



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CAMPUS FLORIANÓPOLIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E DO  
DESENVOLVIMENTO

FERNANDA SOUZA PERUZZATO

**ANÁLISE DE DIFERENTES PERFIS DE PACIENTES EM  
RELAÇÃO À EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS COM A  
MATURAÇÃO OOCITÁRIA E O DESENVOLVIMENTO  
EMBRIONÁRIO INICIAL**

FLORIANÓPOLIS

2019

Fernanda Souza Peruzzato

**ANÁLISE DE DIFERENTES PERFIS DE PACIENTES EM RELAÇÃO À  
EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS COM A MATURAÇÃO OOCITÁRIA  
E O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO INICIAL**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientador: Prof. Dr. Valério Marques Portela Jr.

Coorientadora: Prof. Dra. Yara Rauh Muller

Florianópolis

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Peruzzato, Fernanda Souza  
ANÁLISE DE DIFERENTES PERPIS DE PACIENTES EM RELAÇÃO À  
EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS COM A MATUREÇÃO OOCITÁRIA E  
O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO INICIAL / Fernanda Souza  
Peruzzato ; orientador, Valério Marques Portela Jr.,  
coorientador, Yara Maria Rauh Muller, 2019.  
71 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós  
Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento,  
Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Qualidade  
Oocitária. 3. Expressão Gênica. 4. Perfil da Paciente. I.  
Marques Portela Jr., Valério . II. Rauh Muller, Yara  
Maria. III. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do  
Desenvolvimento. IV. Título.

Fernanda Souza Peruzzato

**Análise de diferentes perfis de pacientes em relação à expressão de genes envolvidos com a maturação oocitária e o desenvolvimento embrionário inicial**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profª. Yara Maria Rauh Muller, Dra.

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Rodrigo Barbano Weingrill, Dr.

Universidade da Região de Joinville

Prof. Geison de Souza Izídio, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

---

Prof. Dr. Geison de Souza Izídio

Coordenador do Programa

---

Prof. Dr. Valério Marques Portela Jr.

Orientador

Florianópolis, 05 de julho de 2019.

Este trabalho é dedicado às queridas pacientes que lutam com muita garra pelo sonho de se tornarem mães, e à minha amada mãezinha Rosane Peruzzato, meu exemplo e porto seguro.

***“A única forma de chegar ao IMPOSSÍVEL, é acreditando que é POSSÍVEL”.***

*Lewis Carroll*

## AGRADECIMENTOS

A todas as pessoas que foram importantes na concretização desta etapa e na minha formação pessoal e profissional;

Ao Senhor por me permitir chegar até aqui com saúde;

À minha querida MÃE, meu porto-seguro, que está ao meu lado em todos os momentos de minha vida, sempre me incentivando;

Ao meu PAI Nelson, meu anjinho, que tenho certeza que lá de cima cuida e guia meus passos;

À minha família que sempre anda ao meu lado, acreditando nos meus projetos e sempre os incentivando;

À professora Dra Yara Rauh Muller que desde o momento que ingressei no PPGBCD me motivou e incentivou a encarar todos os desafios, esteve ao meu lado, ensinando-me e orientando-me. Serei eternamente grata a ela como pessoa e profissional, tornando-a como meu exemplo;

À Clínica Fecondare por permitir a realização deste trabalho, sendo sempre solícita, parceira e ativa na concretização desta etapa. Dentre tantos motivos pelos quais amo meu trabalho como embriologista, fazer parte desta equipe é um deles;

À Dra Ana Lucia Zarth, ao Dr. Marcelo Costa Ferreira, ao Dr. Jean Louis Maillard e ao Dr. Ricardo Nascimento por estarem sempre prontos a ajudar e por contribuírem no repasse dos consentimentos às pacientes;

Ao Dr. Ricardo Nascimento que por muitas vezes foi meu colega nas disciplinas e assistiu aos meus Seminários;

Ao Dr Jean Maillard por repassar e revisar todos os protocolos das pacientes comigo;

Às pacientes por terem disposto de seu tempo a entender o Projeto e aceitar sua participação;

Ao PPGBCD por me receber e aceitar desde o início, mesmo com as dificuldades em conciliar o trabalho na Clínica e o Mestrado, e pelo aprendizado recebido durante todos esses anos. Um agradecimento especial ao Coordenador da Pós, Dr. Geison de Souza Izídio, e à Prof. Dra Evelise Maria Nazari;

Ao LAFRA de Curitiba, em especial ao Prof Dr. Valério Marques Portela Junior, ao MSc André Lucio Fontana Goetten e à querida colega Julia Koch pela orientação e contribuição neste trabalho;

Aos colegas de mestrado que se tornaram amigos e parceiros, em especial às amigas Elisa Corvino e Rachel de Barros Oliveira que se tornaram muito importantes para mim;

Às minhas amigas queridas que de alguma forma contribuíram neste trabalho, me ouvindo e motivando, em especial à Carolina Mazoni, Betina Iser, Ana Lúcia Zarth, Letícia Wietcovsky, e Maria Gabriela Pinho Peixe;

Ao colega de laboratório e disciplinas, Madson, que foi muito importante no auxílio na parte de revisão estatística. Meu sincero agradecimento!

Ao meu namorado João Caldeira que foi muito importante no incentivo à finalização deste trabalho, sempre me ouvindo e dando bons conselhos;

Às minhas gatinhas Jolie e Marie, que sempre estiveram literalmente grudadas em mim quando da redação da dissertação;

À CAPES e à UFSC que foram de extrema importância para a realização deste trabalho.

## RESUMO

A fertilidade da mulher é um tópico que tem concentrado discussões ao redor do mundo, uma vez que muitos fatores estão envolvidos no seu declínio, dentre eles o perfil e hábitos comportamentais adotados. As causas de infertilidade são diversas e em grande parte estão envolvidos os fatores ovarianos, com comprometimento da qualidade oocitária. Cada oócito está envolto pelas células do *cumulus*, que respondem a estímulos hormonais e comunicam-se de forma bidirecional com oócito, promovendo sua maturação. Essas células expressam genes que participam de vias metabólicas e, a análise de sua expressão gênica em diferentes perfis de pacientes pode ser uma importante ferramenta para a busca de marcadores da maturação e qualidade oocitária. Esse trabalho teve como objetivo analisar se o perfil de idade e IMC, e hábitos comportamentais de tabagismo e consumo de álcool da mulher estariam influenciando a expressão dos genes PTGS2, AREG, CYP19, CSE, FGF2, FGF18, e o desenvolvimento embrionário inicial em laboratório. Pacientes submetidas a protocolo de estimulação ovariana e fertilização *in vitro* tiveram suas células do *cumulus* coletadas, e a expressão de cada gene foi mensurada através de RT-qPCR. As médias de expressão de cada gene foram calculadas de acordo com a diferença de perfil e/ou hábitos comportamentais que apresentavam. Foram comparadas nestes mesmos grupos as taxas do desenvolvimento embrionário inicial no laboratório. Pacientes com mais de 35 anos apresentaram menor expressão de PTGS2 e de CSE do que pacientes com idade menor ou igual a 35 anos. Foi encontrada diferença nas médias de expressão dos genes PTGS2, CYP19 e FGF2, onde mulheres que consomem álcool expressaram menos estes genes quando comparadas àquelas que não consomem álcool. Combinando-se diferentes perfis e hábitos comportamentais, todos os genes analisados apresentaram maior nível de expressão em pacientes que não consomem álcool e nunca fumaram do que em pacientes que consomem álcool e/ou já fumaram/fumam. Já a expressão dos genes CYP19 e CSE foram maiores no grupo combinado de mulheres com idade menor ou igual a 35 anos e IMC menor ou igual a 25 kg/m<sup>2</sup> em relação a mulheres com idade maior que 35 anos e/ou IMC maior que 25 kg/m<sup>2</sup>. A taxa de oócitos maduros coletados foi diferente, sendo menor em ciclos de pacientes com idade maior que 35 anos e/ou IMC maior que 25 kg/m<sup>2</sup> em relação às pacientes com idade menor ou igual a 35 anos e IMC menor ou igual a 25 kg/m<sup>2</sup>. Os resultados deste trabalho sugerem que o perfil e



hábitos comportamentais da mulher podem influenciar a expressão de genes importantes para a maturação oocitária, bem como o desenvolvimento embrionário inicial.

**Palavras-chave:** Infertilidade; Reprodução Assistida; Oócito; Células do *cumulus*; Expressão gênica; Perfil da paciente.

## ABSTRACT

Women's fertility is a current topic that has leading discussions around the world, since many factors are involved in its decline, among them the profile and behavioral habits adopted. Regarding female infertility, there are ovarian factors, concerning oocyte quality and ovulatory processes. Inside the ovaries, each oocyte is surrounded by *cumulus* cells and, throughout hormonal stimuli, there is bidirectional communication with the female gamete, promoting its maturation and ovulation. These cells express genes that are inserted in several metabolic pathways and therefore the analysis about gene expression in different patient profiles can provide important information for studies regarding markers for oocyte quality and maturation. The present work aimed to analyze if the woman profile and her behavioral habits would be influencing the expression of genes involved in oocyte maturation, such as PTGS2, AREG, CYP19, CSE, FGF2, FGF18, and the initial embryonic development in the laboratory. Patients submitted to ovarian stimulation protocol and *in vitro* fertilization had their *cumulus* cells collected, and the expression of each gene described above was measured by RT-qPCR. Expression mean of each gene was calculated and compared, according to the difference of profile and/or behavioral habits that they have presented. Early embryonic development rates in the laboratory were also compared in these same groups. Patients aged more than 35 years old had lower expression of PTGS2 and CSE compared to patients aged less than or equal to 35 years old. Women who consume alcohol had a lower expression of PTGS2, CYP19, and FGF2 genes when compared to those who do not consume alcohol. Different profiles and behavior habits were also combined to novel analysis, and thus all studied genes have presented a higher level of expression in patients who did not consume alcohol and never smoked compared to patients who consume alcohol and/or smoke or have already smoked. Genes CYP19 and CSE have been more expressed in women aged less than or equal to 35 years old and BMI lower than or equal to 25 kg/m<sup>2</sup> comparing to women older than 35 years and/or BMI greater than 25 kg/m<sup>2</sup>. Regarding clinical laboratory data rates during *in vitro* fertilization cycles of these patients, the number of mature oocytes collected was different, being lower in cycles of patients aged more than 35 years old and/or BMI greater than 25 kg/m<sup>2</sup> compared to women aged less than or equal to 35 years old and BMI lower than or equal to 25 kg/m<sup>2</sup>. The results of this work suggest that woman profile and her

behavioral habits may influence expression of crucial genes for oocyte maturation as well as the initial embryonic development.

**Keywords:** Infertility; Assisted reproduction; Oocyte; *Cumulus* cells; Gene expression; Patient profile.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenvolvimento folicular humano:.....	22
Figura 2 - Biossíntese das prostaglandinas:.....	25
Figura 3 – Família EGF:.....	26
Figura 4 – Complexos Cumulus-Oócitos: .....	34
Figura 5 - Sequências dos Genes Avaliados. Legenda: F: <i>forward</i> ; R: <i>reverse</i> .....	36
Figura 6 - Expressão gênica em relação à idade:.....	39
Figura 7 - Expressão gênica em relação ao consumo de álcool: .....	39
Figura 8 - Expressão gênica em relação aos hábitos comportamentais de consumir álcool e/ou fumar:.....	41
Figura 9 - Expressão gênica em relação ao perfil da paciente (idade e IMC). .....	41
Figura 10 - Oócitos maduros em relação ao perfil da paciente: .....	42
Figura 11 – Dados resumidos de expressão gênica de acordo com os grupos estudados: .....	43
Figura 12 – Dados resumidos de taxas laboratoriais de acordo com os grupos estudados: .....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA - Ácido Araquidônico

AMPC – Monofosfato de Adenosina Cíclico

AREG - Anfirregulina

ASRM – *American Society for Reproductive Medicine*

Ca<sup>2+</sup> - Cálcio

CBS - Cistationa Beta-Sintase

CCO – Complexo *Cumulus*-Oócito

CO - Monóxido de Carbono

COX1 - Ciclooxygenase 1

COX2 - Ciclooxygenase 2

CSE - Cistationa Gama-Liase

CYP19 – Aromatase

DNA – Ácido Desoxiribonucleico

EGF - Fator de Crescimento Epidermal

EGFR - Receptores do Fator de Crescimento Epidermal

FGF - Fator de Crescimento de Fibroblastos

FGF2 – Fator de Crescimento de Fibroblastos 2

FGF18 - Fator de Crescimento de Fibroblastos 18

FSH - Hormônio Folículo Estimulante

GnRH - Hormônio Liberador de Gonadotrofinas

H<sub>2</sub>S – Sulfeto de Hidrogênio

ICSI - Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoide

IMC - Índice de Massa Corporal

LAFRA - Laboratório de Fisiologia da Reprodução Animal

LH - Hormônio Luteinizante

LHR - Receptores de LH

NO - Óxido Nítrico

OMS - Organização Mundial da Saúde

PCR – Reação em Cadeia de Polimerase

PLA<sub>2</sub> - Fosfolipase A<sub>2</sub>

PTGS2 - Prostaglandina Endoperoxidase Sintase 2

RNA – Ácido Ribonucleico

TRA - Tecnologia de Reprodução Assistida

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO:.....	16
1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO: .....	16
1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: .....	18
1.2.1 Infertilidade: .....	18
1.2.2 Tecnologia de Reprodução Assistida (TRA) .....	19
1.2.3 Qualidade Oocitária: .....	20
1.2.4 A Maturação Oocitária e a Ovulação: .....	21
1.2.5 Relação entre as Células do <i>cumulus</i> e a Qualidade Oocitária: .....	23
1.2.6 Genes Expressos nas Células do <i>cumulus</i> : .....	24
1.2.7 Hipóteses: .....	30
2. OBJETIVOS:.....	31
2.1 OBJETIVO GERAL: .....	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....	31
3. MATERIAL E MÉTODOS:.....	32
3.1 Pacientes e Delineamento do Estudo: .....	32
3.2 Estímulo Ovariano: .....	34
3.3 Obtenção das Células do Cumulus: .....	34
3.4 Avaliação da Qualidade Oocitária e do Desenvolvimento Embrionário in vitro: .....	35
3.5 Extração de Ácidos Nucleicos e Reação de Transcriptase Reversa: .....	35
3.6 RT-qPCR: .....	36
3.7 Análises Estatísticas:.....	37
4. RESULTADOS: .....	38
4.1 Expressão gênica nos perfis e hábitos comportamentais estudados (Grupos 1-4):.....	38

4.2 Expressão gênica nos perfis e hábitos comportamentais combinados (Grupos 5-6). .....	40
4.3 Dados clínicos laboratoriais.....	42
4.4 Resumo dos Resultados. ....	43
5. DISCUSSÃO:.....	44
6. CONCLUSÃO:.....	51
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS: .....	52
ANEXO 1: .....	64
ANEXO 2: .....	68



## 1. INTRODUÇÃO:

### 1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO:

A fertilidade feminina caracteriza-se biologicamente como a capacidade reprodutiva de uma mulher e o potencial de ficar grávida. O ato de procriar é um dos objetivos e desejos do ser humano, e quando sua concretização se torna difícil, muitos problemas emocionais e sociais passam a coexistir (Thaler-DeMers *et al.*, 2001; Soderberg *et al.*, 2011).

A maioria dos casais que desejam ter filhos e se deparam com o problema da infertilidade acaba por procurar centros de medicina reprodutiva, em busca de novas alternativas para a obtenção da tão sonhada gravidez.

Muitos são os fatores que contribuem para a dificuldade no estabelecimento de uma gravidez tanto através de métodos *in vivo* quanto *in vitro*. Os fatores relacionados à infertilidade feminina são diversos, assim como os perfis das pacientes, contribuindo para a complexidade dos tratamentos e necessidade de análise cuidadosa e individualização dos casos. Nesse contexto, a investigação de diferentes perfis de mulheres e diferentes estilos de vida, assim como o impacto desses fatores nos resultados clínico-laboratoriais dentro das tecnologias de reprodução assistida, vem aumentando consideravelmente (Mínguez-Alarcón *et al.*, 2018).

