta a expressão de receptores de FSH nas células, o que favorece a ação desta gonadotrofina, além de estimular a proliferação das células do *cumulus in vivo* [8]. Os estrogênios são produzidos nos ovários pelas células da granulosa por ação da enzima aromatase, e, como no presente estudo há aumento de estradiol após o tratamento com SDHEA, supõe-se que as células do *cumulus* expressem esta enzima [22]. Portanto, os maiores níveis de secreção de estradiol pelas células tratadas com SDHEA podem estar relacionados ao fato de o estradiol favorecer que os folículos recrutados assumam dominância. Assim, pode-se pensar que o mecanismo pelo qual o SDHEA aumente o número de oócitos seja pelos altos níveis de estradiol por ele gerado, permitindo que inúmeros folículos assumam dominância concomitantemente no momento da indução ovariana hormonal. Deste modo, conseqüentemente, o uso de SDHEA elevaria o número de oócitos recrutados através da

indução hormonal, fato este que corrobora com os dados encontrados em estudos de suplementação oral com DHEA [23].

Os resultados obtidos com os ensaios de expressão gênica demonstram que os genes *rFSH*, *AR* e *ERβ* não apresentaram uma expressão significativamente diferente entre os grupos controle e o exposto ao SDHEA. Uma vez que estes genes codificam receptores de hormônios que são importantes para a foliculogênese, sua avaliação representa, de forma indireta, uma forma de análise da qualidade folicular.

Os resultados obtidos através do estudo desenvolvido por Ekart *et al*, em 2012, corroboram com os encontrados em nosso trabalho, em que o nível de expressão de rFSH nas células do *cumulus* não apresentou alterações conforme a exposição ao SDHEA. No entanto, nosso estudo demonstrou que o SDHEA aumenta a secreção de estradiol, sugerindo ser este um dos mecanismos pelo qual o SDHEA influencia positivamente na qualidade folicular. Da mesma forma, Ekart *et al*, demonstraram que a expressão isolada de rFSH nas células do *cumulus* não apresentou associação com a qualidade do oócito, embora a análise em conjunto deste e de outros genes apresentou correlação à qualidade oocitária [24]. Portanto, embora o SDHEA não tenha alterado os níveis de transcrição do *rFSH* de forma isolada, isso não significa que sua suplementação não possa interferir na qualidade do oócito, visto que a análise de outros genes são necessárias para determinar a qualidade oocitária.

Assidi *et al*, 2011, realizaram um estudo com o objetivo de selecionar possíveis biomarcadores presentes nas CCs que indicassem competência oocitária. Dentre inúmeros genes avaliados por qPCR, a expressão de *AR* foi positivamente associada a maiores taxas de gravidez. Desta forma, é possível supor que níveis inferiores de *AR* minimizam a ação dos hormônios androgênicos, prejudicando o desenvolvimento folicular, o que impede que as taxas de fertilização sejam positivas [25]. No entanto, o tratamento com SDHEA não foi capaz de modular os níveis de transcrição do gene *AR* em células do *cumulus*; porém, a exposição das células a este hormônio elevou a secreção de estradiol, o que nos permite inferir que ele atua, de forma indireta, no microambiente folicular, uma vez que os androgênios são convertidos em estrogênios. Desta forma, mesmo que não se tenha observado diferença na expressão deste gene, fica implícito o efeito indireto do SDHEA sobre as células do *cumulus* através da produção de estradiol.

O *ERβ* é expresso em maior quantidade no ovário (células da granulosa, células da teca, corpo lúteo e oócito) do que em outros órgãos do organismo feminino. Estudos demonstram

sua contribuição mais direta com o desenvolvimento ovariano quando comparado com o ER α . Os níveis do ER β estão associados indiretamente ao desenvolvimento folicular, uma vez que estudos realizados em camundongos ER β *knockout* revelaram que os animais do experimento apresentaram atraso na foliculogênese e disfunções ovarianas [26]. Nossos resultados demonstraram que o SDHEA não alterou a expressão gênica do ER β , porém nosso N para análise deste gene foi de apenas 4 pacientes. Este N amostral foi baixo se comparado ao N de 10 pacientes para análise da expressão dos outros genes neste estudo. Com isso, seria necessário um N maior para indicar com maior precisão os efeitos do SDHEA sobre a expressão do ER β . Além disto, como o SDHEA eleva a secreção de estradiol e uma vez que este hormônio se liga ao ER β , pode ocorrer *downregulation* na expressão deste receptor, devido a maior quantidade de hormônio atuando de forma autócrina nas células do *cumulus*. Esta hipótese sugere que o nível de expressão de ER β no grupo tratado poderia se apresentar semelhante ao controle, em função da maior secreção de estradiol.

Diferentemente dos outros genes avaliados, o nível de expressão do VCAM-1 apresentou-se diminuído no grupo exposto ao SDHEA. Beninfla *et al*, em 2001, demonstraram haver correlação entre os níveis de VCAM-1 (forma solúvel da proteína) no fluido folicular nas fases tardias do desenvolvimento folicular e maiores taxas de fertilização. Este dado demonstra que os níveis proteicos de VCAM-1 podem estar associados à qualidade folicular, uma vez que o aumento de sua síntese está correlacionado a um aumento nas taxas de fertilização [27]. Porém além de Beninfla *et al* terem avaliado a expressão proteica de VCAM-1, enquanto nosso estudo avaliou a expressão gênica, os maiores níveis de VCAM-1 encontrados por este autor ocorrem em fases mais tardias do desenvolvimento folicular, enquanto nosso estudo avaliou o estágio *early antral*.

Com base em nossos resultados conclui-se que o SDHEA, no modelo experimental proposto, não modulou a secreção de progesterona, assim como não alterou a expressão dos genes avaliados *rFSH*, *AR* e *ER β* nestas células, embora o nível de expressão de VCAM-1 tenha reduzido no grupo tratado. Estudos futuros são necessários para compreender melhor os efeitos do SDHEA sobre os níveis destes genes. No entanto, o SDHEA foi capaz de aumentar significativamente a secreção de estradiol em células do *cumulus*, e uma vez que este hormônio é fundamental à função ovariana, pode ser um dos mecanismos envolvidos no efeito positivo da administração de SDHEA observado na clínica.

FIGURAS

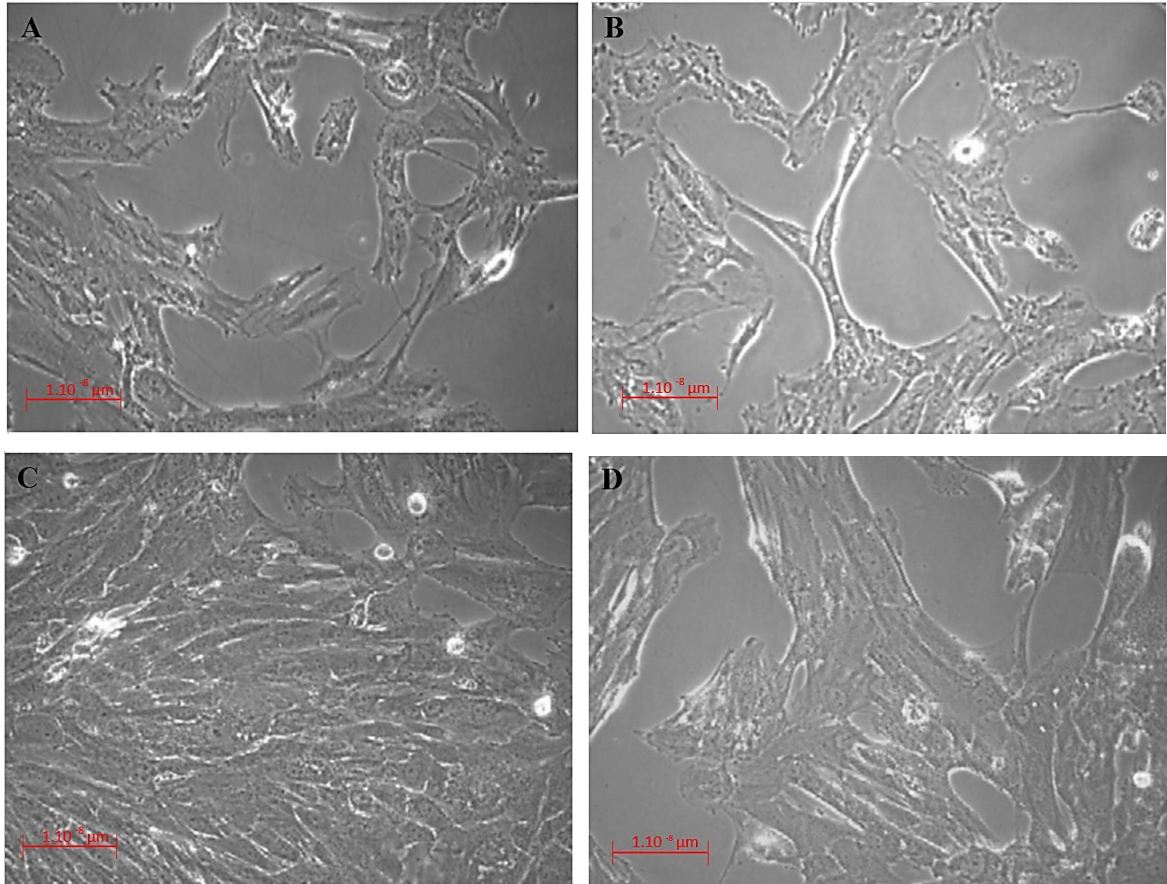


Figura 1: Imagens do cultivo de células do *cumulus* através do protocolo de desluteinização. Microscopia óptica do microscópio Olympus CKX41. **A e C** - Cultivo primário de células do *cumulus* em estágio *early antral* do grupo controle nos dias 4 e 8, respectivamente. **B e D** - Cultivo primário de células do *cumulus* em estágio *early antral* do grupo tratado nos dias 4 e 8, respectivamente.

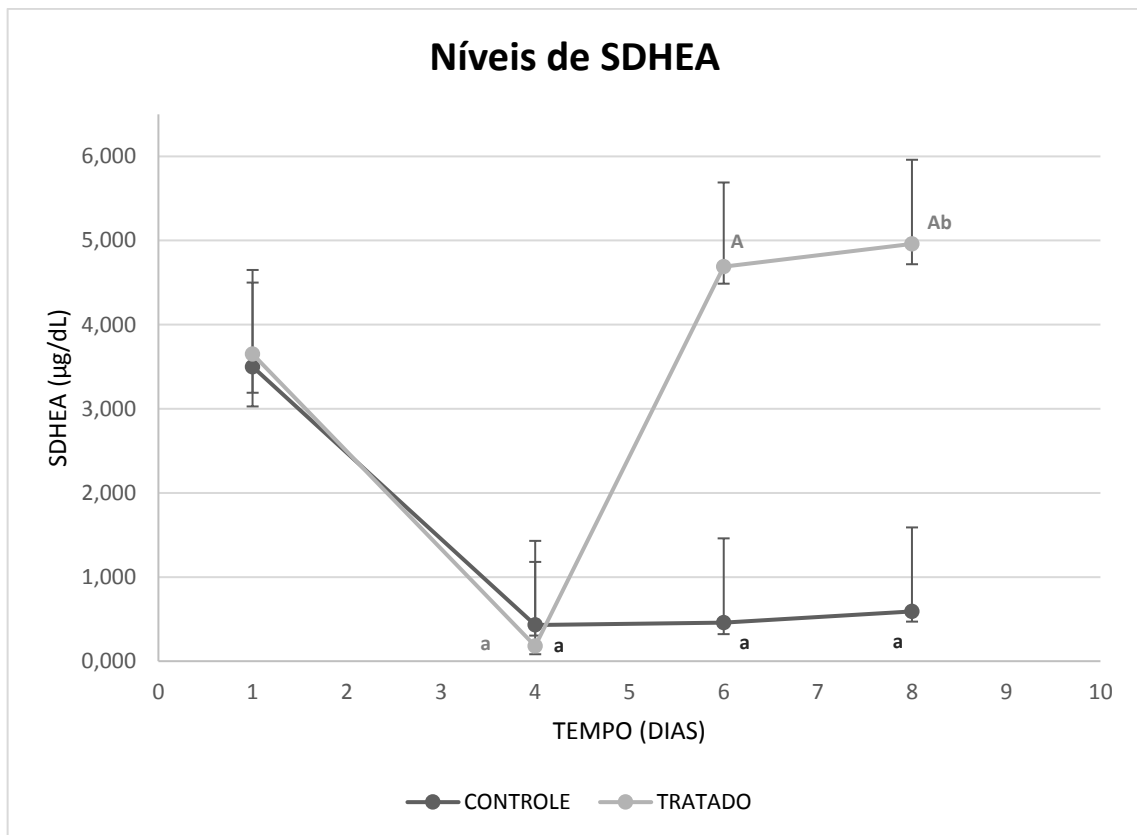


Figura 2: Valores de SDHEA, em $\mu\text{g/dL}$, do sobrenadante das células do *cumulus oophorus* (CCs) no estágio *early antral*, nos dias 1, 4, 6 e 8 de cultivo celular, nos grupos controle e tratado (com SDHEA). Dados expressos em média \pm erro padrão. A: indica diferença significativa entre os grupos controle e tratado ($p \leq 0,05$). a: indica diferença significativa em relação ao dia 1 ($p \leq 0,05$). b: indica diferença significativa em relação ao dia 1 [$p \leq 0,05$]. N=10 (controle); N=10 (tratado).