A ciência busca elucidar pontos críticos durante todo o processo de estabelecimento de uma gestação, desde a formação dos gametas até a interação útero-embrião. Uma das vertentes bastante estudadas está relacionada aos complexos mecanismos fisiológicos que culminam com a formação de gametas capacitados a formarem embriões viáveis e, no que se refere à parcela feminina, está à formação de um oócito competente.

Dentro dos folículos, cada oócito é envolto por um grupo de células somáticas, conhecidas como células do *cumulus*. Essas células estão em íntima comunicação bidirecional com o oócito, sendo reguladas por uma variedade de hormônios, proteínas e metabólitos, levando, ao final, ao desenvolvimento e maturação dos oócitos. Essa estreita associação entre células do *cumulus* e o oócito é conhecida como complexo *cumulus*-oócito (CCO) e é de extrema importância para a aquisição de competência

desse gameta e, conseqüentemente, de um desenvolvimento embrionário satisfatório (Chermula *et al.*, 2018).

Sabe-se que as células do *cumulus* expressam uma variedade de genes relacionados a processos celulares e que, de alguma forma, estes influenciam a maturação do oócito e sua qualidade. Embora existam muitos estudos que buscam elucidar essa vasta e complexa relação fisiológica, pouco se tem estabelecido de fato sobre os reais marcadores de qualidade oocitária e embrionária. Uma vez que existem diversos fatores externos e internos ao microambiente ovariano atuando no organismo feminino e contribuindo para seu funcionamento adequado, a análise de expressão gênica das células do *cumulus* em diferentes perfis de pacientes tem se mostrado uma importante ferramenta para a procura desses marcadores, buscando, no futuro, contribuir para uma investigação individualizada e tratamento personalizado durante os ciclos de reprodução assistida de cada paciente.

## 1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

São muitos os fatores presentes na temática da infertilidade feminina e seu tratamento através da reprodução assistida. A revisão bibliográfica abaixo busca desenvolver este assunto, dando ênfase ao conhecimento científico a respeito da maturação e qualidade oocitária, e a íntima relação entre o gameta e as células foliculares.

### 1.2.1 Infertilidade:

Define-se como infertilidade, segundo a Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (ASRM – *American Society for Reproductive Medicine*), uma doença caracterizada pela incapacidade de um casal sexualmente ativo, sem a utilização de qualquer método contraceptivo, de atingir a gravidez dentro de um ano. É um fenômeno relativamente comum, afetando por volta de 8 a 15% dos casais, independentemente de fatores socioeconômicos ou culturais (Pasqualotto, 2007). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), esta patologia afeta de 50 a 80 milhões de mulheres (Ombelet *et al.*, 2008).

Muitos são os fatores apontados como contribuintes para a infertilidade feminina, e entre eles estão os fatores ovarianos, onde há um declínio na qualidade do oócito e/ou distúrbios no processo de ovulação (Kuohung *et al.*, 2015).

No que diz respeito ao perfil da mulher, a idade é o fator prognóstico isolado que mais define a chance que ela tem de engravidar e está inversamente correlacionada com as taxas de nascidos vivos (Sunkara *et al.*, 2011). Com o passar da idade, e principalmente a partir dos 35 anos, ocorre perda da qualidade oocitária, diminuição da reserva ovariana, e alteração no perfil hormonal que compromete a ovulação (Faddy *et al.*, 1992). O peso da paciente também influencia na sua vida reprodutiva, uma vez que mulheres com sobrepeso ou obesas possuem três vezes mais chance de ter dificuldade de engravidar, mesmo quando apresentam os ciclos reprodutivos regulares, e podem chegar à infertilidade (Rich-Edwards *et al.*, 1994). Segundo a OMS, um Índice de Massa Corporal (IMC) acima de 25 kg/m<sup>2</sup> é considerado excesso de peso (WHO, 1997), e mulheres nesta condição, além de apresentarem taxas baixas de gravidez e alto índice de aborto, também estariam mais propensas a resultados adversos no caso de uma

gravidez, como diabetes gestacional, hipertensão e prematuridade (Silvestris *et al.*, 2018). É sugerido que o excesso de peso, principalmente a obesidade, implicaria na redução da viabilidade oocitária, uma vez que há alteração de vias metabólicas e presença de fatores inflamatórios devido ao acúmulo de ácidos graxos livres que exercem efeitos tóxicos sobre os tecidos reprodutivos (Silvestris *et al.*, 2018).

Fatores comportamentais, como o tabagismo e o consumo de álcool também prejudicam a função reprodutiva feminina (Baird *et al.*, 1985; Tolstrup *et al.*, 2003). A fumaça do cigarro contém mais de 4000 compostos, incluindo dezenas de oxidantes que são prejudiciais à saúde, induzindo respostas pro-inflamatórias e estresse oxidativo tanto em fumantes ativos como passivos (Yamaguchi *et al.*, 2005; Cooper *et al.*, 2008; Sadeu *et al.*, 2010). A nicotina e seus metabólitos podem causar vasoconstrição, redução na oxigenação de tecidos e foram detectados no sangue, na urina, na saliva e no líquido folicular (Wall *et al.*, 1988; Cinar *et al.*, 2014). Da mesma forma que o fumo, o consumo de álcool por uma mulher em idade reprodutiva também afeta sua fertilidade, causando principalmente desordens ovulatórias, dificuldade de engravidar, bem como complicações no curso de uma gravidez e no desenvolvimento fetal (Ornoy *et al.*, 2010). Há muitos anos se tem reportado o efeito do álcool no sistema reprodutivo, e cada vez mais se tem estudado os potenciais impactos e mecanismos envolvidos na infertilidade. A ingestão de álcool estaria relacionada com a diminuição nos níveis de estrogênio em mulheres que bebem moderadamente, e que o aumento do consumo levaria a um maior número de alterações no ciclo reprodutivo (Block *et al.*, 1993; Nicolau *et al.*, 2014). No que se refere à reprodução assistida, o uso de álcool por parte das pacientes pode estar relacionado a resultados clínicos e laboratoriais não satisfatórios. As potenciais explicações para isso podem envolver alterações na secreção hormonal hipotalâmica e gonadal, mudanças no ciclo reprodutivo, baixa produção folicular e baixas taxas de fertilização. Entretanto, ainda se precisa elucidar sobre os mecanismos responsáveis em cada etapa (Nicolau *et al.*, 2014; Firms *et al.*, 2015).

### **1.2.2 Tecnologia de Reprodução Assistida (TRA)**

Em centros de reprodução assistida, após intensa investigação da causa de infertilidade do casal, há o estabelecimento de um diagnóstico pelo médico especialista e direcionamento para tratamentos adequados, ou seja, aqueles que aumentem as

chances de gravidez, dependendo do problema existente. Esses tratamentos incluem testes e monitoramento da ovulação e de parâmetros seminais, e Tecnologia de Reprodução Assistida (TRA) (Marino *et al.*, 2011).

Desde 1978, ano do nascimento do primeiro bebê pela TRA na Inglaterra, os avanços nessas técnicas têm sido notórios e milhões de crianças já nasceram através desses procedimentos. Atualmente, a TRA é disponível pelo mundo todo e tem sido praticada com sucesso em larga escala (Niederberger *et al.*, 2018).

Em procedimentos de fertilização *in vitro*, os ovários são estimulados por uma combinação de medicamentos e então um ou mais oócitos são aspirados dos folículos ovarianos. Os oócitos são fertilizados em laboratório e, após dias de acompanhamento do desenvolvimento embrionário inicial, também em laboratório, um ou mais embriões são transferidos diretamente para a cavidade uterina (Azambuja *et al.*, 2017).

Mesmo com a intervenção dessas técnicas, o resultado nem sempre é o esperado, e a gravidez não ocorre. Observa-se que, mesmo com a estimulação ovariana controlada, muitos oócitos captados ainda são imaturos e, no caso dos maduros, o desenvolvimento embrionário subsequente nem sempre é satisfatório. Sendo assim, o sucesso do tratamento depende de muitas variáveis, tanto clínicas como laboratoriais, e torna-se cada vez mais importante o entendimento de cada uma delas (Junqueira *et al.*, 2019).

Neste contexto, o estudo dos mecanismos que regulam os processos reprodutivos, e em especial a qualidade dos gametas, se torna de extrema importância na medida em que pode vir a elucidar pontos críticos do desenvolvimento embrionário inicial e chegar até, no futuro, a levar ao aumento das chances de sucesso desses casais, seja *in vivo* ou através do aprimoramento da TRA.

### **1.2.3 Qualidade Oocitária:**

Um oócito viável é o principal determinante do desenvolvimento embrionário (Keefe *et al.*, 2015). Sua competência é definida como a capacidade para alcançar adequadamente plena maturação em níveis nucleares, citoplasmáticos e moleculares, para conseguir êxitos de fecundação e desenvolvimento embrionário inicial, e, finalmente, para levar à formação de um embrião viável (Sirard *et al.*, 2013).

Sabe-se que a qualidade dos oócitos obtidos durante os procedimentos de fertilização *in vitro* varia consideravelmente e nem todos os oócitos captados são classificados como maduros. Ainda, embora a maioria dos oócitos maduros captados sejam passíveis de fertilização, apenas uma parte dos fertilizados conseguirá completar o desenvolvimento embrionário, e poucos geram embriões viáveis com chance de implantação (Adriaenssens *et al.*, 2011).

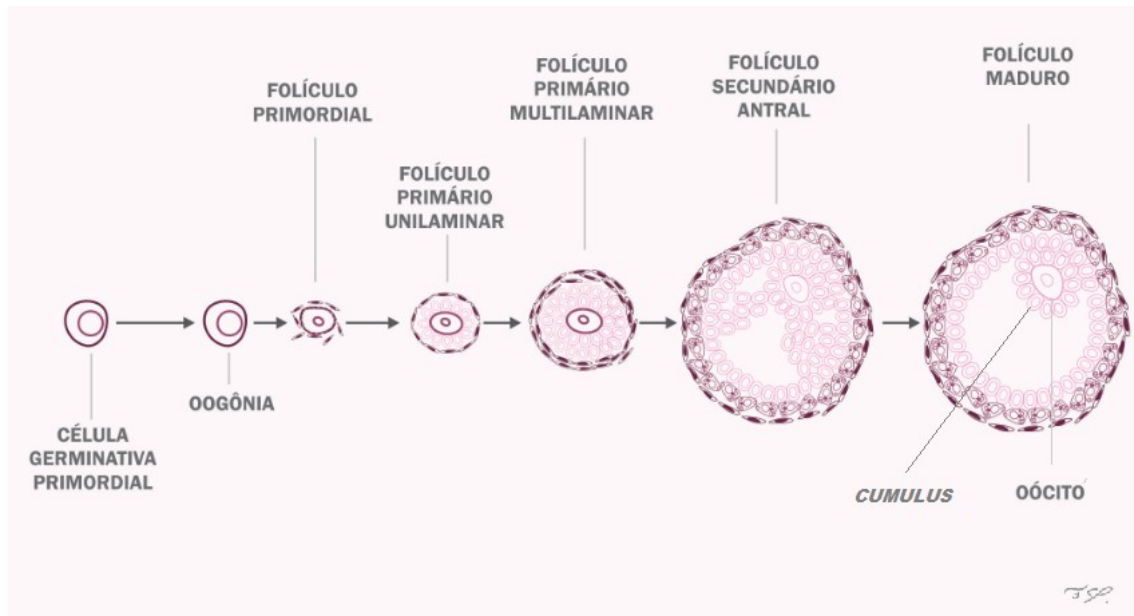
A qualidade do oócito é dependente do microambiente ovariano durante seu crescimento e maturação, e é um importante determinante do sucesso do desenvolvimento embrionário (Pohlmeier *et al.*, 2014). Muitos fatores afetam a qualidade oocitária e podem estar relacionados tanto a processos intrafoliculares que controlam a maturação nuclear e citoplasmática do oócito, como a fatores externos ao microambiente ovariano, como, por exemplo, o perfil e estilo de vida da mulher. Sendo assim, a busca por marcadores da qualidade do gameta feminino tem se focado na sinalização e no metabolismo celular ovariano, uma vez que as disfunções metabólicas e o envelhecimento materno afetam negativamente as interações do oócito com as células foliculares circundantes, influenciando no processo de maturação de um oócito competente e na ovulação (Patrizio *et al.*, 2009; Seli *et al.*, 2014).

#### **1.2.4 A Maturação Oocitária e a Ovulação:**

O ovário é um órgão dinâmico que apresenta um microambiente específico e responsivo a hormônios secretados pelo eixo hipotálamo-hipófise-ovário que regulam mecanismos como a maturação folicular (Albertini *et al.*, 2001). O ovário pode apresentar em seu estroma concomitantemente folículos em diferentes estágios de desenvolvimento, assim como corpo lúteo e elementos vasculares (Albertini *et al.*, 2001).

O desenvolvimento folicular humano (Figura 1), também conhecido como foliculogênese, ocorre em paralelo à gametogênese, onde há sinalizações bidirecionais entre as células somáticas ovarianas e o oócito no interior do folículo em crescimento. Folículos primordiais desenvolvem-se para uma coorte de folículos antrais, a partir dos quais apenas um folículo dominante é selecionado para liberar um oócito competente, ou seja, um oócito capaz de completar a meiose e ser viável à fertilização, dando início à embriogênese (Schramm *et al.*, 1999).

**Figura 1 - Desenvolvimento folicular humano:** Esquema simplificado do crescimento folicular, onde através da comunicação bidirecional entre as células foliculares e o oócito, os folículos em dominância apresentam expansão das células da granulosa e formação de antro.



Fonte: Baseado em Borges Jr *et al.*, 2011.

Cada mulher nasce com um número determinado de folículos nos dois ovários, e este número vai diminuindo gradualmente por conta da atresia e/ou recrutamento durante os eventos de ovulação. Durante o crescimento e maturação folicular, os folículos antrais iniciais respondem à regulação do eixo hipotálamo-hipófise-ovário, onde o hormônio folículo estimulante (FSH) é secretado pela hipófise a partir do estímulo pulsátil do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) liberado pelo hipotálamo (Elvin *et al.*, 1998). O FSH então irá impulsionar o crescimento folicular, bem como estimular a expressão dos receptores do hormônio luteinizante (LH) e a expressão da aromatase P450, responsável pela formação dos estrogênios. Estes últimos, por sua vez, agem localmente promovendo proliferação da granulosa (Craig *et al.*, 2007; Richards *et al.*, 2007).

Com o aumento dos níveis de estradiol na circulação, há uma diminuição nos níveis de FSH por retroalimentação negativa, o que resulta em atresia da coorte de folículos em crescimento. Entretanto, aquele folículo com um maior número de células da granulosa e com maior quantidade de receptores para o FSH não tem seu crescimento interrompido e se torna dominante, havendo estimulação para expressão de receptores

de LH (LHR) nas células murais da granulosa e de receptores do fator de crescimento epidermal (EGFR) nas células do *cumulus* (Erickson *et al.*, 1979). Na fase pré-ovulatória, a produção de estradiol atinge os níveis máximos, estimulando o hipotálamo e, conseqüentemente, estimulando a hipófise a secretar LH para que ocorra a ovulação (El-Hayek *et al.*, 2014).

A maturação final do oócito ocorre entre o pico de LH e a ovulação, onde há o reinício da meiose. Para isto, há a inibição de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) no oócito e o aumento da síntese de peptídeos da família do fator de crescimento epidermal (EGF) nas células da granulosa (Coticchio *et al.*, 2013; Uyar *et al.*, 2013). Estes peptídeos interagem com fatores derivados do oócito (Wigglesworth *et al.*, 2013; Sugimura *et al.*, 2014) e ativam os receptores de EGF, induzindo, através da via MAPK, o oócito primário a terminar a primeira divisão meiótica e dar origem ao oócito secundário (haploide) e ao primeiro corpúsculo polar (Van Den Hurk *et al.*, 2005). Durante ovulação, o oócito secundário inicia a segunda divisão meiótica, mas progride apenas até a metáfase, quando então a divisão é interrompida novamente. Apenas após a ovulação, e caso haja penetração de um espermatozoide no oócito, esta divisão meiótica será completada, com o oócito fertilizado e o segundo corpúsculo polar sendo liberado (Gougeon, 2004).