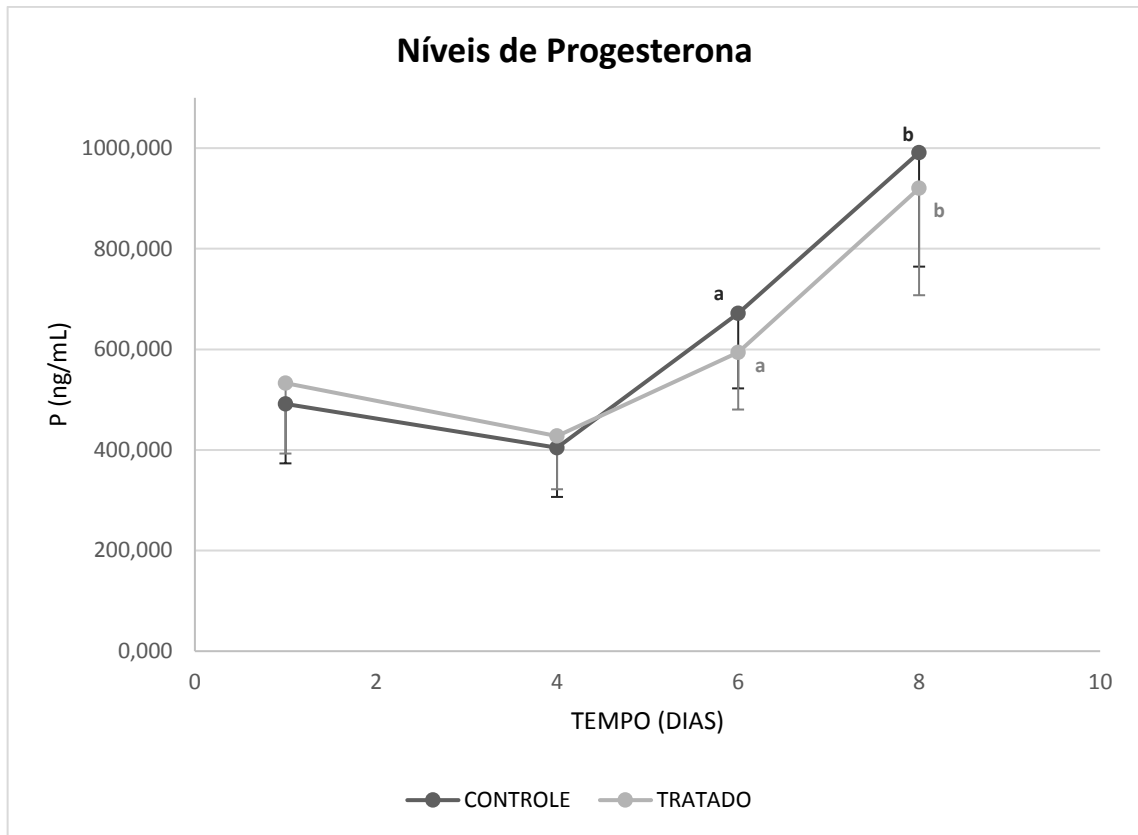


Figura 3: Valores de progesterona, em ng/mL, do sobrenadante das células do *cumulus oophorus* (CCs) no estágio *early antral*, nos dias 1, 4, 6 e 8 de cultivo celular, nos grupos controle e tratado (com SDHEA). a: indica diferença significativa entre os dias 4 e 6 ($p \leq 0,05$). b: indica diferença significativa do dia 8 em relação aos dias 1 e 4 ($p \leq 0,05$). Dados expressos em média \pm erro padrão. N= 10 (controle); N= 10 (tratado).

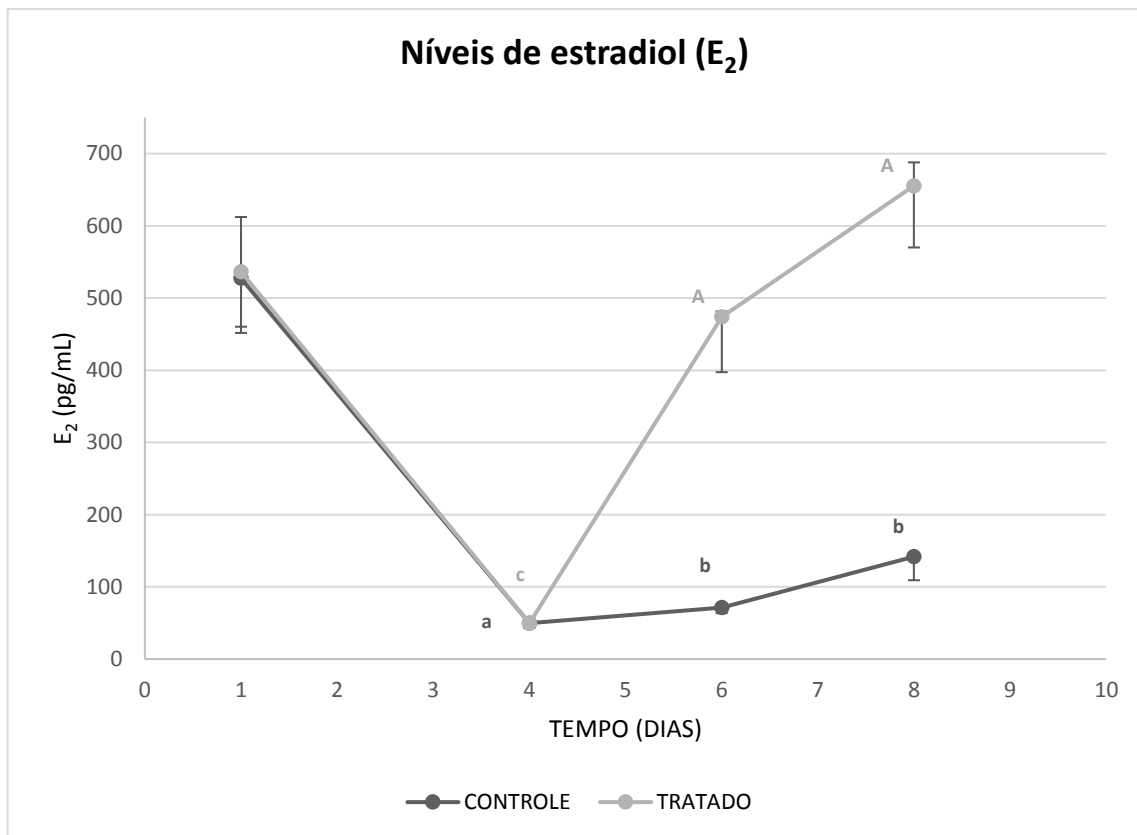


Figura 4: Valores de estradiol (E₂), em pg/mL, do sobrenadante das células do *cumulus oophorus* (CCs) no estágio *early antral*, nos dias 1, 4, 6 e 8 de cultivo celular, nos grupos controle e tratado (com SDHEA). Dados expressos em média \pm erro padrão. A: indica diferença significativa entre os grupos controle e tratado ($p \leq 0,05$). a: indica diferença significativa entre os dia 1 e 4 do grupo controle ($p \leq 0,05$). b: indica diferença significativa dos dias 6 e 8 em relação ao dia 4 ($p \leq 0,05$). c: indica diferença significativa do dia 4 para os dias 1, 6 e 8 ($p \leq 0,05$). N=10 (controle); N=10 (tratado).

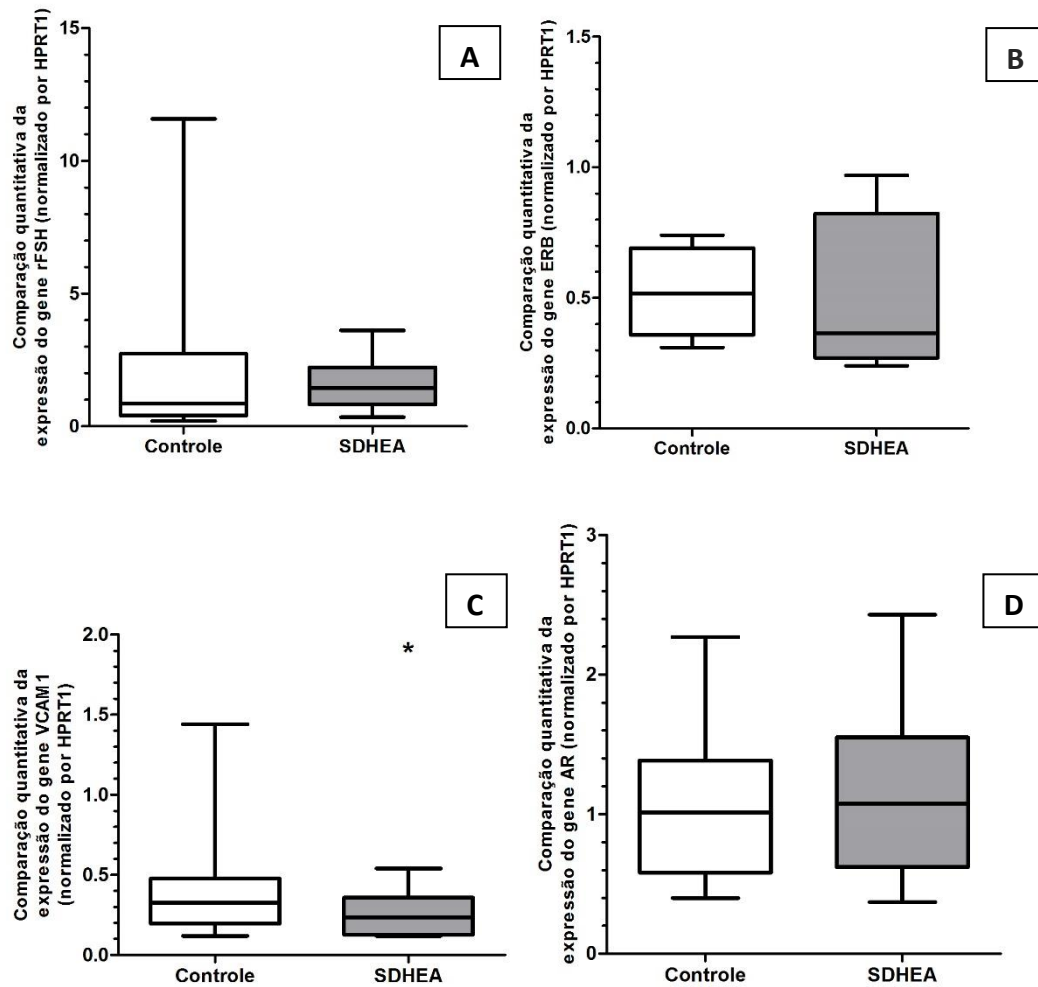


Figura 5: Valores de *fold change* dos genes rFSH (figura A), ERβ (figura B), VCAM1 (figura C) e AR (figura D) para os grupos controle e tratado. Dados expressos em mediana e intervalo interquartil (25-75%)*, * significância estatística entre os grupos controle e tratado, $p \leq 0,05$.

TABELAS

Tabela 1: Características dos genes de interesse e do gene normalizador.

Sigla do Gene	Nome	Localização cromossômica	Função
<i>HPRT1</i>	Hipoxantina Fosforibosil-Transferase 1	Xq26.1	Via metabólica de recuperação das purinas
<i>rFSH</i>	Receptor de FSH	2p21-p16	Ação do FSH
<i>VCAM1</i>	Molécula de Adesão Celular Vascular 1	1p32-p31	Mediação da adesão das células brancas sanguíneas
<i>AR</i>	Receptor de Androgênio	Xq12	Ação dos androgênios
<i>Erβ (ESR2)</i>	Receptor β de Estrogênio	14q23.2	Ação dos estrogênios

Tabela 2: Informações da idade, número de oócitos recuperados e tipo de protocolo de indução hormonal utilizado pelas pacientes que aceitaram participar deste estudo.

Paciente	Idade	Número de oócitos recuperados
1	36	12
2	40	6
3	29	11
4	35	14
5	36	13
6	42	15
7	43	7
8	36	15
9	39	17
10	38	11
Média	37,5 ± 4,01	12,1 ± 3,51

Tabela 3: Valores de SDHEA, em $\mu\text{g/dL}$, do sobrenadante das células do *cumulus oophorus* (CC) em estágio *early antral*, nos dias 1, 4, 6 e 8 de cultivo celular, nos grupos controle e tratado (com SDHEA). Dados expressos em média \pm erro padrão.

	Grupo	SDHEA				
		N	Dia 1	Dia 4	Dia 6	Dia 8
<i>CC early antral</i>	Controle	10	3,5 \pm 0,47	0,43 \pm 0,13 ^a	0,46 \pm 0,14 ^a	0,59 \pm 0,12 ^a
	Tratado	10	3,65 \pm 0,46	0,18 \pm 0,10 ^a	4,69 \pm 0,20 ^A	4,96 \pm 0,24 ^{Ab}

^a: indica diferença significativa em relação ao dia 1 ($p \leq 0,05$). ^b: indica diferença significativa em relação ao dia 1 ($p \leq 0,05$).

^A: indica diferença significativa entre os grupos controle e tratado ($p \leq 0,05$).

Tabela 4: Valores de progesterona, em ng/mL , do sobrenadante das células do *cumulus oophorus* (CC) em estágio *early antral*, nos dias 1, 4, 6 e 8 de cultivo celular, nos grupos controle e tratado (com SDHEA). Dados expressos em média \pm erro padrão.

	Grupo	Progesterona				
		N	Dia 1	Dia 4	Dia 6	Dia 8
<i>CC early antral</i>	Controle	10	491,85 \pm 118,50	404,45 \pm 97,83	671,45 \pm 149,04 ^a	991,35 \pm 226,92 ^b
	Tratado	10	532,95 \pm 140,07	427,6 \pm 105,72	594,05 \pm 113,70 ^a	920,3 \pm 212,70 ^b

^a: indica diferença significativa entre os dias 4 e 6 ($p \leq 0,05$). ^b: indica diferença significativa do dia 8 em relação aos dias 1 e 4 ($p \leq 0,05$).

Tabela 5: Valores de estradiol (E_2), em pg/mL, do sobrenadante das células do *cumulus oophorus* (CC) em estágio *early antral*, nos dias 1, 4, 6 e 8 de cultivo celular, nos grupos controle e tratado (com SDHEA). Dados expressos em média \pm erro padrão.

	Grupo	E_2				
		N	Dia 1	Dia 4	Dia 6	Dia 8
<i>CC early antral</i>	Controle	10	527,34 \pm 75,62	49,78 \pm 5,88 ^a	71,38 \pm 7,89 ^b	141,67 \pm 32,48 ^b
	Tratado	10	536,61 \pm 76,35	49,65 \pm 6,0 ^c	473,76 \pm 76,43 ^A	655,42 \pm 85,37 ^A

^a: indica diferença significativa entre os dia 1 e 4 do grupo controle ($p \leq 0,05$). ^b: indica diferença significativa dos dias 6 e 8 em relação ao dia 1 e 4 ($p \leq 0,05$). ^c: indica diferença significativa do dia 4 para os dias 1, 6 e 8 no grupo tratado ($p \leq 0,05$). ^A: indica diferença significativa entre os grupos controle e tratado ($p \leq 0,05$).

Tabela 6: Comparação quantitativa entre a expressão dos genes alvo (*rFSH*, *VCAM-1*, *AR* e *ER β*) normalizados pela expressão do controle endógeno (*HPRT1*). Dados expressos em mediana e intervalo interquartil (25-75%). N = 10 (*rFSH*, *VCAM-1* e *AR*) e N = 4 (*ER β*).

	Grupos	Expressão gênica			
		<i>rFSH</i>	<i>ERβ</i>	<i>VCAM1</i>	<i>AR</i>
<i>CC early antral</i>	Controle	0,86 (0,40 – 2,74)	0,52 (0,36 – 0,7)	0,33 (0,2 – 0,48) ^A	1,01 (0,6 – 1,4)
	Tratado	1,44 (0,82 – 2,22)	0,36 (0,27 – 0,82)	0,23 (0,3 – 0,36)	1,07 (0,62 – 1,55)

^A indica diferença significativa entre os grupos controle e tratado ($p \leq 0,05$).