### **1.2.5 Relação entre as Células do *cumulus* e a Qualidade Oocitária:**

As células do *cumulus* são definidas como o grupo intimamente associado de células da granulosa que circundam o oócito no folículo antral. A organização estrutural destas células ao redor do oócito favorece uma interação bidirecional contínua. Ainda, são essas células que fornecem nutrientes para os oócitos e os protegem do estresse oxidativo (Matos *et al.*, 2009; Russel *et al.*, 2016). Esta íntima comunicação dos oócitos com as células do *cumulus* é um pré-requisito importante para a ovulação de um oócito competente, capaz de ser fertilizado (Dumesic *et al.*, 2015). De fato, as células do *cumulus* são relevantes para a aquisição de qualidade do oócito através da sua presença física e adesão célula-célula, sua morfologia e suas funções metabólicas e de transdução de sinal (Sugiura *et al.*, 2005). As células do *cumulus* representam um grupo distinto de células que não apenas respondem aos sinais intraovarianos para sua expansão e maturação do oócito, mas também expressam inúmeros fatores relacionados à resposta



imune e neuronal em resposta à ovulação, como forma de assegurar um ambiente estável e de proteção para o oócito (Hernandez-Gonzalez *et al.*, 2006).

### **1.2.6 Genes Expressos nas Células do *cumulus*:**

Parâmetros morfológicos das células do *cumulus* e do oócito propriamente dito têm sido as principais ferramentas utilizadas em laboratórios de reprodução assistida para selecionar oócitos com capacidade de gerar embriões viáveis (Dumesic *et al.*, 2015; Keefe *et al.*, 2015). Por outro lado, sabe-se que para realizar suas funções, as células do *cumulus* expressam ativamente um grande número de genes envolvidos em inúmeros processos celulares (Assou *et al.*, 2008) e, além disso, sua interação com o oócito é afetada por fatores intrínsecos e extrínsecos ao microambiente ovariano.

Nesse contexto, uma vez que o microambiente ovariano é sensível a oscilações do organismo como um todo, seja no perfil físico pessoal ou através dos hábitos, o estudo do transcriptoma das células do *cumulus* tem ganhado relativa significância ao tentar identificar genes que são expressos nestas células e podem estar envolvidos na determinação de qualidade dos oócitos (Assou *et al.*, 2006; Adriaenssens *et al.*, 2011).

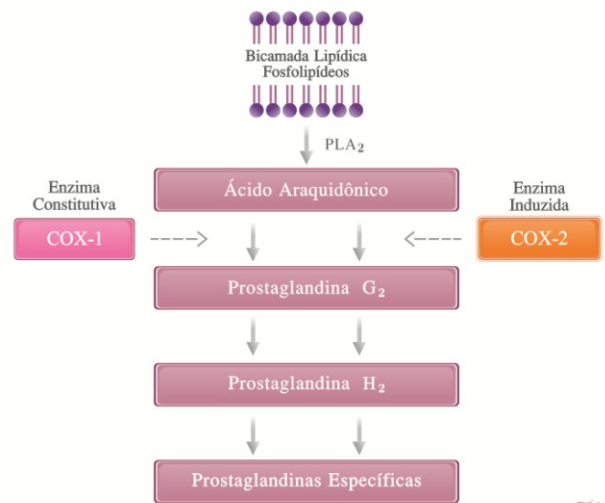
No presente estudo, foram escolhidos seis genes envolvidos em diferentes processos relacionados não somente a processos fisiológicos no organismo humano como um todo, mas como também à obtenção de um oócito competente. Tais genes e seus papéis estão detalhados a seguir.

#### **A) PTGS2 (Prostaglandina Endoperoxidase Sintase 2):**

O gene PTGS2 (do inglês *prostaglandin-endoperoxide synthase 2*), localizado em humanos no braço longo do cromossomo 1 na região 1q31.1 e com 10 éxons, codifica a enzima COX2 (ciclooxigenase 2). Esta enzima é um importante fator na biossíntese das prostaglandinas através da conversão do ácido araquidônico (AA), liberado a partir dos fosfolipídeos da membrana celular (Figura 2). Diferente da ciclooxigenase 1 (COX1), que também participa da formação das prostaglandinas, mas é expressa constitutivamente na maioria dos tecidos, a COX2 é uma enzima de expressão induzida, regulada por diversos estímulos, como mitógenos, citocinas, fatores de crescimento e promotores de tumores, e está presente principalmente em locais de

inflamação (Ohno *et al.*, 2005). No que diz respeito às prostaglandinas, sabe-se que estas são fatores químicos celulares presentes em todos os tecidos animais, sendo produzidas principalmente em locais de dano tecidual ou infecção, exercendo diversas funções metabólicas, tanto em processos fisiológicos como patológicos (Helliwell *et al.*, 2004; Seo *et al.*, 2017).

**Figura 2 - Biossíntese das prostaglandinas:** Esquema simplificado do papel da COX na biossíntese de prostaglandinas, com destaque para a COX2. O ácido araquidônico é liberado dos fosfolípidos de membrana pela fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) e convertido pela COX em prostaglandina G<sub>2</sub> e então em prostaglandina H<sub>2</sub>, que, por sua vez, é metabolizada em tipos específicos de prostaglandinas bioativas por diferentes sintases.



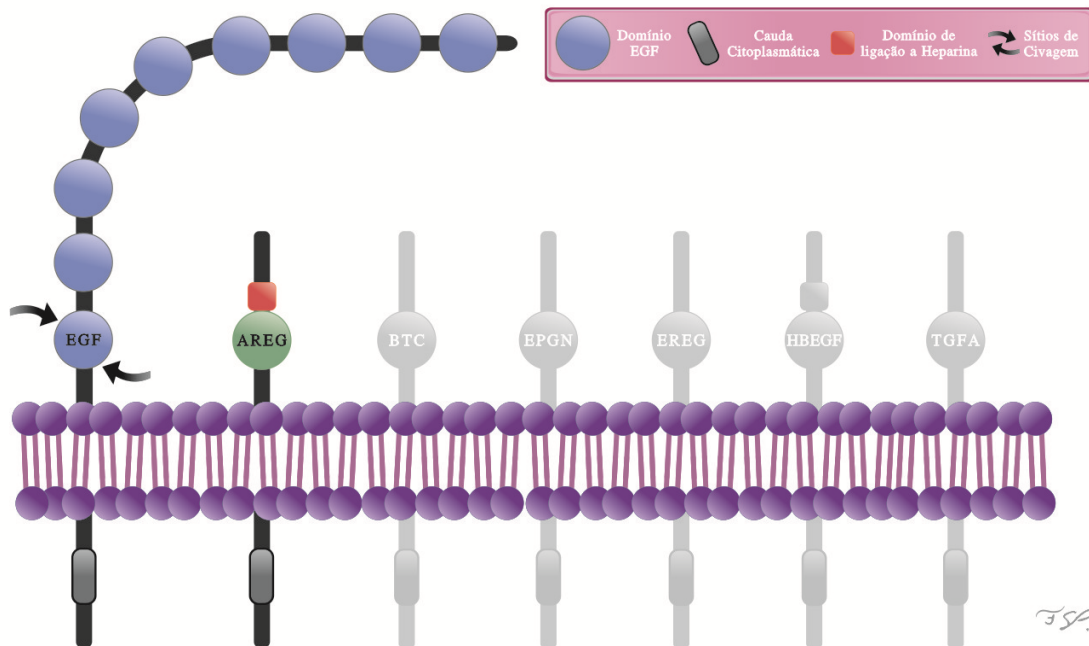
Fonte: Baseado em Smith *et al.*, 1996; e Pier *et al.*, 2018.

## B) AREG (Anfirregulina):

A anfirregulina (AREG), pertencente à família do EGF, é uma proteína de atuação autócrina, cujo gene possui 6 éxons e está localizado no braço longo do cromossomo 4 na localização 4q13.3 em humanos. Membros desta família são proteínas transmembrana que estão relacionadas de forma tanto estrutural como funcional, podendo ser proteoliticamente processadas e liberadas da superfície celular na sua forma de peptídeo maduro (Figura 3). Atuam de maneira autócrina e parácrina através da ligação com receptores EGF, possuindo funções no remodelamento tecidual e crescimento celular, e potencialmente intermediando a sinalização de receptores

acoplados à proteína G (Ashkenazi *et al.*, 2005; Schneider *et al.*, 2009; Richani *et al.*, 2018).

**Figura 3 – Família EGF:** Representação esquemática das formas precursoras das sete proteínas transmembrana da família do EGF em mamíferos, dando destaque a AREG.



Fonte: Modificado de Schneider *et al.*, 2009.

A anfíregulina foi inicialmente descrita por Shoyab *et al* (1988) e recebeu este nome “*amphi*”, do grego “dois lados”, devido aos seus efeitos de tanto inibir o crescimento de linhagens cancerígenas, como também promover e estimular o crescimento de muitas outras linhagens celulares (Shoyab *et al.*, 1988). A forma precursora da AREG é sintetizada como um peptídeo transmembrana de 252 aminoácidos que passa por ação de proteases que originam a forma madura com 78 a 84 peptídeos. Modificações após tradução resultam em peptídeos com diferentes isoformas solúveis e de membrana (Harris *et al.*, 2003).

Um dos primeiros relatos do envolvimento de EGF em funções reprodutivas se deu a partir do trabalho de Dekel e Sherizly em 1985, quando se observou que, ao contrário do que se esperava o EGF não interferiu na ação do estímulo *in vitro* pelo hormônio luteinizante (LH) em folículos imaturos de ratas, mas atuou como indutor da maturação oocitária, mesmo desconhecendo os exatos mecanismos para isto (Dekel *et al.*, 1985). Mais tarde, um grupo testou a hipótese de que membros da família do EGF

estariam cumprindo o papel de propagar sinais tanto de forma autócrina como parácrina do estímulo do LH. Neste trabalho, em modelo de cultura folicular de camundongo, fatores da família EGF, incluindo AREG, estavam tendo sua expressão induzida pelo LH, levando a expansão do *cumulus* e maturação oocitária. A ligação desses fatores com receptores EGFR era fundamental para a propagação do sinal e ação do LH (Park *et al.*, 2004). Já está bem estabelecido que a rede EGF contribui para o desenvolvimento da competência do oócito, uma vez que oócitos pré ovulatórios não expressam receptores LH, e estes fatores, incluindo AREG, estariam agindo como moléculas secundárias na propagação do estímulo (Richani *et al.*, 2018). Também já foi demonstrada correlação positiva entre a expressão de AREG induzido por LH em células da granulosa e do *cumulus* em ciclos de fertilização *in vitro* e o subsequente sucesso em parâmetros laboratoriais como o número de oócitos recuperados após aspiração folicular e alta qualidade embrionária (Huang *et al.*, 2015).

### **C) CYP19 (aromatase):**

A aromatase, membro da superfamília de enzimas monooxigenases Citocromo P450, é codificada pelo gene CYP19 e possui papel relevante na biossíntese de estrogênio. Em humanos, este gene localiza-se no braço longo do cromossomo 15 (15q21.2) e possui 18 éxons.

A biossíntese do estrogênio ocorre tanto em ovários e testículos, como em outros tecidos e órgãos, incluindo tecido adiposo, cérebro e fígado (Piriu *et al.*, 2015). A formação desses hormônios esteroides envolve várias etapas de transformações estruturais que se iniciam pelo colesterol e terminam com o estradiol-17 $\beta$ , onde nesse meio a aromatase é uma enzima chave que catalisa a conversão de precursores andrógenos em estrogênio (Cui *et al.*, 2013; Vrtačnik *et al.*, 2014). Além de atuar como um hormônio sexual, tendo papel no crescimento folicular, ovulação e estabelecimento de características sexuais femininas, o estrogênio também participa de diversas outras funções no corpo, como da homeostase da glicose e lipídios, do metabolismo ósseo e de funções cerebrais (Gillies *et al.*, 2010).

Nos ovários, a proteína aromatase é expressa em células da granulosa/*cumulus* e células do corpo lúteo, sendo estimulada e regulada pelo hormônio folículo estimulante (FSH), através da ação de AMPc indiretamente sobre o promotor II do gene CYP19.

Seus níveis, mesmo que em quantidades relativamente baixas, estão presentes mesmo antes do nascimento nas células da granulosa de folículos primordiais, quando sua expressão começa a aumentar gradualmente em folículos pré antrais e antrais logo após o nascimento. Novamente, a expressão de aromatase começa a baixar nesses folículos após o período neonatal, e passa a limitar-se apenas naqueles folículos antrais maiores durante a infância e puberdade (Stocco, 2008).

A aromatase e seu produto, o estrogênio intrafolicular, possuem papel obrigatório na função reprodutiva, atuando na foliculogênese e no estabelecimento da competência oocitária (Hamel *et al.*, 2008). Além do FSH, o próprio estrogênio atua como um indutor da aromatase, através da sua ligação com receptor e propagação de *feedback* positivo nas células foliculares, estimulando a esteroidogênese (Zhuang *et al.*, 1982). Níveis alterados de aromatase e, conseqüentemente estrogênio, têm sido relacionados a algumas patologias, incluindo a infertilidade, uma vez que a esteroidogênese pelas células do *cumulus* é fundamental para o sucesso da maturação oocitária (Jamnongjit *et al.*, 2005; Barcelos *et al.*, 2015; Hosseini *et al.*, 2016).

#### **D) CSE (cistationa gama-liase):**

A cistationa gama-liase (CSE) é uma enzima que participa da formação de sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ), juntamente com outra enzima denominada cistationa beta-sintase (CBS) a partir do metabolismo da L-cisteína. Em humanos, o gene da CSE está localizado no braço curto do cromossomo 1, localização 1p31.1, apresentando 13 éxons.

O sulfeto de hidrogênio, por sua vez, foi identificado como um mediador gasoso endógeno semelhante ao monóxido de carbono e ao óxido nítrico em mamíferos, atuando não apenas com efeitos neuromediadores, mas também como relaxante muscular em diversos sistemas corporais (Lowicka *et al.*, 2007). Altas taxas de produção de  $H_2S$  foram descritas no cérebro, no sistema cardiovascular, no fígado e nos rins (Szabo, 2007), e a maioria dos trabalhos estudaram seu papel em processos tanto fisiológicos como patológicos, como na secreção de íons, na proliferação e migração de células endoteliais, na inflamação, em doenças neurodegenerativas e em distúrbios metabólicos, incluindo obesidade e diabetes (Sun *et al.*, 2016; Kanagy *et al.*, 2017).

Até o presente momento, alguns grupos já identificaram a expressão de enzimas produtoras de  $H_2S$  e a própria produção endógena deste gás em sistemas reprodutivos

femininos de várias espécies de mamíferos, o que indicaria um papel vital do H<sub>2</sub>S neste campo (Sun *et al.*, 2016). Entretanto, o papel exato do H<sub>2</sub>S no processo de ovulação ainda não foi determinado.

#### **E) FGF 2 e 18 (fatores de crescimento de fibroblasto 2 e 18):**

A família do fator de crescimento de fibroblastos (FGF) é um grupo de proteínas envolvidas em diversos processos biológicos, onde em sua grande maioria são secretadas e agem através de ligação com receptores transmembrana. Em mamíferos, essa família engloba 18 diferentes proteínas agrupadas em subfamílias de acordo com sua homologia (Itoh *et al.*, 2004). Estando presentes como moléculas de sinalização celular, os FGF possuem papéis conhecidos na morfogênese e proliferação celular, também atuando no sistema reprodutivo, como no caso do desenvolvimento gonadal e diferenciação sexual (Koike *et al.*, 1994; Ornitz *et al.*, 2015; Estienne *et al.*, 2018).

Os FGF já foram muito estudados em relação à função ovariana e o desenvolvimento embrionário, onde são bem conhecidos como reguladores parácrinos na comunicação bidirecional oócito-células foliculares (Van den Hurk *et al.*, 2005), sendo descritos como peças críticas na foliculogênese ovariana em mamíferos (Matos *et al.*, 2007). Visto sua importância, alterações na expressão de FGF estariam envolvidas com o desenvolvimento de doenças ovarianas em humanos, como falência ovariana prematura, defeitos de fase lútea, e câncer de ovário (Chaves *et al.*, 2012).