REFERÊNCIAS

1. NARDELLI, A.A.; STAFINSKI, T.; et al. Assisted reproductive technologies (ARTs): Evaluation of evidence to support public policy development. **Reproductive Health**, p. 1–14, 2014.
2. DATTA, J.; PALMER, M.J.; et al. Prevalence of infertility and help seeking among 15 000 women and men. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 31, n. 9, p. 2108–18, 2016.
3. UYAR, A.; et al. Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality. **Fertility and Sterility**, v. 99, n. 4, p. 979–997, 2013.
4. GLEICHER, N.; BARAD, D.H.; Dehydroepiandrosterone (DHEA) supplementation in diminished ovarian reserve (DOR). **Reproductive biology and endocrinology: RB&E**, p. 1–12, 2011.
5. CASSON, P.R.; LINDSAY, M.S.; et al. Dehydroepiandrosterone supplementation augments ovarian stimulation in poor responders : a case series. **Human Reproduction**, v. 15, n. 10, p. 2129–2132, 2000
6. FOUANY, M.R.; SHARARA, F.I. Is there a role for DHEA supplementation in women with diminished ovarian reserve? **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 30, n. 9, p. 1239–1244, 2013
7. WALTERS, K.A. Role of androgens in normal and pathological ovarian function. **Reproduction**, v. 149, n. 4, p. R193–R218, 2015.
8. JAMNONGJIT, M.; HAMMES, S.R. Ovarian steroids: The good, the bad, and the signals that raise them. **Cell Cycle**, v. 5, n. 11, p. 1178–1183, 2006.
9. BAYASULA, A.I.; KIYONO, T.; et al. Establishment of a Human Nonluteinized Granulosa Cell Line that Transitions from the Gonadotropin-Independent to te Gonadotropin-Dependent Status. v. 153, n. June 2012, p. 2851–2860, 2012.
10. GILCHRIST, R.B.; RITTER, L.J.; et al. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Animal Reproduction Science**, v. 82–83, p. 431–446, 2004.
11. OPHIR, L.; YUNG, Y.; et al. Establishment and validation of a model for non-luteinized human mural granulosa cell culture. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 384, n. 1–2, p. 165–174, 2014.
12. SCIARD, C.; BERTHILLER, J.; et al. Preliminary Results of DHEA in Poor Responders in IVF. **Journal of Obstetrics and Gynecology**, n. June, p. 396–403, 2016.
13. GLEICHER, N.; WEGHOFER, A.; ET AL. The role of androgens in follicle

maturation and ovulation induction: friend or foe of infertility treatment?

Reproductive biology and endocrinology : RB&E, v. 9, n. 1, p. 116, 2011.

14. KROBOTH, P.D.; SALEK, F.S.; et al. DHEA and DHEA-S : **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 39, p. 327–348, 1999.
15. WARNER, M.; GUSTAFSSON, J.A. DHEA - A precursor of ER β ligands. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 145, p. 245–247, 2015.
16. GLEICHER, N.; RYAN, E.; et al. Miscarriage rates after dehydroepiandrosterone (DHEA) supplementation in women with diminished ovarian reserve: a case control study. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 7, n. 1, p. 108, 2009.
17. FORD, J.H. Reduced quality and accelerated follicle loss with female reproductive aging - does decline in theca dehydroepiandrosterone (DHEA) underlie the problem ? **Journal of biomedical science**, p. 1–9, 2013.
18. TANIGUCHI, C.; GUENGERICH, F.P. Metabolismo dos fármacos. **Princípios de farmacologia - A base fisiopatológica da farmacoterapia**, p. 46–57, 2009.
19. KETHA, H.; GIRTMAN, A.; et al. Estradiol assays - The path ahead. **Steroids**, n. Part A, p. 39–44, 2015.
20. MELLO AIRES, M. de **FISIOLOGIA 4ª EDIÇÃO**. 2012.
21. HUYNH, K.; JONES, G.; et al. Estrogen is not directly required for oocyte developmental competence. **Biology of reproduction**, v. 70, n. 5, p. 1263–1269, 2004.
22. LAVEN, J.S.E.; FAUSER, B.C.J.M. What role of estrogens in ovarian stimulation. **Maturitas: The European Menopause Journal**, v. 54, n. 4, p. 356–362, 2006.
23. GARZO, V.G.; DORRINGTON, J.H. Aromatase activity in human granulosa cells during follicular development and the modulation by follicle-stimulating hormone and insulin. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 148, n. 5, p. 657–662, 1984.
24. EKART, J.; MCNATTY, K.; et al. Ranking and selection of MII oocytes in human ICSI cycles using gene expression levels from associated cumulus cells. **Human Reproduction**, v. 28, n. 11, p. 2930–2942, 2013.
25. ASSIDI, M.; MONTAG, M.; et al. Biomarkers of human oocyte developmental competence expressed in cumulus cells before ICSI: A preliminary study. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 28, n. 2, p. 173–188, 2011.
26. DRUMMOND, A.E.; FULLER, P.J. The importance of ER β signalling in the ovary. **Journal of Endocrinology**, v. 205, n. 1, p. 15–23, 2010.

27. BENIFLA, J.L.; BRINGUIER, A F.; ET AL. Vascular endothelial growth factor, platelet endothelial cell adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in the follicular fluid of patients undergoing IVF. **Human reproduction Oxford England**, v. 16, n. 7, p. 1376–1381, 2001.

3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

3.1 Conclusões

Com base nos resultados encontrados para os níveis de estradiol no dia 4 de cultivo, em que houve uma considerável redução em comparação ao dia 1, nosso estudo confirma que o protocolo de desluteinização proposto por Ophir *et al* foi capaz de simular *in vitro* o estágio *early antral* do desenvolvimento folicular.

A exposição celular ao SDHEA modula positivamente a secreção de estradiol e, uma vez que este hormônio é fundamental à função ovariana, seu aumento pode ser um dos possíveis mecanismos para explicar o efeito positivo da administração do SDHEA observado na clínica.

O SDHEA não alterou a secreção celular de progesterona, o que sugere que o mecanismo de ação do SDHEA não está associado à modulação dos níveis deste hormônio.

A exposição celular ao SDHEA não modificou a expressão dos genes *rFSH*, *AR* e *ERβ*; no modelo experimental utilizado.

O tratamento com SDHEA reduziu os níveis de expressão do *VCAM-1*, comparado ao grupo controle.

3.2 Perspectivas

Até o presente momento, não se tem conhecimento sobre outros estudos que tenham avaliado o efeito do SDHEA *in vitro* em células foliculares de estágio *early antral*, porém são necessários estudos em outros estágios do desenvolvimento folicular que demonstrem de forma mais ampla o efeito da SDHEA no sistema reprodutor feminino, especialmente em células foliculares. Portanto, como perspectivas para este trabalho, tem-se a avaliação da expressão de do gene *CYP19A1* através de RT-qPCR, após exposição das células do *cumulus* em estágio *early antral* ao SDHEA, como também a avaliação do nível proteico de rFSH, AR, ERβ, CYP19A1, e especialmente do VCAM-1.