O **FGF2** é uma das proteínas membro da grande família FGF, sendo uma das mais estudadas por estimular uma variedade de processos fisiológicos em diversos tecidos, como a proliferação celular, diferenciação, migração e apoptose (Chaves *et al.*, 2012). Em humanos, seu gene está localizado no braço longo do cromossomo 4 (4q28.1), apresentando 3 éxons. Diversos estudos *in vitro* relatam forte evidência do envolvimento deste fator atuando de forma parácrina na regulação da ativação de folículos primordiais e sua sobrevivência (Riedel *et al.*, 2000; Matos *et al.*, 2007). Também já foi vista relação deste fator na prevenção de eventos apoptóticos, atuando tanto a nível genômico como através de ações pontuais. Um exemplo deste último seria através da manutenção dos níveis normais de cálcio (Ca<sup>2+</sup>) intracelular livre, favorecendo a homeostase e viabilidade das células da granulosa (Peluso *et al.*, 2001). Gabler *et al* (2004) detectaram a expressão de FGF2 em células do *cumulus* de bovinos,

e outros grupos já mostraram relação deste fator na embriogênese, onde se sugeriu que a suplementação de FGF2 estaria envolvida na proliferação de células trofoblásticas de blastocistos de bovinos quando cultivados *in vitro* (Gabler *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2017).

Outro fator da família dos FGF é o **FGF18**, fortemente expresso em oócitos de camundongos (Zhong *et al.*, 2006), e em células da teca, células da granulosa e células do corpo lúteo de bovinos (Portela *et al.*, 2010). Até o presente momento, poucos trabalhos estudaram a relação desta proteína com o sistema reprodutivo. Portela *et al.* (2010) mostraram pela primeira vez uma possível atuação deste fator na promoção da apoptose, dado bastante interessante, uma vez que membros da família FGF são conhecidos pelos seus efeitos mitóticos e proliferativos. Neste trabalho, o FGF18 alterou a progressão no ciclo celular em bovinos, através da diminuição do número de células na fase S, junto com o aumento de células em atresia (Portela *et al.*, 2010; Portela *et al.*, 2015). Em humanos, o gene que codifica o FGF18 está localizado no braço longo do cromossomo 5 (5q35.1) com 5 éxons, e ainda não está estabelecida a real função desta proteína em células ovarianas e sua relação com o sistema reprodutivo.

### 1.2.7 Hipóteses:

- O perfil da mulher, como a idade avançada (> 35 anos) e o IMC elevado (> 25 kg/m<sup>2</sup>), e hábitos comportamentais, como o consumo de álcool e o tabagismo, são fatores de risco para a diminuição da expressão de genes importantes para a maturação oocitária e ovulação;
- O perfil da mulher, como a idade avançada (> 35 anos) e o IMC elevado (> 25 kg/m<sup>2</sup>), e hábitos comportamentais, como o consumo de álcool e o tabagismo, prejudicam o desenvolvimento embrionário inicial.

## **2. OBJETIVOS:**

### **2.1 OBJETIVO GERAL:**

Analisar a influência do perfil de idade e IMC, bem como os hábitos comportamentais de consumo de álcool e tabagismo, sobre a expressão dos genes **PTGS2**, **AREG**, **CYP19**, **CSE**, **FGF2** e **FGF18**, e sobre o desenvolvimento embrionário *in vitro*.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Comparar a expressão de cada gene em células do *cumulus* de oócitos de pacientes com perfis diferentes, no que se referem à idade, IMC, e hábitos comportamentais de consumo de álcool e tabagismo;
- Comparar taxas oocitárias e do desenvolvimento embrionário inicial *in vitro* em pacientes com perfis diferentes, no que se referem à idade, IMC, e hábitos comportamentais de consumo de álcool e tabagismo.



### **3. MATERIAL E MÉTODOS:**

#### **3.1 Pacientes e Delineamento do Estudo:**

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina/UFSC - CEPESH-UFSC sob o número de parecer 3.344.851. Estudo de caráter experimental, pacientes da Clínica Fecondare, situada na cidade de Florianópolis/SC, que concordaram em participar e assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1) foram incluídas no estudo, totalizando 22 pacientes.

As pacientes do estudo compuseram um grupo de mulheres em tratamento de fertilização *in vitro*, brasileiras, residentes do Sul do país, com média de idade de 35,83 anos, média de 62,25 Kg e 1,64 m de altura.

O termo foi explicado e fornecido pelo médico clínico responsável da paciente antes de iniciar a indução ovariana. Visto que para a utilização dos oócitos na fertilização *in vitro* as células do *cumulus* são separadas e descartadas, sua utilização para a pesquisa não implicou em prejuízo para as pacientes e para a clínica de reprodução.

A seleção de pacientes, bem como a indução ovariana e a coleta das células do *cumulus* foram realizadas na Clínica Fecondare. O laboratório de fertilização *in vitro* da Clínica dispõe espaço e infraestrutura necessária para tal procedimento. Os experimentos que envolvem extração de RNA e PCR em tempo real foram realizados no Laboratório de Fisiologia da Reprodução Animal (LAFRA) da Universidade da Federal de Santa Catarina - UFSC, Campus de Curitibanos/SC, e no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB/UFSC), Campus de Florianópolis/SC, contando com equipamentos como freezer, geladeira, fluxo laminar, autoclave e PCR em tempo real.

Juntamente com o termo de consentimento, as pacientes também receberam um questionário (Anexo 2) a ser respondido com relação às suas características físicas e hábitos comportamentais.

A partir da análise retrospectiva dos questionários e respostas dadas, as informações foram organizadas e as 22 pacientes foram identificadas com relação à idade, IMC, ingestão de álcool (na quantidade de pelo menos uma vez por semana) e tabagismo (se já fumaram alguma vez e/ou se ainda fumam). Com essas informações, as pacientes foram agrupadas em diferentes momentos/grupos para análise, como detalhado abaixo:

**Grupo 1:**

A) Pacientes com  $\leq 35$  anos (n = 13 pacientes);

B) Pacientes com  $> 35$  anos (n = 9 pacientes).

**Grupo 2:**

A) Pacientes com IMC  $\leq 25$  kg/m<sup>2</sup> (n = 15 pacientes);

B) Pacientes com IMC  $> 25$  kg/m<sup>2</sup> (n = 7 pacientes).

**Grupo 3:**

A) Pacientes que não consomem álcool (n = 8 pacientes);

B) Pacientes que consomem álcool (n = 14 pacientes).

**Grupo 4:**

A) Pacientes que nunca fumaram (n = 16 pacientes);

B) Pacientes que já fumaram ou fumam (n = 6 pacientes).

**Grupo 5:**

A) Pacientes que não consomem álcool e nunca fumaram (n = 8 pacientes);

B) Pacientes que consomem álcool e/ou já fumaram/fumam (n = 14 pacientes).

**Grupo 6:**

A) Pacientes com idade  $\leq 35$  anos e IMC  $\leq 25$  kg/m<sup>2</sup> (n = 10 pacientes);

B) Pacientes com idade  $> 35$  anos e/ou IMC  $> 25$  kg/m<sup>2</sup> (n = 12 pacientes).

As 22 pacientes incluídas neste estudo foram agrupadas em momentos/grupos distintos, de acordo com o perfil a ser analisado de cada vez. Cada momento de análise estratificou as pacientes em dois grupos de comparação (A e B), como detalhado acima, onde de um lado ficaram todas as mulheres que apresentaram determinado perfil e no outro, controle, as pacientes que não apresentaram este mesmo perfil. Visto que uma pessoa pode apresentar mais de uma característica e/ou comportamento, pacientes tiveram presentes em mais de um momento de análise.

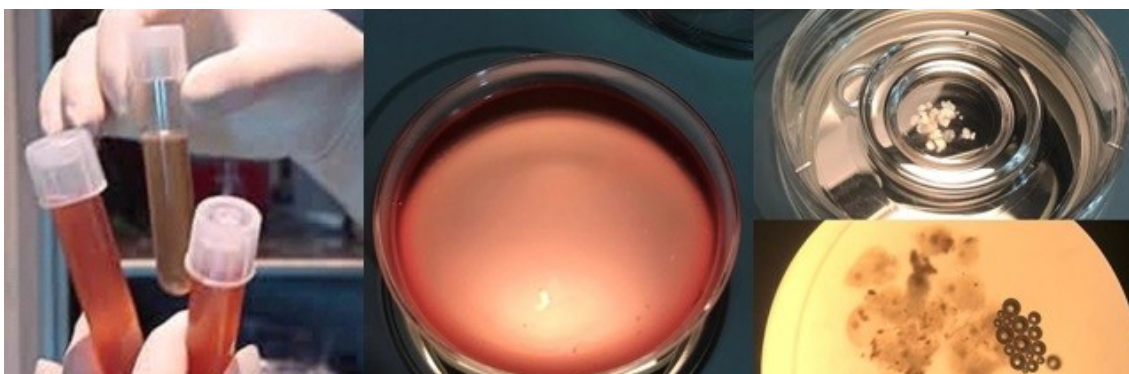
### 3.2 Estímulo Ovariano:

O protocolo de estimulação ovariana de preferência baseou-se na utilização de análogos do hormônio liberador de gonadotrofinas (antagonista do GnRH), estímulo com FSH e LH, e desencadeamento final com administração de hCG.

### 3.3 Obtenção das Células do Cumulus:

Na Clínica Fecondare, pacientes em tratamento de reprodução assistida passaram por hiperestimulação ovariana controlada e, através de aspiração folicular aproximadamente 36 horas após a administração do hCG, complexos *cumulus*-oócitos foram identificados e separados (Figura 4).

**Figura 4 – Complexos Cumulus-Oócitos:** Identificação e separação dos complexos *cumulus*-oócitos a partir da aspiração folicular. Durante punção ovariana, o líquido folicular foi recolhido em tubos, sendo o conteúdo despejado em placas de petri. CCO foram identificados com auxílio de estereomicroscópio e separados em placas com meio nutritivo GIVF Plus Vitrolife. Todo manuseio dos CCO se deu através de pipeta Pauster de vidro.



Fonte: Arquivo Clínica Fecondare.

A partir dos CCO, as células do *cumulus* de cada paciente foram separadas por desnudação, onde inicialmente os CCO ficaram 30 segundos em contato com a enzima hialuronidase 40 U, passando em seguida por sucessivas pipetagens em capilares de 135  $\mu\text{m}$  de diâmetro em meio Hepes 10% Soro Sintético Substituto Irvine Scientific, de

forma que as células do *cumulus* se soltassem do oócito no meio. Então, as células do *cumulus* separadas foram coletadas e congeladas em *Buffer* RLT suplementado com beta-mercaptoetanol, e transportadas ao laboratório LAFRA acondicionadas em gelo seco.

### **3.4 Avaliação da Qualidade Oocitária e do Desenvolvimento Embrionário in vitro:**

Valores laboratoriais relacionados às taxas oocitárias e do desenvolvimento embrionário inicial no laboratório de fertilização *in vitro* de cada paciente foram tabelados a partir da análise de prontuários. O método de fertilização *in vitro* utilizado foi a Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoide (ICSI).

Foram consideradas as seguintes informações:

- Número de CCOs coletados;
- Taxa de oócitos maduros;
- Taxa de fertilização;
- Taxa de clivagem embrionária, onde se considerou como embriões clivados aqueles com 2 células ou mais;
- Taxa de blastocistos, onde se considerou formação de blastocistos a partir da presença de blastocele;
- Beta-hCG positivo (Gestação).

### **3.5 Extração de Ácidos Nucleicos e Reação de Transcriptase Reversa:**

O RNA total foi extraído utilizando um Kit de extração de RNA por coluna (RNeasy mini kit, Qiagen), de acordo com instruções do fabricante, e quantificado por espectrofotometria a 260 nm. Para a digestão de DNA contaminante, o RNA total (1 µg) foi tratado com 1 U de DNase (Promega, Madison, WI) a 37 °C por 30 minutos e posterior incubação a 65 °C por 10 minutos.

O RNA foi submetido à transcrição reversa através da adição de 1 mM de iniciador oligo (dT) e 4 U de Omniscript RTase (Omniscript RT Kit, Qiagen, Mississauga, ON), 0,25 mM da mistura de trifosfato de dideoxi-nucleotídeo (dNTP) e 19,33 U de inibidor de RNase (GE Healthcare, Baie D'Urfé, QC) em um volume total

de 20 µl a 42 °C por 2 h. A reação foi finalizada mediante incubação a 93°C por 5 minutos. A mesma concentração de RNA foi utilizada para todas as pacientes.

### 3.6 RT-qPCR:

Todos os genes propostos foram mensurados por qPCR em tempo real em um termociclador MX3000P Stratagene, Agilent/GE, utilizando como reagente Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). No presente estudo foram utilizados parâmetros térmicos cíclicos comuns (3 minutos a 95 °C, 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C e 30 segundos a 72 °C) usados para amplificar cada transcrito. Para verificar a identidade e especificidade do produto, foram realizadas análises de curvas de dissociação de cada transcrito. As amostras foram processadas em duplicatas e expressas relativamente ao GAPDH como gene constitutivo. Os dados então foram normalizados com uma amostra utilizada como calibrador através do método  $\Delta\Delta C_t$  com correção para a eficiência de amplificação (Pfaffl, 2001).

Os iniciadores utilizados para cada gene estão listados na Figura 5.

**Figura 5 - Sequências dos Genes Avaliados.**

GENE	SEQUÊNCIA (5'- 3')	CONCENTRAÇÃO (nM)
GAPDH F	GGTGAAGGTCGGAGTCAACGGA	200
GAPDH R	GAGGGATCTCGCTCCTGGAAGA	200
PGTS2 F	CCCTTGGGTGTCAAAGGTAA	200
PGTS2 R	GCCCTCGTTATGATCTGTC	200
AREG F	AGAGTTGAACAGGTAGTTAAGCCCC	200
AREG R	GTCGAAGTTTCTTTCGTTTCCTCAG	200
CYP19 F	GACTCTAAATTGCCCCCTCTG	200
CYP19 R	CAGAGATCCAGACTCGCATG	200
CSE F	AGCCTTCATAATAGACTTCG	200
CSE R	CAGCCCAGGATAAATAAC	200
FGF2 F	ACGGCGTCCGGGAGAA	200
FGF2 R	CACTCCCTTGATGGACACAAC	200
FGF18 F	GGACATGTGCAGGCTGGGCTA	200
FGF18 R	GTAGAATTCCGTCTCCTTGCCCTT	200

Legenda: F: *forward*; R: *reverse*.

### **3.7 Análises Estatísticas:**

Os dados que não apresentaram distribuição normal (Shapiro-Wilk test) foram transformados em logaritmos. A homogeneidade de variância das amostras foi avaliada com os testes O'Brien e Brown-Forsythe. A análise dos dados foi realizada com o programa estatístico JMP (SAS Institute), e as médias de expressão de cada gene, assim como as médias das taxas laboratoriais, foram calculadas estratificando as pacientes de acordo com os momentos/grupos citados no item 3.1. As diferenças entre as médias foram testadas através do Teste t de Student. Os dados foram apresentados como médias/erro padrão com grau de significância de  $P < 0,05$ .

#### 4. RESULTADOS:

O presente estudo foi o primeiro a estudar uma possível relação direta da idade, IMC e hábitos comportamentais (consumo de álcool e tabagismo) de mulheres em tratamento de reprodução assistida sobre a expressão dos genes PTGS2, AREG, CYP19, CSE, FGF2 e FGF18 no contexto da aquisição de qualidade oocitária. Diferenças entre os grupos comparados foram encontradas tanto com análise de perfis ou hábitos isolados (Item 4.1) quanto com a análise feita a partir da combinação dessas características pessoais (Item 4.2). A respeito do impacto do perfil e/ou hábitos dessas mulheres sobre as taxas laboratoriais de seus ciclos de fertilização *in vitro*, também foram observadas diferenças (Item 4.3) que se somam ao que vem sendo descrito na literatura atual.

##### 4.1 Expressão gênica nos perfis e hábitos comportamentais estudados (Grupos 1-4).

Quando pacientes foram agrupadas de acordo com os perfis estudados de idade, IMC ou seus hábitos comportamentais de ingestão de álcool e tabagismo, foram encontradas diferenças nas médias de expressões de genes importantes no processo de maturação oocitária e ovulação em células do *cumulus* de oócitos de mulheres submetidas a um protocolo hormonal de estímulo ovariano em fertilização *in vitro*.

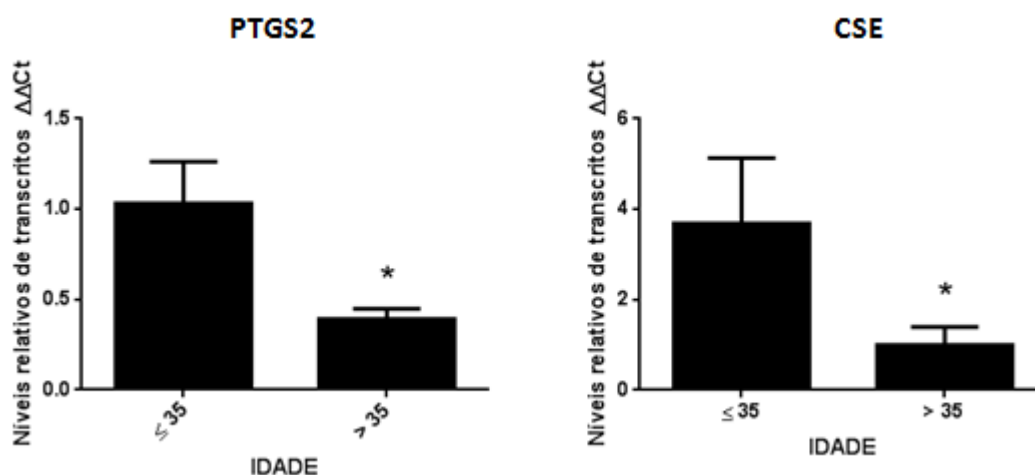
No que diz respeito à idade destas pacientes, mulheres com idade menor ou igual a 35 anos tiveram uma expressão maior de PTGS2 quando comparadas a mulheres com mais de 35 anos ( $t= 2,847$ ;  $df= 17$ ;  $p = 0,0111$ ). Da mesma forma, pode-se observar com relação ao gene CSE, onde sua expressão foi maior também em pacientes com idade menor ou igual a 35 anos do que em pacientes com mais de 35 anos ( $t= 2,236$ ;  $df= 17$ ;  $p= 0,0390$ ) (Figura 6). Para os outros genes analisados, tais como AREG, CYP19, FGF2 e FGF18, não houve diferença na média de expressão entre pacientes dessas diferentes faixas etárias.

Quando estudada a relação de hábitos comportamentais sobre a expressão gênica, foi encontrada diferença nas médias de expressão dos genes PTGS2 ( $t= 2,51$   $df= 18$ ;  $p= 0,0219$ ), CYP19 ( $t= 3,192$   $df= 17$ ;  $p= 0,0053$ ) e FGF2 ( $t= 2,105$   $df= 19$ ;  $p= 0,0489$ ), onde a média de expressão de cada gene foi menor em mulheres que

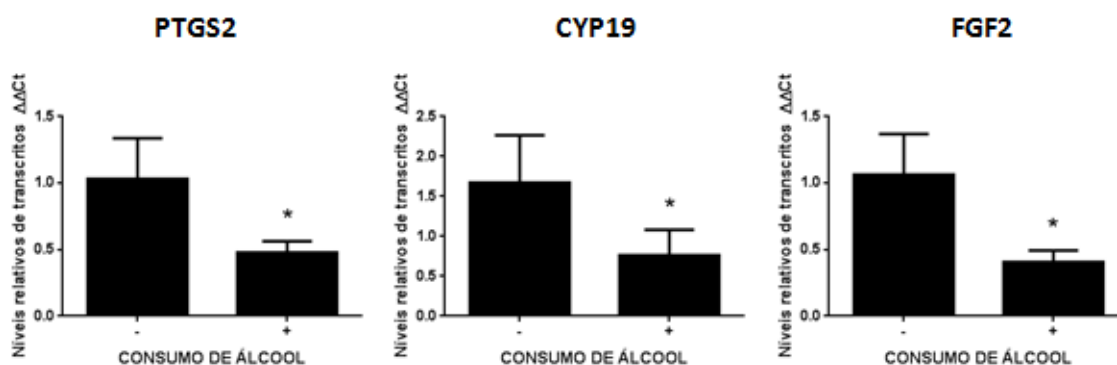
consomem álcool do que naquelas que não consomem álcool (Figura 7). As médias de expressão dos genes AREG, CSE e FGF18 não foram diferentes neste grupo.

Pacientes também foram agrupadas conforme seu IMC, estando, de um lado, mulheres com  $IMC \leq 25 \text{ kg/m}^2$ , e de outro, mulheres com  $IMC > 25 \text{ kg/m}^2$ . Entretanto, não foi observada qualquer diferença na média de expressão dos seis genes estudados neste grupo. O mesmo ocorreu quando houve a estratificação de pacientes conforme o hábito comportamental tabagismo, onde houve diferença na expressão de nenhum gene entre pacientes que nunca fumaram e pacientes que fumam ou já fumaram.

**Figura 6 - Expressão gênica em relação à idade:** Representação dos níveis de expressão dos genes PTGS2 e CSE que foram diferentes entre pacientes com idade menor ou igual a 35 anos ( $\leq 35$ ) e pacientes com idade maior que 35 anos ( $> 35$ ). (\*)  $p < 0,05$ .



**Figura 7 - Expressão gênica em relação ao consumo de álcool:** Representação dos níveis de expressão dos genes COX2, CYP19 e FGF2 que foram diferentes entre pacientes que não consomem álcool (-) e pacientes que consomem álcool (+). (\*)  $p < 0,05$ .





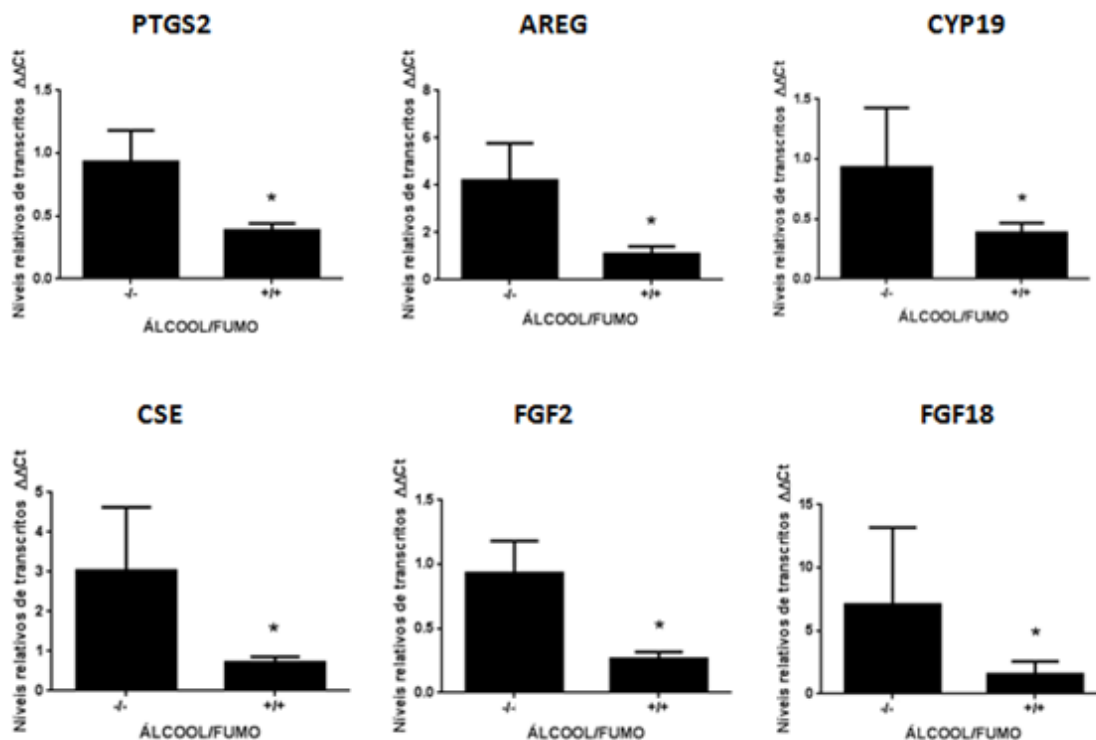
#### **4.2 Expressão gênica nos perfis e hábitos comportamentais combinados (Grupos 5-6).**

Avaliando que a idade e IMC compreendem características de perfil da paciente, assim como o ato de consumir álcool e fumar dizem respeito a hábitos comportamentais, também foram realizadas análises combinando os grupos.

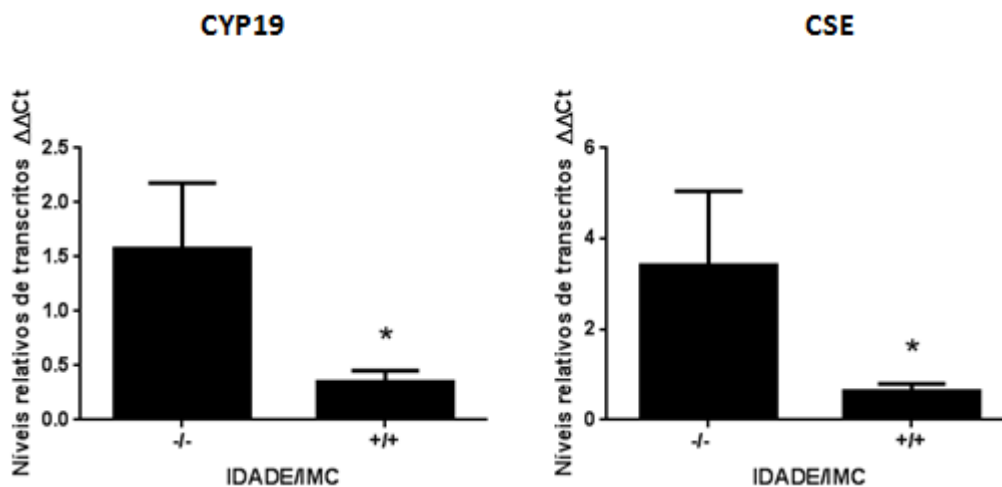
No estudo entre mulheres que consomem álcool e/ou já fumaram/fumam e mulheres que não consomem álcool e nunca fumaram as médias de expressão de cada um de todos os seis genes PTGS2 ( $t= 3,615$ ;  $df= 17$ ;  $p= 0,0021$ ), AREG ( $t= 2,62$   $df= 18$ ;  $p= 0,0174$ ), CYP19 ( $t= 2,703$   $df= 19$ ;  $p= 0,0141$ ), CSE ( $t= 2,664$   $df= 18$ ;  $p= 0,0158$ ), FGF2 ( $t=3,11$   $df=18$ ;  $p=0,0060$ ) e FGF18 ( $t= 2,342$   $df= 18$ ;  $p= 0,0309$ ) foram maiores em pacientes que não consomem álcool e nunca fumaram (Figura 8).

Já quando idade e IMC foram combinados, resultando na comparação entre pacientes com idade menor ou igual a 35 anos e IMC menor ou igual a  $25 \text{ kg/m}^2$  e pacientes com idade maior que 35 anos e/ou IMC maior que  $25 \text{ kg/m}^2$ , as médias de expressão dos genes CYP19 ( $t= 2,445$   $df= 16$ ;  $p= 0,0264$ ) e CSE ( $t= 2,3$   $df= 18$ ;  $p= 0,0336$ ) foram maiores no grupo combinado de mulheres com idade menor ou igual a 35 anos e IMC menor ou igual a  $25 \text{ kg/m}^2$  em relação a mulheres com idade maior que 35 anos e/ou IMC maior que  $25 \text{ kg/m}^2$  (Figura 9). Os demais genes não mostraram diferença na expressão gênica nesses parâmetros de análise.

**Figura 8 - Expressão gênica em relação aos hábitos comportamentais de consumir álcool e/ou fumar:** Representação dos níveis de expressão dos genes COX2, AREG, CSE, CYP19, FGF2 e FGF18 que foram diferentes entre pacientes que consomem álcool e/ou já fumaram/fumam (+/+) e pacientes que não consomem álcool e nunca fumaram (-/-). (\*)  $p < 0,05$ .



**Figura 9 - Expressão gênica em relação ao perfil da paciente (idade e IMC).** Representação dos níveis de expressão dos genes CYP19 e CSE que foram diferentes entre pacientes com idade menor ou igual a 35 anos e IMC menor ou igual a 25 kg/m<sup>2</sup> (-/-) e pacientes com idade maior que 35 anos e/ou IMC maior que 25 kg/m<sup>2</sup> (+/+). (\*)  $p < 0,05$ .

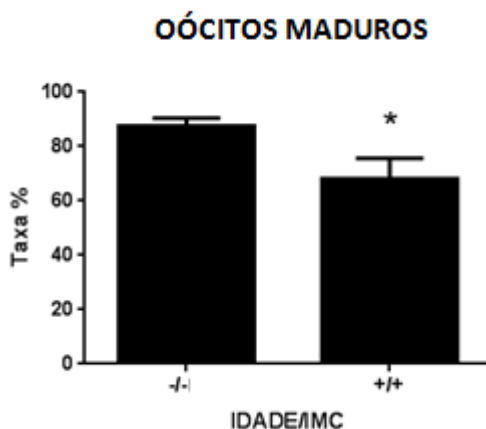


### 4.3 Dados clínicos laboratoriais.

Quando as taxas de dados clínicos laboratoriais dos ciclos de fertilização *in vitro* das pacientes em estudo foram avaliadas de acordo com o perfil dessas mulheres, a taxa de oócitos maduros coletados mostrou diferença ( $t= 2,723$   $df= 17$ ;  $p= 0,0145$ ), sendo menor em ciclos de pacientes com idade maior que 35 anos e/ou IMC maior que 25  $kg/m^2$  quando relacionada às pacientes com idade menor ou igual a 35 anos e IMC menor ou igual a 25  $kg/m^2$  (Figura 10). Para os demais grupos de perfis de pacientes, este dado clínico não mostrou diferença.

Os outros dados clínicos dos ciclos de fertilização *in vitro*, tais como taxa de oócitos coletados, taxa de fertilização, taxa de clivagem embrionária, taxa de blastocistos e taxa de gestação não mostraram diferença quando comparados entre os grupos formados de acordo com os distintos perfis e hábitos das pacientes.

**Figura 10 - Oócitos maduros em relação ao perfil da paciente:** Representação da taxa de oócitos maduros que foi diferente entre pacientes com idade menor ou igual a 35 anos e IMC menor ou igual a 25  $kg/m^2$  (-/-) e pacientes com idade maior que 35 anos e/ou IMC maior que 25  $kg/m^2$  (+/+) (\*)  $p < 0,05$ .





## 5. DISCUSSÃO:

Os mecanismos e vias pelos quais o perfil e hábitos comportamentais de uma mulher impactam na sua vida reprodutiva não estão totalmente elucidados, razão pela qual o estudo das diversas variáveis em relação à fertilidade se torna importante, na medida em que vai compondo peça fundamental de uma grande, complexa e ainda pouca conhecida rede. O presente trabalho procurou avaliar uma possível relação entre diferentes perfis e hábitos comportamentais de mulheres, com o objetivo de identificar se esses fatores estariam alterando a expressão de genes importantes para a ovulação e o desenvolvimento embrionário inicial, bem como o curso do desenvolvimento embrionário em laboratório.

Inicialmente, foram avaliados seis genes (PTGS2, AREG, CYP19, CSE, FGF2 e FGF18) nos grupos separados por idade, IMC, hábito de consumir álcool e hábito de fumar. Encontrou-se diferença nos grupos separados por idade e naqueles identificados pelo consumo de álcool.