BIBLIOGRAFIA ADICIONAL

- AGARWAL, A.; ALLAMANENI, S. S. R. **Artificial Insemination**, v. 36, p. 539–548, 2007.
- ATEF, A. *et al.* The potential role of gap junction communication between cumulus cells and bovine oocytes during in vitro maturation. ***Molecular Reproduction and Development***, v. 71, n. 3, p. 358–367, 2005.
- CHANG, M. C. Fertilization of rabbit ova in vitro. ***Nature***, v. 184, p. 466–467, 1959.
- CHAVES, R. N. *et al.* Sistemas de cultivo in vitro para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos. ***Rev. Bras. Reprod. Anim.***, v. 34, p. 37–49, 2010.
- CILLO, F. *et al.* Association between human oocyte developmental competence and expression levels of some cumulus genes. ***Reproduction***, v. 134, n. 5, p. 645–650, 2007.
- COUSE, J. F. *et al.* Estrogen receptor- β is critical to granulosa cell differentiation and the ovulatory response to gonadotropins. ***Endocrinology***, v. 146, n. 8, p. 3247–3262, 2005.
- DIAZ, F. J.; WIGGLESWORTH, K.; EPPIG, J. J. Oocytes determine cumulus cell lineage in mouse ovarian follicles. ***Journal of cell science***, v. 120, n. Pt 8, p. 1330–1340, 2007.
- DZIK, A.; FERNANDES DONADIO, N.; CAVAGNA, M. *Atlas de Reprodução Assistida*. São Paulo, 2012.
- FINDLAY, J. K. *et al.* Ovarian physiology : follicle development , oocyte and hormone relationships. ***Animal Reproduction***, v. 6, n. 1, p. 16–19, 2009.
- FORNARO, F. *et al.* Effects of gonadotropin-releasing hormone agonist/recombinant follicle-stimulating hormone versus gonadotropin-releasing hormone antagonist/recombinant follicle-stimulating hormone on follicular fluid levels of adhesion molecules during in vitro fertiliza. ***Fertility and Sterility***, v. 87, n. 1, p. 39–47, 2007.
- FRAGOULI, E.; LALIOTI, M. D.; WELLS, D. The transcriptome of follicular cells : biological insights and clinical implications for the treatment of infertility. ***Human Reproduction Update***, v. 20, n. 1, p. 1–11, 2014.
- GERVÁSIO, C. G. *et al.* The role of androgen hormones in early follicular development. ***ISRN obstetrics and gynecology***, v. 2014, p. 818010, 2014.
- GROMOLL, J. *et al.* Functional and clinical consequences of mutations in the FSH receptor. ***Molecular and Cellular Endocrinology***, v. 125, n. 1–2, p. 177–182, 1996.
- GROMOLL, J.; SIMONI, M. Genetic complexity of FSH receptor function. ***Trends in Endocrinology and Metabolism***, v. 16, n. 8, p. 368–373, 2005.
- INHORN, M. C.; PATRIZIO, P. Infertility around the globe: New thinking on gender,

reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Human Reproduction Update*, v. 21, n. 4, p. 411–426, 2014.

KAMEL, R. M. Assisted reproductive technology after the birth of Louise Brown. *Journal of Reproduction and Infertility*, v. 14, n. 3, p. 96–109, 2013.

KHAMSI, F.; ROBERGE, S. Granulosa cells of the cumulus oophorus are different from mural granulosa cells in their response to gonadotrophins and IGF-I. *Journal of Endocrinology*, v. 170, n. 3, p. 565–573, 2001.

KIM, E. *et al.* Correlation between Expression of Glucose Transporters in Granulosa Cells and Oocyte Quality in Women with Polycystic Ovary Syndrome. *Endocrinology and metabolism (Seoul, Korea)*, v. 29, n. 1, p. 40–7, 2014.

KORDUS, R. J.; LAVOIE, H. A. Granulosa cell biomarkers to predict pregnancy in ART: pieces to solve the puzzle. *Reproduction*, v. 153, n. 2, p. R69–R83, 2017.

KRONENBERG, H. M. *Williams: Tratado de Endocrinologia*: Elsevier Inc., 2010.

LI, J. *et al.* A meta-analysis of dehydroepiandrosterone supplementation among women with diminished ovarian reserve undergoing in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, v. 131, n. 3, p. 240–245, 2015.

LI, R.; ALBERTINI, D. F. The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 14, n. 3, p. 141–152, 2013.

LIMA-VERDE, I. B.; ROSSETTO, R.; FIGUEIREDO, J. R. Influência dos hormônios esteroides na foliculogênese. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 35, n. 4, p. 472–482, 2011.

MAGOFFIN, D. A. Ovarian theca cell. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 37, n. 7, p. 1344–1349, 2005.

MASCARENHAS, M. N. *et al.* National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. *PLoS Medicine*, v. 9, n. 12, p. 1–12, 2012.

MCGEE, E. A.; HSUEH, A. J. W. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews*, v. 21, n. 2, p. 200–214, 2000.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. *EMBRIOLOGIA CLÍNICA*. 8ª EDIÇÃO, 2008.

ORTIZ-ESCRIBANO, N. *et al.* Role of cumulus cells during vitrification and fertilization of; mature bovine oocytes: Effects on survival, fertilization, and blastocyst development. *Theriogenology*, v. 86, n. 2, p. 635–641, 2015.

QUAAS, A. M.; HANSEN, K. R. The role of steroid hormone supplementation in non-

assisted reproductive technology treatments for unexplained infertility. *Fertility and Sterility*, v. 106, n. 7, p. 1600–1607, 2016.

ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA *REPRODUCTIVE BIOLOGY*

REPRODUCTIVE BIOLOGY

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Impact Factor	p.1
• Editorial Board	p.1
• Guide for Authors	p.3



DESCRIPTION

Reproductive Biology is an international, quarterly, peer-reviewed journal publishing high quality original research articles, short communication, technical notes, reviews and mini-reviews dealing with all aspects of reproduction.

Reproductive Biology covers a broad scope of **reproductive biology** and **reproductive medicine translational research articles**, providing a platform for scientific exchange of knowledge. The journal publishes state-of-the-art articles on **reproductive physiology, endocrinology** with a special attention to **endocrine related cancers, receptor studies, andrology, embryology, infertility, assisted reproduction, contraception, obstetrics and gynecology**, as well as **animal breeding and animal reproduction** (with a special emphasis to **farm animals**). Papers from both basic and clinical research areas will be considered.

Reproductive Biology is the official journal of the [Society for Biology of Reproduction](#) and the [Institute of Animal Reproduction and Food Research of Polish Academy of Sciences](#) in Olsztyn, Poland.

IMPACT FACTOR

2015: 1.722 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2016

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

Nafis Rahman, Institute of Biomedicine/Physiology, Faculty of Medicine, University of Turku, Kiinamyllynkatu 10, 20520, Turku, Finland

Associate Editors

Paweł Bartlewski, Dept. of Biomedical Sciences, University of Guelph, Ontario Veterinary College, Guelph, Ontario, Canada

Aleksander Giwercman, Department of Translational Medicine, Molecular Reproductive Medicine, Lund University, Sweden

Monika M. Kaczmarek, Institute of Animal Reproduction and Food Research, Polish Academy of Sciences, Olsztyn, Poland

Rina Meidan, The Robert H Smith Faculty of Agriculture, Food and Environment, The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, Israel

Editorial Board

Leon J.S. Brokken, Department of Natural Sciences, Högskolan Kristianstad, Kristianstad, Sweden

Howard Carp, Department of Obstetrics and Gynecology, Sheba Medical Center at Tel Hashomer, Tel Hashomer, Israel

Renata Ciereszko, Dept. of Animal Physiology, University of Warmia and Mazury, Olsztyn, Poland

Ralf Einspanier, Inst. of Veterinary Biochemistry, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany

Graca M. L. Ferreira-Dias, Faculty of Veterinary Medicine, C.I.I.S.A., University of Lisbon, Lisbon, Portugal

Herbert Fluhr, Department of Obstetrics and Gynecology, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany **Anna**

Grazul-Bilska, Ctr. for Nutrition and Pregnancy, North Dakota State University, Fargo, North Dakota, USA **Bernd**

Hoffmann, The Gynecology Clinic, Obstetrics and Andrology of Large and Small Animals, Justus-Liebig-

Universität Gießen, Giessen, Germany

Peter Humaidan, The Fertility Clinic, Skive Regional Hospital, Faculty of Health, Aarhus University, Skive, Denmark

Richard Ivell, School of Biosciences, The University of Nottingham, Nottingham, UK

Tomasz Janowski, Department of Animal Reproduction with Clinic, Faculty of Veterinary, University of Warmia and Mazury, Olsztyn, Poland

Albert Jiang, Molecular Biology and Genetics, Mercer University School of Medicine, Savannah, USA

Jan Kotwica, Institute of Animal Reproduction and Food Research, Polish Academy of Sciences, Olsztyn, Poland

Irina Kowalska, Department of Endocrinology, Diabetology and Internal Medicine, Medical University of Białystok, Białystok, Poland

Maciej Kurpisz, Inst. of Human Genetics, Polish Academy of Sciences, Poznan, Poland

Piotr Ludański, Department of Perinatology and Obstetrics, Medical University of Białystok, Białystok, Poland

Jerome Levallet, Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée, Université de Caen Basse Normandie, Caen, France

XiangDong Li, College of Agriculture and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing, China

Antti Perheentupa, Department of Obstetrics and Gynecology, University of Turku, Turku, Finland

Ewa Rajpert-De Meyts, Department of Growth & Reproduction, Copenhagen University Hospital, Copenhagen, Denmark

Adolfo Rivero-Muller, Turku Centre of Biotechnology, University of Turku, Turku, Finland

Mordechai Shemesh, Kimron Veterinary Institute, Bet Dagan, Israel

Joe-Leigh Simpson, Departments of Molecular Human Genetics and Obstetrics and Gynecology, Florida International University, Miami, Florida, USA

Alexander Sirotkin, Animal Production Research Centre Nitra, Luzianky, Slovakia

Roman Smolarczyk, Department of Gynecological Endocrinology, Medical University of Warsaw, Warszawa, Poland

Sławomir Wolczynski, Department of Reproduction and Gynecological Endocrinology, Medical University of Białystok, Białystok, Poland

Adam Ziecik, Institute of Animal Reproduction and Food Research, Polish Academy of Sciences, Olsztyn, Poland

Marek Zygmunt, Dept. of Obstetrics and Gynecology, Ernst Moritz Arndt University, Greifswald, Germany

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Criteria for manuscripts

The Editorial Board of *Reproductive Biology* considers for publication the original articles under the understanding that neither the manuscript nor any part of its essential substance, tables or figures have previously been published in print form or electronically, and are not submitted to any other journal or electronic medium. Each submission packet should include the statement signed by the corresponding author that the work has not been published previously or submitted elsewhere for review, and a copyright transfer form.

Types of article

Accepted papers are published in the following journal sections: **Research papers** (max. 55,000 characters without spaces, excluding abstract and references, References 60 or less, Abstract: up to 250 words, unstructured (i.e., no subheadings), keywords: 3-5, text divided into numbered sections: Introduction, Material and methods, Results, Discussion (more information <http://www.elsevier.com/journals/reproductive-biology/1642-431X/guide-for-authors#25000>));

scientifically sound and containing novel mechanistic data manuscripts on reproduction, dealing generally with human or farm animal reproduction as well as the reproductive aspects in rodents with a clinical relevance would have priority for publication. Mini-reviews (25,000 characters without spaces, excluding abstract and references, up to 30 references, abstract up to 200 words, unstructured manuscript (i.e., no subheadings), 3-5 keywords, 1 table and/or 1 figure): Mini-reviews address a specific topic and represent literature review and author opinions. Generally, the Editorial Board invites mini-reviews, but exceptional unsolicited mini-review manuscripts will also be considered. **Review papers** (55,000 words, structured manuscript with subheading with similar conditions as research papers) are published under the invitation from the Editorial Board. **Requirements for short communications and technical notes** (see articles published previously in *Reproductive Biology*). **Only** very highly focused manuscripts that highlight research breakthroughs requiring an accelerated publication (short communications), and novel technical methodologies or hypotheses in the reproductive sciences or transgenic models that may provide a strong foundation for innovative research in the future would be considered in this category (technical notes). **Short communications** (16,000 characters without spaces): Abstract should consist of 5-6 lines only, Introduction of no more than 2 paragraphs, Materials and Methods section should be undivided into subheadings, and Results and Discussion combined into one part. Limit the number of tables/figures to 2-3, References limited to 15. **Technical notes** (14,000 characters without spaces): Summary should consist of 5-6 lines, an expanded Methods and Materials section; Introduction of maximum 2-3 paragraphs, and Results and Discussion combined into one part. References limited to a number of 15.

Detailed and specific manuscript preparation information is written below in the section "manuscript preparation information".

Page charges

A fee of EUR 30 (USD 42, JPY 3 334) +VAT per typeset journal page is charged for accepted papers to defray distribution costs, thereby allowing papers to be published online as Articles in Press within 20 business days of acceptance (**subject to prompt turnaround of proofs by authors**). The ability to pay the fee does not influence decisions regarding the acceptance of a paper, which is based solely on the peer-review process. Standard payment method is by credit card. If the payee is an institution, there is an option to pay by an electronic bank transfer upon the receipt of an invoice. If you are an institutional customer and want us to issue an invoice for you, please send all the necessary information (full name and postal address, including a postal code, of a payee, NIP or VAT number) to: k.wasik@elsevier.com. We can only issue invoices in EUR, USD and PLN, please specify the preferred currency.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

- One author has been designated as the corresponding author with contact details:
- E-mail address

- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- Relevant declarations of interest have been made
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

For reproduction in black-and-white, please supply black-and-white versions of the figures for printing purposes.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Human and animal rights

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans; [Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals](#). Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed.

Declaration of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [CrossCheck](#).

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more](#).

This journal has an embargo period of 12 months.

Language (usage and editing services)

Please prepare your manuscript in the English language (American or British English is accepted, but not a mixture of both). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop <http://webshop.elsevier.com/languageediting/> or visit our customer support site <http://support.elsevier.com> for more information.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <https://www.evis.com/evis/jrnl/REPPIO>.

Review process

Manuscripts are evaluated on the basis that they present new insights into the investigated topic and are likely to contribute to scientific progress. It is understood that all authors listed on a manuscript have agreed to its submission; the signature of the corresponding author on the letter of submission signifies that this condition has been fulfilled. Initially, the Editors of *Reproductive Biology* pre-evaluate all received manuscripts. Manuscripts with insufficient priority for publication are rejected promptly. Incomplete packages or manuscripts not prepared in compliance with the required quality or advised style will be sent back to authors without scientific review. The authors are notified with the reference number upon manuscript registration at the Editorial Office. The registered manuscripts are sent to independent experts for scientific evaluation. We encourage authors to suggest the names of possible reviewers, (potential reviewers could be suggested from the editorial board too), but we reserve the right of final selection. Submitted papers are accepted for publication after a positive opinion of the independent reviewers and Editors.

Permissions

A written statement must accompany materials taken from other sources from both the author and publisher giving permission to *Reproductive Biology* for reproduction of the materials. Obtain permission in writing from at least one author of papers in press, unpublished data, and personal communications.