A idade é um dos maiores comprometedores da fertilidade feminina, e seu avanço vem acompanhado de um processo biológico complexo que resulta na interação de fatores intrínsecos e extrínsecos durante a degeneração das estruturas e tecidos corporais, havendo um desequilíbrio do ambiente interno, um declínio de funções e a perda de adaptação e resistência (Huang *et al.*, 2019). Com o passar dos anos e, principalmente depois dos 35 anos de idade, a reserva ovariana da mulher diminui consideravelmente, além da qualidade de seus oócitos que também é prejudicada (Kuohung *et al.*, 2015). O declínio da reserva ovariana, em outras palavras, significa que, à medida que a idade aumenta, um número menor de folículos fica disponível para seleção, e folículos de baixa qualidade serão selecionados. A qualidade dos oócitos também diminui com o passar da idade como resultado do dano cumulativo ao oócito, às fibras do fuso meiótico e às células foliculares (Warbuton, 2005). Quando submetidas à estimulação ovariana controlada, pacientes acima de 35 anos frequentemente apresentam baixa resposta, o que leva a um menor número de oócitos maduros coletados (Rashtian *et al.*, 2018). Estudos sugerem que a perda na qualidade do gameta feminino em pacientes com idade avançada está relacionada a anormalidades cromossômicas, morfológicas e funcionais, contribuindo para uma perda também na

qualidade do desenvolvimento embrionário e na diminuição das chances de gravidez. Mesmo assim, as bases moleculares envolvidas nesses processos são ainda pouco conhecidas (Van Rooij *et al.*, 2003; Moreno *et al.*, 2015).

Os resultados do presente estudo corroboram com o fato desta queda da fertilidade após os 35 anos ao observar-se uma diminuição de expressão de PTGS2 e CSE em amostras provenientes de mulheres com mais de 35 anos. Sendo assim, esses resultados sugerem que o fator idade pode estar modulando a expressão destes genes, o que indica que a baixa transcrição tanto de PTGS2 como de CSE nas células do *cumulus* em mulheres de idade avançada poderiam estar comprometendo a fertilidade dessas mulheres. Esses resultados levantam a hipótese de que, no caso de PTGS2, sua baixa expressão poderia estar afetando os níveis de prostaglandinas, onde estas e seus metabólitos possuem um importante papel na regulação de processos celulares como aumento da proliferação, inibição da apoptose e estimulação da adesão célula-célula (Eilati *et al.*, 2012; Torres *et al.*, 2015). Já no caso do CSE, sua baixa expressão poderia estar interferindo na produção de H<sub>2</sub>S, uma potente molécula que tem se evidenciado participar de múltiplos aspectos na fisiologia gestacional, sendo um fator de sinalização parácrina e autócrina promotor da angiogênese placentária, e modulador das funções imunológicas maternas (Sun *et al.*, 2016; Guerra *et al.*, 2019).

Com o passar dos anos, o organismo feminino apresenta alteração em seu perfil hormonal, onde há maiores oscilações e distúrbios, o que se caracteriza não somente pelas alterações na liberação hormonal no eixo hipotálamo-hipófise-ovário, como também na resposta a esses hormônios através de seus receptores nas células-alvo. Entre outras consequências, esse quadro hormonal instável afeta diretamente processos como a maturação oocitária final e ovulação, processos onde as prostaglandinas, produzidas pela indução de PTGS2, estão envolvidas. As prostaglandinas, presentes no sistema reprodutivo, atuam como mediadores lipídicos biologicamente ativos que estão envolvidos na regulação de eventos como maturação folicular final, ovulação, regressão do corpo lúteo, implantação e estabelecimento da gravidez (Karim *et al.*, 1979; Nuttinck *et al.*, 2002; Marei *et al.*, 2014). Já foi sugerido o papel das prostaglandinas como mediadores do estímulo do LH em vista da pequena quantidade de receptores de LH nas células do *cumulus* e nos oócitos (Sirois *et al.*, 2004). Neste caso, as prostaglandinas se tornam fundamentais para a expansão e maturação das células do *cumulus* e, com isso, pode-se sugerir a importância da expressão de PTGS2. Uma vez que o pico de LH pré-

ovulatório é reconhecido como o gatilho da indução de PTGS2 antes da ovulação (Sirois *et al.*, 2004), mulheres em idade avançada e, conseqüentemente, mais resistentes ao estímulo hormonal pelas gonadotrofinas, poderiam ter a expressão dessa enzima diminuída, como observado no presente estudo. As prostaglandinas parecem também estar envolvidas com a maturação meiótica do oócito, uma vez que há evidências que elas são responsáveis pela fosforilação de MAPK, sugerindo que estariam ativando MAPK e indiretamente induzindo a maturação meiótica dos oócitos dentro dos folículos (Yamashita *et al.*, 2011). Dessa forma, é passível de se pensar que o dano cumulativo à qualidade oocitária decorrente da idade materna pode também estar relacionado à baixa expressão de COX2, uma vez que haveria uma fosforilação diminuída de MAPK e conseqüente menor ativação deste fator. Entretanto, neste caso, mais estudos que correlacionam as vias diretas onde as prostaglandinas atuam na retomada da meiose devem ser realizados.

Os resultados deste trabalho também sugerem que um quadro de idade avançada estaria alterando a expressão de CSE, enzima envolvida na formação de sulfeto de hidrogênio. Sabe-se que o sulfeto de hidrogênio é uma molécula de sinalização produzida de forma endógena e que possui variados efeitos fisiológicos, inclusive na fertilidade, atuando na maturação oocitária e na ovulação (Liang *et al.*, 2007). Por exemplo, Srilatha *et al.* (2009) foram os primeiros a evidenciar um efeito relaxante muscular do H<sub>2</sub>S no trato genital em coelhos, com níveis de expressão das enzimas CBS e CSE na região do clitóris e do músculo vaginal (Srilatha *et al.*, 2009). Outro estudo explorou potenciais funções da enzima CBS durante a maturação oocitaria, sugerindo que esta estaria envolvida de fato neste processo (Liang *et al.*, 2007), e altos níveis expressos desta enzima foram observados na granulosa e células do *cumulus* de folículos antrais tardios em fêmeas de camundongos (Liang *et al.*, 2006). Por outro lado, já foi demonstrado um potencial papel do H<sub>2</sub>S no envelhecimento de oócitos de suínos quando cultivados *in vitro* de forma prolongada, onde a inibição das enzimas produtoras do H<sub>2</sub>S estaria acelerando os sinais do envelhecimento e aumentando a taxa de fragmentação oocitária (Krejčova *et al.*, 2015). Ainda, sabe-se que radicais livres como o NO estão envolvidos em diversas etapas da regulação da função ovariana, como a ovulação, e que, junto com ele, outros tipos de radicais livres são produzidos, como o H<sub>2</sub>S (Lo Faro *et al.*, 2014).

Nesse contexto, o avanço da idade, que vem acompanhado de uma variedade de alterações metabólicas, bioquímicas e moleculares que ocorrem a nível celular, assim como os distúrbios hormonais, pode estar contribuindo para um metabolismo anormal na formação de sulfeto de hidrogênio, como sugerido pela baixa expressão de CSE em células do *cumulus* das pacientes. Posto isto, a concentração do gás estaria sendo influenciada e, conseqüentemente, suas funções reprodutivas sendo interferidas.

Além do fator idade, características do estilo de vida e hábitos comportamentais da mulher também estão relacionadas com sua função reprodutiva e são capazes de alterar o ciclo reprodutivo, ainda que os mecanismos para isto não estejam esclarecidos. O consumo de álcool, por exemplo, acarreta conseqüências na fertilidade feminina, aumento os riscos de aborto tanto em concepções naturais como através de reprodução assistida (Klonoff-Cohen *et al.*, 2003). Estudos relacionaram a ingestão de álcool com a resposta ao estímulo ovariano, observando que mulheres submetidas a ciclos de reprodução assistida e que ingeriram bebidas alcoólicas tiveram um número menor de oócitos aspirados em comparação com aquelas sob o efeito nulo de álcool. Além disso, há uma relação positiva entre o consumo de álcool antes ou durante esse tipo de tratamento e a diminuição nas taxas de nascidos vivos após as técnicas de fertilização *in vitro*, sendo que essa associação se torna mais estrita conforme se aumenta a quantidade de álcool no organismo (Klonoff-Cohen *et al.*, 2003; Rossi *et al.*, 2011).

Procurando entender os possíveis mecanismos pelos quais o consumo de álcool estaria interferindo na fertilidade, dos seis genes candidatos deste estudo, foram encontradas diferenças nas médias de expressão de três genes importantes na reprodução humana em mulheres que consomem álcool, sendo eles PTGS2, CYP19 e FGF2. Esses resultados sugerem que o consumo de álcool estaria interferindo no organismo feminino e contribuindo para dificuldades no estabelecimento de uma gestação, influenciando através da menor expressão desses genes em células do *cumulus*. De fato, uma vez que o consumo de álcool provoca alterações na secreção hormonal hipotalâmica e gonadal, este hábito poderia estar interferindo nos sistemas neurotransmissores e em diversas vias celulares (Finn *et al.*, 2018). A partir disto e com os resultados do presente estudo, pode-se propor que, sendo PTGS2, CYP19 e FGF2 fatores que respondem a estímulos hormonais e atuam através de sinalização, um desequilíbrio hormonal estaria possivelmente comprometendo os níveis de expressão gênica dessas enzimas e alterando, conseqüentemente, sua vias e funções reprodutivas.



No presente estudo, quando se analisou a diferença de expressão gênica nos grupos separados ou por diferença de IMC ou pelo hábito de fumar, não foi encontrada diferença, sugerindo que esses perfis não estariam modulando a expressão dos seis genes em estudo. Entretanto, já é bem estabelecido o impacto dessas características pessoais com o declínio da fertilidade, onde se sabe que a elevação do peso de uma mulher possivelmente compromete mecanismos endócrinos e, no caso do cigarro, o hábito de fumar não apenas interfere em níveis séricos de hormônios, como também na gametogênese. (Basu *et al.*, 1992; Thompson *et al.*, 2008; Broughton *et al.*, 2017).

Trabalhos mostram que o impacto da obesidade é atribuído principalmente a mecanismos endócrinos (ASRM, 2008), interferindo em funções neuroendócrinas e ovarianas, afetando conseqüentemente a competência e maturação oocitária, através da alteração dos hormônios envolvidos com o processo de maturação folicular e ovulação (Pasquali *et al.*, 2003; Robker, 2008). O excesso de peso na mulher não apenas afeta a qualidade na maturação oocitária, como também está relacionado a defeitos quantitativos. Ainda, pode haver alterações na fertilização, disfunções na meiose e desordens mitocondriais, impactando negativamente o desenvolvimento embrionário (Sutton-McDowall *et al.*, 2010). Estudos com mulheres obesas demonstraram redução nas taxas de desenvolvimento embrionário (Tortoriello *et al.*, 2004). Além disso, oócitos de ratas obesas exibiram aumento na deposição lipídica, anormalidades meióticas e alterações na morfologia mitocondrial e no potencial de membrana (Igosheva *et al.*, 2010; Luzzo *et al.*, 2012).

Muitos estudos com animais e seres humanos têm sido feitos com o objetivo de entender os efeitos do cigarro no sistema reprodutivo. Pesquisas com animais observaram que compostos químicos presentes no cigarro estariam interferindo numa série de processos celulares, incluindo alterações cromossômicas em gametas e decréscimo no número de oócitos maduros em metáfase II, bem como estaria havendo um aumento na depleção folicular e, assim, um esgotamento da função reprodutiva (Thompson *et al.*, 2008; Tuttle *et al.*, 2009; Sadeu *et al.*, 2010). Da mesma forma, estudos em humanos mostraram que o hábito de fumar está associado com acelerada perda da reserva folicular ovariana, bem como com uma interferência na maturação oocitária (Dechanet *et al.*, 2011; Budani, 2017). Trabalhos no âmbito da reprodução assistida demonstraram, em pacientes fumantes, baixas taxas de fertilização e

decréscimo no número de oócitos recuperados após estimulação ovariana (Fuentes *et al.*, 2010).

O número amostral de pacientes em cada momento de análise pode ser o motivo pelo qual esses perfis, agrupados pela diferença de IMC e hábito de fumar, não deram significância na expressão desses genes, também sabidamente envolvidos com a fertilidade. Por outro lado, quando se combinaram perfis pela semelhança de características, onde a idade e o IMC correspondem a parâmetros biológicos do indivíduo, e o consumo de álcool e o tabagismo a estilos de vida nocivos à saúde, diferenças na expressão gênica foram identificadas, pois assim os eventos observados, ou seja, o número de indivíduos em cada grupo comparado, foram aumentados.

A idade e o IMC de uma mulher são igualmente qualidades fisiológicas e, tanto a idade avançada e/ou um IMC elevado, o que confere um grau de sobrepeso, provocam alterações em vias metabólicas. No presente estudo encontrou-se menor expressão de CYP19 e CSE em pacientes com idade maior que 35 anos e/ou IMC maior que 25 kg/m<sup>2</sup> em comparação com pacientes de idade menor ou igual a 35 anos e IMC menor ou igual a 25 kg/m<sup>2</sup>. Assim sendo, sugere-se que a idade e/ou IMC estariam alterando a expressão desses dois genes em células do *cumulus* de mulheres submetidas à hiperestimulação ovariana controlada. Ainda, as vias pelas quais esses perfis estariam relacionados à infertilidade seriam possivelmente através da baixa expressão desses dois genes, visto o papel da aromatase na biossíntese do estrógeno, e da cistationa gama-liase na produção de sulfato de hidrogênio, molécula envolvida na proliferação celular e maturação oocitária (Liang *et al.*, 2007; Kanagy *et al.*, 2017).

Concordando com os resultados de expressão gênica, quando foram avaliados os dados laboratoriais durante o ciclo de fertilização *in vitro* dessas pacientes, a taxa de oócitos maduros foi menor em ciclos de pacientes com idade maior que 35 anos e/ou IMC maior que 25 kg/m<sup>2</sup> quando relacionada às pacientes com idade menor ou igual a 35 anos e IMC menor ou igual a 25 kg/m<sup>2</sup>. De fato, esses dados concordam com estudos prévios que relatam que as alterações hormonais e celulares presentes com o avanço da idade e com um IMC elevado impactam negativamente nos resultados de fertilização *in vitro*, principalmente na resposta ovariana à estimulação com gonadotrofinas exógenas, maturação oocitária e qualidade embrionária (Souter *et al.*, 2011; Rashtian *et al.*, 2018).

Quando se combinou os hábitos comportamentais de consumo de álcool e tabagismo, diferenças na média de expressão de todos os genes estudados foram encontradas, onde houve menor expressão em mulheres que consomem álcool e/ou já fumaram/fumam. Visto a quantidade de efeitos tóxicos e deletérios do álcool e do cigarro no organismo, não é de se surpreender que todos esses genes tenham mostrado diferença em sua média de expressão em mulheres que adotam um ou os dois desses hábitos. Embora muitos pesquisadores já tenham reportado que o álcool e o tabagismo estão envolvidos na alteração do ciclo reprodutivo, os fatores e vias como isto acontece não estão totalmente esclarecidos. O presente trabalho então estaria confirmando o impacto desses hábitos comportamentais sobre a função reprodutiva e sugerindo que possíveis mecanismos pelos quais o álcool e o tabagismo estariam atuando seria através da diminuição de expressão desses genes.

No que diz respeito às análises dos perfis e hábitos estudados sobre os parâmetros laboratoriais dos ciclos de fertilização *in vitro* das pacientes, encontrou-se relação dos perfis idade/IMC sobre a taxa de oócitos maduros, como discutido anteriormente. As outras informações sobre o curso *in vitro*, como número de oócitos coletados, taxa de fertilização, taxa de clivagem embrionária, taxa de blastocistos e taxa de gestação não mostraram qualquer diferença quando comparados entre os grupos. Considerando que outros trabalhos já apresentaram relação de todos os perfis de idade, IMC, consumo de álcool e tabagismo com dificuldades na obtenção de resultados satisfatórios em técnicas de reprodução assistida, o fato de não ter sido observada diferença no presente trabalho pode ser explicado pelo número amostral de pacientes desta pesquisa, uma vez que essas informações são características pontuais e não contínuas, e necessitam um número maior de observações.