Disclaimer

Every effort is made by the Editor-in-Chief and the Editorial Board of *Reproductive Biology* to see that no inaccurate or misleading data, opinion or statement will appear in *Reproductive Biology*. However, they wish to make it clear that the data and opinions contained in the articles and advertisements herein are the responsibility of the contributor, sponsor or advertiser concerned. Accordingly, the Editor-in-Chief and the Editorial Board accept no liability whatsoever for the consequences of any of such inaccurate or misleading data, opinion or statement. Every effort is made to ensure that drug doses and other quantities are presented accurately. Nevertheless, readers are advised that the method and techniques for drug usage and other treatments described in *Reproductive Biology*, should only be followed in conjunction with the drug or treatment specifications released by manufacturers in the readers country of residence.

PREPARATION

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on types of peer review.](#)

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format, double spaced with numbered lines. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. Avoid extensive citations and discussion of the published literature.

Essential title page information

• **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

• **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

• **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

• **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section and include them on the title page only. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Abstracts

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, nonstandard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Abstract should not be divided into sections, aims, methods etc. (not structured). Abstracts for **Original Articles** should not exceed 250 words.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 5 keywords, avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Use the abbreviations sparingly: only those abbreviations that are firmly established in the field are eligible. The keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Abbreviations that are unavoidable must be defined twice: (1) at their first mention in the Abstract and (2) at their first mention in the remaining part of the article. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Unit

s

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.
 TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.
 TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#) and [Zotero](#), as well as [EndNote](#). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51–9.

Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304.

Reference to a website:

[4] Cancer Research UK. Cancer statistics reports for the UK, <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>; 2003 [accessed 13.03.03].

Reference to a dataset:

[dataset] [5] Oguro M, Imahiro S, Saito S, Nakashizuka T. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1; 2015. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (*J Am Med Assoc* 1997;277:927–34) (see also [Samples of Formatted References](#)).

Reference style

Format the references in compliance with the recommended style for this journal:

Last name, initial, full paper title, journal full name, year, volume (number) first and last page.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Paivio A, Jansen B, Becker LJ. Comparisons through the mind's eye. *Cognition* 1975;37(2):635–47.

[2] Ulbrich SE, Kettler A, Einspanier R. Expression and localization of estrogen receptor α , estrogen receptor β and progesterone receptor in the bovine oviduct in vivo and in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003;84(2–3):279–289.

Reference to a book:

[3] Letheridge S, Cannon CR, editors. *Bilingual education: teaching English as a second language*. New York: Praeger; 1980.

Reference to a chapter in an edited book:

[4] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 3rd ed. New York: MacMillan; 1979 [chapter 4].

Reference to a conference (only abstracts 2-page long may serve as references):

[5] Douglas F, Ball Th. Tracking and viewing changes on the web. In: *Proc. 1996 USENIX technical conference*; 1996.

Reference to a Dataset

[6] [dataset] Oguro M, Imahiro S, Saito S, Nakashizuka T. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1; 2015. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article

and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Virtual Microscope

The journal encourages authors to supplement in-article microscopic images with corresponding high resolution versions for use with the Virtual Microscope viewer. The Virtual Microscope is a web based viewer that enables users to view microscopic images at the highest level of detail and provides features such as zoom and pan. This feature for the first time gives authors the opportunity to share true high resolution microscopic images with their readers. [More information and examples](#). Authors of this journal will receive an invitation e-mail to create microscope images for use with the Virtual Microscope when their manuscript is first reviewed. If you opt to use the feature, please contact virtualmicroscope@elsevier.com for instructions on how to prepare and upload the required high resolution images.

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>

ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Projeto: EFEITO DO SULFATO DE DEHIDROEPIANDROSTERONA (SDHEA) SOBRE CÉLULAS FOLICULARES NOS ESTÁGIOS ANTRAL INICIAL E PRÉ-OVULATÓRIO

Pesquisador responsável: Prof. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva (Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral – UFRGS)

Telefone para contato: (51) 3308 - 3559

Prezada paciente, antes de concordar em participar deste estudo de pesquisa é importante que você leia e entenda a explicação que se segue sobre os procedimentos propostos. Se depois de ler este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido existir alguma coisa que você não compreenda sobre o estudo ou sobre os procedimentos, por favor, pergunte ao responsável que está aplicando este termo.

Você está sendo convidada para participar do estudo que estamos realizando sobre a caracterização do modelo de cultura de células que formam o folículo ovariano [estrutura que está ao redor do óvulo] e a avaliação do efeito de um hormônio (chamado dehidroepiandrosterona) sobre essas células (chamadas de células murais da granulosa e células do *cumulus oophorus*). O objetivo do nosso estudo é observar quais os efeitos deste hormônio quando as células são cultivadas em laboratório, a fim de termos uma ideia do efeito deste hormônio sobre o próprio óvulo.

Estamos convidando a senhora para fazer parte deste experimento, pois quando a senhora realizar o seu procedimento de Reprodução Assistida, as células que estão junto ao seu óvulo são coletadas, naturalmente. No entanto, essas células não são utilizadas nos procedimentos de fertilização, elas são rotineiramente descartadas, pois não apresentam utilidade para as técnicas de Reprodução Assistida. Por isso estamos solicitando permissão para utilizar essas células, as quais seriam desprezadas, em nossa pesquisa. A coleta das células não acarretará alteração nos procedimentos de seu tratamento, pois ela ocorrerá após a técnica de coleta de seu óvulo (após a punção ovariana), no momento em que elas seriam descartadas. A sua participação no estudo é isenta de despesas (não trará custos a você) e a senhora não receberá nenhum pagamento (não será remunerada) pela sua participação.

Os resultados deste estudo não trarão benefícios nem prejuízos diretos para a senhora, assim como não há aumento do risco de seu tratamento de Reprodução Assistida devido a sua participação no estudo (os riscos do tratamento são independentes deste estudo), pois não será realizada nenhuma técnica a mais durante o período do tratamento (não haverá nenhuma intervenção adicional). Se houver algum dano diretamente decorrente de sua participação no estudo, você terá direito à indenização conforme previsto em lei. Você é livre para decidir para participar ou não do estudo, assim como, retirar-se dele em qualquer momento sem prejuízo ou alteração na rotina de seu tratamento ou relacionamento com seu médico.

Todas as informações obtidas estarão à sua disposição se assim desejar. Todos os resultados referentes à pesquisa serão utilizados para fins exclusivos de pesquisa, sendo resguardada sua total

Rubrica (Participante / Pesquisador): _____ / _____

1/2

confidencialidade. Da mesma forma, a amostra de seu material não será utilizada para nenhuma outra finalidade, após o cultivo dessas células o material será descartado de forma correta.

Caso a Sra. fique com alguma dúvida em relação ao projeto poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável, através do telefone informado no topo da página 1, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital envolvido, de segunda a sexta-feira, das 8 às 17 horas, através do telefone (51) 3359 - 8304, para esclarecer suas dúvidas.

Eu, _____, li e entendi o propósito do estudo, bem como os potenciais benefícios e riscos da participação no estudo e concordo em participar. Afirmando que fui adequadamente informada sobre o protocolo em questão e tive a oportunidade de fazer perguntas e minhas perguntas foram respondidas. Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento e que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar. Dou por meio deste documento meu consentimento informado para ser uma participante desse estudo.

Participante:

Nome (em letra de forma) Assinatura

Porto Alegre, ____ de _____ de _____.

Pesquisador:

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente todos os detalhes relevantes deste estudo ao sujeito mencionado acima.

Nome (em letra de forma) Assinatura

Porto Alegre, ____ de _____ de _____.