## 6. CONCLUSÃO:

A análise de expressão gênica é uma importante ferramenta de estudo da qualidade oocitária e desenvolvimento embrionário inicial, contribuindo para o esclarecimento dos mecanismos envolvidos na fertilidade.

Este foi o primeiro trabalho que buscou estudar o impacto da idade, do IMC, do consumo de álcool e do tabagismo sobre os genes PTGS2, AREG, CSE, FGF2 e FGF18 no âmbito da infertilidade e, sendo assim, estudos com um número maior de pacientes, bem como estudos de quantificação proteica que complementem os resultados de expressão gênica, são necessários para elucidar de forma mais detalhada os mecanismos envolvidos.

O estudo da expressão desses genes e seu impacto na infertilidade de acordo com um perfil específico pode ser a base para próximas pesquisas que busquem aprimorar as técnicas de reprodução assistida, sempre na tentativa de melhores resultados para o alcance de uma gestação saudável e um bebê em casa.

De acordo com os dados deste trabalho, a hipótese de que o perfil da mulher e seus hábitos comportamentais alteram a expressão de genes importantes para a ovulação e o desenvolvimento embrionário inicial durante ciclos de fertilização *in vitro* em humanos foi confirmada.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ADRIAENSSENS, T. et al. The cumulus cell gene expression profile of oocytes with different nuclear maturity and potential for blastocyst formation. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 28, p. 31-40, 2011.

ALBERTINI, D. et al. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Reproduction**, v. 121, n. 5, p. 647-653, 2001.

ANDERSON, R. et al. Cumulus gene expression as a predictor of human oocyte fertilisation, embryo development and competence to establish a pregnancy. **Reproduction**, v. 138, n. 4, p. 629-637, 2009.

ASHKENAZI, H. et al. Epidermal Growth Factor Family Members: Endogenous Mediators of the Ovulatory Response. **Endocrinology**, v. 146, n.1, p. 77-84, 2005.

ASRM - American Society for Reproductive Medicine. Practice Committee of American Society for reproductive medicine. The notions of infertility and recurrent pregnancy loss. **Fertil Steril**, v. 90, 2008.

ASSOU, S. et al. The human cumulus–oocyte complex gene-expression profile. **Human Reproduction**, v. 21, n. 7, p. 1705–1719, 2006.

ASSOU, S. et al. A non-invasive test for assessing embryo potential by gene expression profiles of human cumulus cells: a proof of concept study. **Molecular Human Reproduction**, v. 14, n. 12, p. 711–719, 2008.

AZAMBUJA, R. et al. **Reprodução Assistida: Técnicas de Laboratório**, v. 1, 320 p., 2017.

BAIRD, D. et al. Cigarette smoking associated with delayed conception. **Journal of the American Medical Association**, v. 253, p. 2979-2983, 1985.

BARCELOS, I. et al. Down-regulation of the CYP19A1 gene in cumulus cells of infertile women with endometriosis. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 30, n. 5, p. 532-541, 2015.

BARLOW, P. et al. Fertilization failure in IVF: why and what next? **Human Reproduction**, v. 5, n. 4, p. 451-456, 1990.

BASU, J. et al. Endogenous estradiol and progesterone concentrations in smokers on oral contraceptives. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v. 33, n. 4, p. 224-227, 1992.

BLOCK, G., et al. Effects on pubertal hormones by ethanol abuse in adolescents. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 17, p. 505–506, 1993.

BORGES JR, E et al. Fisiologia reprodutiva. **Reprodução Humana Assistida**, p.4, 2011

BROUGHTON, D. et al. Obesity and female infertility: potential mediators of obesity's impact. **Fertility and Sterility**, v. 107, n. 4, p. 840-847, 2017.

BUDANI, M. Ovotoxicity of cigarette smoke: A systematic review of the literature. **Reproductive Toxicology**, v. 72, p. 164-181, 2017.

CALDER, M. et al. Cyclooxygenase-2 and prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>) receptor messenger RNAs are affected by bovine oocyte maturation time and cumulus-oocyte complex quality, and PGE<sub>2</sub> induces moderate expansion of the bovine cumulus in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 135–140, 2001.

CHAVES, R. et al. The fibroblast growth factor family: involvement in the regulation of folliculogenesis. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, 905–915, 2012.

CHERMULA, B. et al. The Unique Mechanisms of Cellular Proliferation, Migration and Apoptosis are Regulated through Oocyte Maturation Development- A Complete Transcriptomic and Histochemical Study. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 1, p. 1-21, 2018.

CINAR, O. et al. Does cigarette smoking really have detrimental effects on outcomes of IVF? **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, v. 174, p. 106-110, 2014.

COOPER, A. et al. Maternal tobacco use and its preimplantation effects on fertility: More reasons to stop smoking. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 26, n. 2, p. 204–212, 2008.

COTICCHIO, G., et al. Oogenesis. How the oocyte influences follicular cell function and why. **Springer-Verlag London**, p. 75-92, 2013.

CRAIG, J. et al. Gonadotropin and intra-ovarian signals regulating follicle development and atresia: the delicate balance between life and death. **Frontiers in Bioscience**, v. 12, p. 3628–39, 2007.

CUI, J. et al. Estrogen synthesis and signaling pathways during ageing: from periphery to brain. **Trends in Molecular Medicine**, v. 19, n. 3, p. 197–209, 2013.

DECHANET, C. et al. Effects of cigarette smoking on reproduction. **Human Reproduction Update**, v. 17, n. 1, p. 76-95, 2011.

DELL'AQUILA, M. et al. Cumulus expansion, nuclear maturation and connexin 43, cyclooxygenase-2 and FSH receptor mRNA expression in equine cumulus-oocyte complexes cultured in vitro in the presence of FSH and precursors for hyaluronic acid synthesis. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2, n. 44, p. 1-13, 2004.

DEKEL, N. et al. Epidermal growth factor induces maturation of rat follicle-enclosed oocytes. **Endocrinology**, v. 116, n. 1, p.406–409, 1985.

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

DZIK, A et al. Foliculogênese, fisiologia detalhada do oócito e marcadores de qualidade oocitária. **Atlas de Reprodução Humana SBRH**, v. 2, p. 104, 2012.

EL-HAYEK, S. et al. Follicle-stimulating hormone regulates expression and activity of epidermal growth factor receptor in the murine ovarian follicle. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 47, 16778– 16783, 2014.

EILATI, E, et al. Age dependent increase in prostaglandin pathway coincides with onset of ovarian cancer in laying hens. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 87, n. 6, p. 177-184, 2012.

ELVIN, J. et al. Mouse models of ovarian failure. **Reviews of Reproduction**, v. 3, n. 3, p. 183-195, 1998.

ERICKSON, G. et al. FSH induction of functional LH receptors in granulosa cells cultured in a chemically defined medium. **Nature**, v. 279, p. 336-338, 1979.

ESTIENNE, A. et al. The fibroblast growth factor 8 family in the female reproductive tract. **Reproduction**, v. 155, n. 1, p. R53-R62, 2018.

FADDY M. et al. Accelerated disappearance of ovarian follicles in the midlife: implications for forecasting menopause. **Human Reproduction**, v. 7, n. 10, p. 1342-1346, 1992.

FINN, D. et al. Binge Ethanol Drinking Produces Sexually Divergent and Distinct Changes in Nucleus Accumbens Signaling Cascades and Pathways in Adult C57BL/6J Mice. **Frontiers in Genetics**, v. 9, p. 1-18, 2018.

FIRNS, S. et al. The effect of cigarette smoking, alcohol consumption and fruit and vegetable consumption on IVF outcomes: a review and presentation of original data. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 16; p. 1-13, 2015.

FUENTES, A. et al. Recent cigarette smoking and assisted reproductive technologies outcome. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 1, p. 89–95, 2010.

GABLER, C. et al. Expression pattern of fibroblast growth factor (FGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) system members in bovine corpus luteum endothelial cells during treatment with FGF-2, VEGF or oestradiol. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 39, p. 321–327, 2004.

GDAŃSKA, P. et al. Anxiety and depression in women undergoing infertility treatment. **Ginekologia Polska**, v. 88, n. 2, p. 109-112, 2017.

GILLIES, G. et al. Estrogen actions in the brain and the basis for differential action in men and women: a case for sex-specific medicines. **Pharmacological Reviews**, v. 62, n. 2, p. 155–198, 2010.

GOUGEON, A. Dynamics of human follicular growth: morphologic, dynamic and functional aspects. **The ovary**, v. Second edition, p. 25-43, 2004.

GUERRA, D. et al. Gasotransmitters in pregnancy: from conception to uterine involution. **Biology of Reproduction**, In press, 2019.

HAMEL, M. et al. Identification of differentially expressed markers in human follicular cells associated with competent oocytes. **Human Reproduction**, v. 23, n. 5, p. 1118–1127, 2008.

HARRIS, R. et al. EGF receptor ligands. **Experimental Cell Research**, v. 284, n. 1, p. 2-13, 2003.

HELLIWELL, R. et al. Prostaglandin synthases: recent developments and a novel hypothesis. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 70, n. 2, p. 101–113, 2004.

HERNANDEZ-GONZALEZ, I. et al. Gene expression profiles of cumulus cell oocyte complexes during ovulation reveal cumulus cells express neuronal and immune-related genes: does this expand their role in the ovulation process? **Molecular Endocrinology**, v. 20, n. 6, p. 1300-1321, 2006.

HOSSEINI E. et al. Epigenetic alterations of CYP19A1 gene in Cumulus cells and its relevance to infertility in endometriosis. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 33, n. 8, p. 1105-1113, 2016.



HUANG, Y. et al. Inflamm Aging: A New Mechanism Affecting Premature Ovarian Insufficiency. **Journal of Immunology Research**, v. 2019, p. 1-7, 2019.

HUANG, Y. et al. Altered amphiregulin expression induced by diverse luteinizing hormone receptor reactivity in granulosa cells affects IVF outcomes. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 30, p. 593–601, 2015.

IGOSHEVA, N. et al. Maternal diet-induced obesity alters mitochondrial activity and redox status in mouse oocytes and zygotes. **PLoS One**, v. 5, n. 4, p. 1-8, 2010.

ITOH, N. et al. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. **Trends in Genetics**, v. 20, n. 11, p. 563–569, 2004.

JAMNONGJIT, M. et al. Epidermal growth factor receptor signaling is required for normal ovarian steroidogenesis and oocyte maturation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 45, p. 16257-16262, 2005.

JUNQUEIRA, JP. et al. **Medicina Reprodutiva SBRH**, 656 p., 2019.

KANAGY, N. et al. Vascular biology of hydrogen sulfide. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 312, n. 5, p. C537-C549, 2017.

KARIM, S. et al. Prostaglandins in the control of animal and human reproduction. **British medical bulletin**, v. 35, n. 2, p. 173–180, 1979.

KEEFE, D. et al. Oocyte competency is the key to embryo potential. **Fertility and Sterility**, v. 103, n. 2, p. 317-322, 2015.

KLONOFF-COHEN, H. et al. Effects of maternal and paternal alcohol consumption on the success rates of in-vitro fertilization and gamete intrafallopian transfer. **Fertility and Sterility**, v. 79, n. 2, p. 330–339, 2003.

KOIKE, S. et al. Cell- and stage-specific expression of basic FGF in the developing rat gonads. **Growth Regul**, 4, p. 77–81, 1994.

KREJCOVA, T. et al. Hydrogen sulfide donor protects porcine oocytes against aging and improves the developmental potential of aged porcine oocytes. **PLoS One**, v. 10, p. 1-17, 2015.

KUOHUNG, W. et al. Causes of female infertility. **Up to date**, v. 4, n. 21, 2015.

LIANG, R. et al. Localization of cystathionine beta synthase in mice ovaries and its expression profile during follicular development. **Chin Med J (Engl)**, v. 119, p. 1877-1883, 2006.

LIANG, R. et al. Cystathionine  $\beta$  synthase participates in murine oocyte maturation mediated by homocysteine. **Reproductive Toxicology**, v. 24, p. 89-96, 2007.

LO FARO, M. et al. Hydrogen sulfide and nitric oxide interactions in inflammation. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 41, p. 38-47, 2014.

LOWICKA, E. et al. Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) - The third gas of interest for pharmacologists. **Pharmacological Reports**, v. 59, p. 4-24, 2007.

LUZZO, K. et al. High fat diet induced developmental defects in the mouse: oocyte meiotic aneuploidy and fetal growth retardation/brain defects. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. 1-10, 2012.

MAREI, W. et al. Role of PTGS2 generated PGE<sub>2</sub> during gonadotrophin induced bovine oocyte maturation and cumulus cell expansion. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 28, n. 3, p. 388-400, 2014.

MARINO, J. et al. Fertility treatments and the young women who use them: an Australian cohort study. **Human Reproduction**, v. 26, n. 2, p. 473-479, 2011.

MASSAROTTI, C et al. Impact of infertility treatments on quality of life and levels of anxiety and depression in woman undergoing in vitro fertilization. **Gynecol Endocrinol**, v. 35, n. 6, p.485-489, 2019.

MATOS, L. et al. Superoxide dismutase expression in human cumulus oophorus cells. **Molecular Human Reproduction**, v. 15, n.7, p. 411-419, 2009.

MATOS, M., Essential role of follicle-stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability *in vitro*. **Zygote**, v. 15, p. 173-182, 2007.

MÍNGUEZ-ALARCÓN L. et al. Caffeine, alcohol, smoking, and reproductive outcomes among couples undergoing assisted reproductive technology treatments. **Fertility and Sterility**, v. 110, n. 4, p. 587-592, 2018.

MORENO, J. et al. Follicular fluid and mural granulosa cells microRNA profiles vary in in vitro fertilization patients depending on their age and oocyte maturation stage. **Fertility and Sterility**, v. 104, n. 4, p. 1037 -1046, 2015.

NICOLAU, P. et al. Alcohol consumption and *in vitro* fertilization: a review of the literature. **Gynecological Endocrinology**, v. 30, n. 11, p. 759-763, 2014.

NIEDERBERGER, C. et al. Forty years of IVF. **Fertility and Sterility**, v. 110, n. 2, p. 188, 2018.

NUTTINCK, F. et al. Cyclooxygenase-2 is expressed by cumulus cells during oocyte maturation in cattle. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, p. 93–101, 2002.

OHNO, S. et al. Multiple roles of cyclooxygenase-2 in endometrial cancer. **Anticancer Research**, v. 25, n. 6A, p. 3679-3687, 2005.

OMBELET, W. et al. Infertility and the provision of infertility medical services in developing countries. **Human Reproduction Update**, v. 14, n. 6, p. 605-621, 2008.

ORNITZ, D. et al. The fibroblast growth factor signaling pathway. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology**, v. 4, p. 215–266, 2015.

ORNOY, A. et al. Alcohol abuse in pregnant women: effects on the fetus and newborn, mode of action and maternal treatment. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, p. 364–379, 2010.

PARK, J. et al. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. **Science**, v. 303, n. 682-684, 2004.

PASQUALI, R. et al. Obesity and Reproductive disorders in women. **Human Reproduction Update**, v. 9, n. 4, p. 359–372, 2003.

PASQUALOTTO, F. Investigaç o e reproduç o assistida no tratamento da infertilidade masculina. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetr cia**, v. 29, n. 2, p. 103-112, 2007.

PATRIZIO, P. et al. From oocyte to baby: a clinical evaluation of the biological efficiency of in vitro fertilization. **Fertility and Sterility**, v. 91, n. 4, 1061-1066, 2009.

PELUSO, J. et al. Basic fibroblast growth factor maintains calcium homeostasis and granulosa cell viability by stimulating calcium efflux via a PKC  $\delta$ -dependent pathway. **Endocrinology**, v. 142, p. 4203–4211, 2001.

PFAFFL, M. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 9, 2002-2007, 2001.

PIER, B. et al. Comprehensive profiling of prostaglandins in human ovarian follicular fluid using mass spectrometry. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, p. 7-15, 2018.

- PIRIU, G. et al. Clozapine and risperidone influence on cortisol and estradiol levels in male patients with schizophrenia. **Journal of medicine and life**, v. 8, n. 4, p. 548-551, 2015.
- POHLMEIER, W. et al. Progressive Obesity Alters the Steroidogenic Response to Ovulatory Stimulation and Increases the Abundance of mRNAs Stored in the Ovulated Oocyte. **Molecular Reproduction & Development**, v. 81, n. 8, p. 735-747, 2014.
- PORTELA, V. et al. Expression and function of fibroblast growth factor 18 in the ovarian follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v.83, p. 339–346, 2010.
- PORTELA, V. et al. The role of fibroblast growth factor-18 in follicular atresia in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 92, p. 11–18, 2015.
- RASHTIAN, J. et al. Luteal phase ovarian stimulation increases the number of mature oocytes in older woman with severe diminished ovarian reserve. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 64, n. 3, p. 216 – 219, 2018.
- RICHANI, D, et al. The epidermal growth factor network: role in oocyte growth, maturation and developmental competence. **Human Reproduction Update**, v. 24, n. 1, p. 1-14, 2018.
- RICHARDS, J. Genetics of ovulation. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 25, n. 4, p. 235-242, 2007.
- RICH-EDWARDS, J. et al. Adolescent body mass index and infertility caused by ovulatory disorder. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 171, n. 1, p. 171–177, 1994.
- RIEDEL, F. et al. Expression of basic fibroblast growth factor protein and its downregulation by interferons in head and neck cancer. **Head and Neck**, v. 22, p. 183–189, 2000.
- ROBKER, R. Evidence that obesity alters the quality of oocytes and embryos. **Pathophysiology**, v. 15, p. 115-121, 2008.
- ROSSI, B. et al. Effect of alcohol consumption on in vitro fertilization. **Obstetrics and Gynecology**, v. 117, p. 136–142, 2011.
- RUSSELL, D. et al. Bidirectional communication between cumulus cells and the oocyte: old hands and new players? **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 62–68, 2016.
- SADEU, J. et al. Alcohol, drugs, caffeine, tobacco, and environmental contaminant exposure: reproductive health consequences and clinical implications. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 40, n. 7, p. 633-652, 2010.

SALIH JOELSSON, L. et al. Anxiety and depression symptoms among sub-fertile women, women pregnant after infertility treatment, and naturally pregnant women. **Eur Psychiatry**, v. 45, p. 12-219, 2017.

SCHNEIDER, M. et al. The epidermal growth factor receptor ligands at a glance. **Journal of Cellular Physiology**, v. 218, n. 3, p. 460-466, 2009.

SCHRAMM, R. et al. A macaque model for studying mechanisms controlling oocyte development and maturation in human and non-human primates. **Human Reproduction**, v. 14, n. 10, p. 2544-2555, 1999.

SELI, E. et al. Minireview: metabolism of female reproduction: regulatory mechanisms and clinical implications. **Molecular Endocrinology**, v. 28, n. 6, p.790-804, 2014.

SEO, M. et al. Prostaglandin synthases: molecular characterization and involvement in prostaglandin biosynthesis. **Progress in Lipid Research**, v. 66, p. 50-68, 2017.

SHOYAB, M. et al. Amphiregulin: a bifunctional growth-modulating glycoprotein produced by the phorbol 12-myristate 13-acetate- treated human breast adenocarcinoma cell line MCF-7. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, p. 6528-6532, 1988.

SILVESTRIS, E. et al. Obesity as disruptor of the female fertility. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 16, n. 1, p. 1-13, 2018.

SIRARD, M. et al. Screening for Oocyte Competence. **Oocyte Physiology and Development in Domestic Animals**, p. 191-206, 2013.

SIROIS, J. et al. Cyclooxygenase-2 and its role in ovulation: a 2004 account. **Human Reproduction Update**, v. 10, n. 5, p. 373-385, 2004.

SMITH, W. et al. Prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and 2. **Adv. Immunol**, v. 62, p. 167-215, 1996.

SODERBERG, M. et al. A burden and a blessing young Swedish women's experience of fertility. A study among women lacking experience of pregnancy and parenthood. **Health Care for Women International**, v. 32, p. 402-419, 2011.

SOUTER, I. et al. Women, weight, and fertility: the effect of body mass index on the outcome of superovulation/intrauterine insemination cycles. **Fertility and Sterility**, v. 95, n. 3, p. 1042-1047, 2011.

SRILATHA, B. et al. Initial characterization of hydrogen sulfide effects in female sexual function. **Journal of Sexual Medicine**, v. 6, p. 1875-1884, 2009.

STOCCO, C. Aromatase expression in the ovary: hormonal and molecular regulation. **Steroids**, v. 73, p. 473–487, 2008.

SUGIMURA, S. et al. Amphiregulin cooperates with bone morphogenetic protein 15 to increase bovine oocyte developmental competence: effects on gap junction-mediated metabolite supply. **Molecular Human Reproduction**, v. 20, n. 6, p. 499–513, 2014.

SUGIURA, K. et al. Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism. **Developmental Biology**, v. 279, n. 1, p. 20-30, 2005.

SUN, Q. et al. Hydrogen Sulfide Facilitates Vaginal Lubrication by Activation of Epithelial ATP Sensitive  $K^+$  Channels and Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. **Journal of Sexual Medicine**, v. 13, n. 5, p. 798-807, 2016.

SUNKARA, S. et al. Association between the number of eggs and live birth in IVF treatment: an analysis of 400,135 treatment cycles. **Human Reproduction**, v. 26, n. 7, p. 1768–1774, 2011.

SUTTON-MCDOWALL, M. et al. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. **Reproduction**, v. 139, p. 685 - 695, 2010.

SZABÓ, C. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, p. 917-935, 2007.

THALER-DEMERS, D. Intimacy issues: sexuality, fertility, and relationships. **Seminars in oncology nursing**, v. 17, n. 4, p. 255-262, 2001.

TOLSTRUP, J. et al. Alcohol use as predictor for infertility in a representative population of Danish women. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, v. 82, n. 8, p. 744-749, 2003.

THOMPSON, J. et al. Cadmium: Toxic effects on the reproductive system and the embryo. **Reproducton Toxicology**, v. 25, p. 304–315, 2008.

TORRES, A. et al. Effects of oocyte donor age and embryonic stage of development on transcription of genes coding for enzymes of the prostaglandins and progesterone synthesis pathways in bovine in vitro produced embryos. **Zygote**, v. 23, n. 6, p. 802-812, 2015.

TORTORIELLO, D. et al. Dietary-induced obesity and hypothalamic infertility in female DBA/2J mice. **Endocrinology**, v. 145, n. 3, p. 1238-1247, 2004.

TUTTLE, A. et al. Cigarette smoke causes follicle loss in mice ovaries at concentrations representative of human exposure. **Human Reproduction**, v. 24, n. 6, p. 1452–1459, 2009.

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.

VAN DEN HURK, R. et al. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, p. 1717-1751, 2005.

VAN ROOIJ, I. et al. Women older than 40 years of age and those with elevated follicle-stimulating hormone levels differ in poor response rate and embryo quality in vitro fertilization. **Fertility and Sterility**, v. 79, n. 3, p. 482- 488, 2003.

VRTAČNIK, P. et al. The many faces of estrogen signaling. **Biochemia Medica**, v. 24, n. 3, p. 329-342, 2014.

XIE, M. et al. Combinatorial effects of epidermal growth factor, fibroblast growth factor 2 and insulin-like growth factor 1 on trophoblast cell proliferation and embryogenesis in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, n. 2, p. 419-430, 2017.

ZHONG, W. et al. FGF ligand family mRNA expression profile for mouse preimplantation embryos, early gestation human placenta, and mouse trophoblast stem cells. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, p. 540–550, 2006.

ZHUANG, L. et al. Direct enhancement of gonadotropin-stimulated ovarian estrogen biosynthesis by estrogen and clomiphene citrate. **Endocrinology**, v. 110, n. 6, p. 2219–2221, 1982.

YAMAGUCHI, Y. et al. Facilitated nitration and oxidation of LDL in cigarette smokers. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 35, n. 3, p. 186–93, 2005.

YAMASHITA, Y. et al. Positive feedback loop between prostaglandin E2 and EGF-like factors is essential for sustainable activation of MAPK3/1 in cumulus cells during in vitro maturation of porcine cumulus oocyte complexes. **Biological Reproduction**, v. 85, n. 5, p. 1073–1082, 2011.

WALL, M. et al. Cotinine in the serum, saliva, and urine of non-smokers, passive smokers, and active smokers. **American Journal of Public Health**, v. 78, p. 699–701, 1988.

WARBURTON, D. Biological aging and the etiology of aneuploidy. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 111, n. 3–4, p. 266–272, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Preventing and managing the global epidemic. Report of the World Health Organization on obesity. **Geneva: World Health Organization**; 1997.

WIGGLESWORTH, K. et al. Bidirectional communication between oocytes and ovarian follicular somatic cells is required for meiotic arrest of mammalian oocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. E3723-E3729, 2013.



**ANEXO 1:****Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)**

**Projeto:** ANÁLISE DE DIFERENTES PERFIS DE PACIENTES EM RELAÇÃO À EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS COM A MATURAÇÃO OOCITÁRIA E O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO INICIAL.

**Pesquisador responsável:** Prof. Dra. Yara Maria Rauh Muller, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC.

Endereço Profissional: Bloco B , Sala 309, Depto de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina, Bairro Córrego Grande, Florianópolis/SC. (48)3721-9799.

Endereço Residencial: Rua José Francisco Dias Areias 107, Bairro Trindade – Florianópolis/SC (48) 3333-2952

Contato: yara.rauh@ufsc.br, (48) 99961-0522

**Demais pesquisadores:** Fernanda Souza Peruzzato, UFSC.

Endereço Profissional: Rua Menino Deus, 63 Sala 302 Bloco A, Centro – Florianópolis/SC.

Endereço Pessoal: Rua Frei Caneca, 14/606, Agronômica – Florianópolis/SC.

Contato: fernanda.peruzzato@gmail.com, (48) 98855-3003

A fecundação de óvulos no laboratório é um procedimento que diversos casais procuram para ter um filho. Nos centros de medicina reprodutiva, a paciente é estimulada a produzir mais de um óvulo maduro, com o intuito de se produzir embriões de boa qualidade que possam ser transferidos para o útero e aumentar a chance de gravidez do casal. Entretanto, o que se observa é que nem todos os óvulos obtidos através desse procedimento são maduros ou de boa qualidade. Da mesma forma, nem todos os óvulos originam embriões de boa qualidade de maneira que a tão sonhada gravidez nem sempre ocorre.

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 a participar da pesquisa que estamos realizando referente ao estudo genético das células que estão próximas ao óvulo (chamadas de células do *cumulus*). O objetivo do nosso estudo é ampliar o conhecimento do amadurecimento do óvulo, tentando entender a influência de diversos genes na qualidade desses óvulos, assim como verificar como fatores, tais como a idade, o peso, e hábitos comportamentais (álcool e fumo) das pacientes também possam estar interferindo na qualidade do óvulo. Esse estudo pode contribuir no futuro para melhoramentos nas técnicas de Reprodução Assistida, beneficiando diversas pacientes.

Estamos convidando você a fazer parte deste experimento, pois as células que circundam os óvulos são coletadas junto com eles, mas não são utilizadas nos procedimentos de laboratório, e são rotineiramente descartadas, pois não apresentam utilidade para as técnicas de Reprodução Assistida. Desta forma, estamos solicitando permissão para utilizar em nossa pesquisa, **somente as células que circundam os óvulos e que seriam descartadas**. Os pesquisadores deste estudo irão cumprir o preconizado pela resolução pertinente nº 466 de 12 de dezembro de 2012 que regulamenta pesquisas envolvendo seres humanos.

Ainda, todas as pacientes que assinarem este TCLE e passarem a participar da pesquisa receberão um questionário estruturado para coleta de dados referentes ao seu perfil e hábitos comportamentais. O tempo estimado para responder ao questionário é de aproximadamente 10 minutos. Você deve se sentir a vontade para responder qualquer questão presente no documento e pode se recusar caso se sinta de alguma forma intimidada.

O procedimento de fertilização *in vitro* ocorrerá normalmente independente da sua participação no estudo. Não há risco adicional aos já existentes pela punção folicular de ciclo de fertilização *in vitro* para as pacientes incluídas neste estudo, tampouco a participação não implicará em nenhum prejuízo a você, considerando que sua participação no projeto não modifica nenhuma etapa de seu tratamento de reprodução assistida. Mesmo sem riscos relacionados a esta pesquisa, é importante você

estar ciente da garantia de indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa. Os pesquisadores garantem o reparo ao dano causado pela pesquisa, seja ele material ou imaterial, conforme preconiza a Resolução nº 466/12. Os riscos relacionados à pesquisa serão mínimos, como no caso de, por exemplo, alguma paciente vir a apresentar danos psicológicos devido a sua participação no estudo e/ou questões abordadas no questionário. Neste caso, a situação será prontamente encaminhada aos órgãos responsáveis, sendo passível de indenização.

A sua participação no estudo é isenta de despesas (não trará custos) e você não receberá nenhum pagamento (não será remunerada) pela sua participação. Entretanto, quaisquer eventuais gastos relacionados a esta pesquisa, como, por exemplo, gastos com o envio deste TCLE assinado, serão ressarcidos a você pelos pesquisadores. Salienta-se também que as informações das pacientes serão mantidas em sigilo.

Todas as pacientes ao iniciarem o procedimento de fertilização na Fecondare estão sendo convidadas a participar desta pesquisa, sendo que somente serão incluídas aquelas que concordarem em participar e assinem o presente termo de consentimento.

Os resultados deste estudo não trarão benefícios nem prejuízos diretos para você. 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. Os resultados referentes à pesquisa serão utilizados para fins exclusivos de pesquisa, sendo resguardada sua total confidencialidade. Da mesma forma, a amostra de seu material não será utilizada para nenhuma outra finalidade, e após a utilização dessas células, o material será descartado de forma correta.

Caso você fique com alguma dúvida em relação ao projeto poderá entrar em contato com os pesquisadores, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Santa Catarina/UFSC - CEPESH-UFSC. O CEPESH é um órgão colegiado interdisciplinar, deliberativo, consultivo e educativo, vinculado à Universidade Federal de Santa Catarina, mas independente na tomada de decisões, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos.



**ANEXO 2:****Questionário Estruturado para Coleta de Dados**

**Projeto:** ANÁLISE DE DIFERENTES PERFIS DE PACIENTES EM RELAÇÃO À EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS COM A MATURAÇÃO OOCITÁRIA E O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO INICIAL.

**Pesquisador responsável:** Prof. Dra. Yara Maria Rauh Muller, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC.

Endereço Profissional: Bloco B , Sala 309, Depto de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina, Bairro Córrego Grande, Florianópolis/SC. (48)3721-9799.

Endereço Residencial: Rua José Francisco Dias Areias 107, Bairro Trindade – Florianópolis/SC (48) 3333-2952

Contato: yara.rauh@ufsc.br, (48) 99961-0522

**Demais pesquisadores:** Fernanda Souza Peruzzato, UFSC.

Endereço Profissional: Rua Menino Deus, 63 Sala 302 Bloco A, Centro – Florianópolis/SC.

Endereço Pessoal: Rua Frei Caneca, 14/606, Agrônômica – Florianópolis/SC.

Contato: fernanda.peruzzato@gmail.com, (48) 98855-3003

Nome: \_\_\_\_\_ Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Etnia \_\_\_\_\_

Masc  /Fem  Altura: \_\_\_\_\_ Peso \_\_\_\_\_

Possui algum problema de saúde? Sim  /Não

Caso sim, qual?

---

---

Medicamentos atuais:

---

---

História Menstrual:

Idade de início: \_\_\_\_\_

Atualmente, seus períodos são regulares Sim  /Não

Se não, explique:

---

---

---

Nos dias atuais, você é fumante? Sim  /Não

Se sim, qual a frequência e quantidade de cigarros por dia?

---

---

---

Se não, qual foi a última vez que fumou?

---

---

---

Rubrica (Paciente / Pesquisador): \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Nos dias atuais, você ingere bebidas alcoólicas?

Sim  /Não

Se sim, qual a frequência e qual tipo de bebida?

---

---

---

Se não, qual foi a última vez que bebeu?

---

---

---

Rubrica (Paciente / Pesquisador): \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_