



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Programa de Pós-Graduação: Ciências Biológicas – Fisiologia

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

Júlia Schneider

Porto Alegre, Março de 2017.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Programa de Pós-Graduação: Ciências Biológicas – Fisiologia

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

Júlia Schneider

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas – Fisiologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ilma Simoni Brum

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Helena von Eye Corleta

Porto Alegre, Março de 2017.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Prof^a Dr^a Ilma Simoni Brum, pela oportunidade me fornecida de desenvolver um projeto de mestrado no grupo de pesquisas do Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral (LaBiMET). Obrigada por todo o suporte e apoio intelectual durante este tempo e durante a realização deste trabalho.

À minha co-orientadora Prof^a Dr^a Helena von Eye Corleta por me proporcionar suporte científico e partilhar comigo informações e opiniões críticas a respeito do trabalho desenvolvido.

Ao meu querido amigo e colega de laboratório Diego Duarte Alcoba que sempre fez o possível e o impossível para me auxiliar e orientar. Por todo conhecimento comigo compartilhado, pelo voto de confiança em mim depositado e pela amizade fortalecida durante este tempo de convivência.

À mais que colega, amiga, Caetana Ledur, pela agradável convivência diária e por compartilhar comigo os momentos de frustração e tristeza. Por dividir experiências e aprendizados e me incentivar quando nos momentos mais difíceis.

Às grandes amigas Helena Biasibetti e Vitória Lawall, por participarem comigo de momentos importantes tanto na vida pessoal quanto acadêmica.

À todos os meus familiares e amigos que, de uma forma ou outra, estiveram presente nesta minha jornada de luta e busca pelo conhecimento.

Aos que me ensinam desde o princípio e que sempre serão meus grandes exemplos: meus pais. Obrigada por todo o apoio, principalmente emocional, e pelo incentivo, por sempre confiarem em mim e me fazerem acreditar que sou capaz. Ao meu grande irmão, a quem admiro e com quem tenho a certeza de que sempre poderei contar. Amo vocês! À minha cunhada Taís, pelos momentos de descontração e apoio pessoal.

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>ACTB</i>	<i>Actin Beta</i> (beta-actina)
<i>AR</i>	<i>Androgen Receptor</i> (receptor de androgênio)
°C	Graus Celsius
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CC	Células do <i>cumulus oophorus</i>
CCO	Complexo <i>cumulus</i> -oócito
CG	Células murais da granulosa
CO ₂	Dióxido de carbono
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
C _q	Ciclo de Quantificação
CTG	Centro de Terapia Gênica
<i>CYP19A1</i>	<i>Cytochrome P450 Family 19 Subfamily A Member 1</i> (enzima aromatase)
DEPC	Dietilpolicarbonato
DHEA	Deidroepiandrosterona
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i> (Dimetilsulfóxido)
dNTPs	Desoxinucleotídeos trifosfatados
DOR	<i>Diminished Ovarian Reserve</i> (Reserva ovariana diminuída)
DTT	Ditiotreitol
E ₂	Estradiol
ECL	Eletroquimioluminescência
<i>ER</i>	<i>Estrogen Receptor</i> (receptor de estrogênio)
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	<i>Follicle Stimulating Hormone</i> (Hormônio folículo estimulante)

FSHR	<i>Follicle-stimulation Hormone Receptor</i> (receptor do hormônio folículo estimulante)
GEE	<i>Generalized Estimating Equations</i>
GnRH	<i>Gonadotropin-Releasing Hormone</i> (Hormônio liberador de gonadotrofinas)
hCG	<i>Human Chorionic Gonadotropin</i> (Gonadotrofina coriônica humana)
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
hMG	<i>Human Menopausal Gonadotrophin</i> (Gonadotrofina menopáusicas humana)
HPRT1	<i>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i> (hipoxantina fosforribosiltransferase do tipo 1)
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i> (Fator de crescimento do tipo 1 semelhante à insulina)
LaBiMET	Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral
LaGOM	Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular
LH	<i>Luteinizing Hormone</i> (Hormônio luteinizante)
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i> (RNA mensageiro)
MR	Má respondedora
MTT	3-(4, 5-dimetiltiazol-2)-2, 5-brometo de difeniltetrazólio
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampão salina-fosfato)
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido ribonucleico)
ROD	Resposta Ovariana Diminuída
RT-qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real a partir de Transcrição Reversa
RA	Reprodução Assistida
SB	Sulforrodamina B
SDHEA	Sulfato de dehidroepiandrosterona

SFB	Soro Fetal Bovino
SOP	Síndrome do Ovário Policístico
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TCA	Ácido tricloroacético
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
UAMP	Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas
UI	Unidade Internacional
VCAM1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i> (molécula de adesão celular vascular do tipo 1)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenvolvimento folicular e interações do oócito com as células somáticas.....	16
Figura 2: Sinergismo entre androgênio e FSH	18
Figura 3: Modelo duas células dois hormônios da esteroidogênese	19
Figura 4: Desenvolvimento de um folículo antral inicial para um folículo pré ovulatório maduro	20
Figura 5: Esquema de protocolo para obtenção de células da granulosa não luteinizadas em diferentes estágios de desenvolvimento folicular.....	21
Figura 6: Representação esquemática do desenvolvimento do experimento piloto – parte I	29
Figura 7: Representação esquemática do desenvolvimento do experimento piloto – parte II	29
Figura 8: Delineamento experimental para as células <i>early antral</i> não luteinizadas ...	30
Figura 9: Delineamento experimental para as células pré-ovulatórias não luteinizadas (expostas ao FSH nos dias 4 e 6)	31
Figura 10. Culturas finalizadas com sucesso (N=39) e culturas não finalizadas (N=10), de um total de 49 amostras coletadas (A). Culturas de granulosa (N=21) e de cumulus (N=18) finalizadas com sucesso (B). Amostras de cumulus não utilizadas (N=6) devido à pequena quantidade de células, cultura de granulosa não utilizada (N=1) devido ao insucesso do experimento e culturas de granulosa ou cumulus não utilizadas (N=3) devido à contaminação bacteriana (C).....	37
Figura 11. Células da granulosa, semeadas em placa de 6 poços, na concentração de 8×10^4 células por poço, no oitavo dia de cultivo celular.....	38
Figura 12: Análise da viabilidade celular das células da granulosa (CG) por sulforrodamina B (SB) nos dias 6, 8 e 10	39
Figura 13: Análise da viabilidade celular das células da granulosa (CG) por MTT nos dias 6, 8 e 10	40
Figura 14: Análise da viabilidade celular das células do cumulus (CC) por sulforrodamina B (SB) nos dias 6, 8 e 10	40
Figura 15: Análise da viabilidade celular das células do cumulus (CC) por MTT nos dias 6, 8 e 10	41

Figura 16: Análise da viabilidade celular das células da granulosa (CG) por sulforrodamina B (SB) nos grupos controle e tratados com 5 diferentes doses de SDHEA.....	43
Figura 17: Análise da viabilidade celular das células da granulosa (CG) por MTT nos grupos controle e tratados com 5 diferentes doses de SDHEA	44
Figura 18: Análise da viabilidade celular das células do cumulus (CC) por sulforrodamina B (SB) nos grupos controle e tratados com 5 diferentes doses de SDHEA.....	44
Figura 19: Análise da viabilidade celular das células do cumulus (CC) por MTT nos grupos controle e tratados com 5 diferentes doses de SDHEA	45

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Informações das pacientes das quais foram coletadas células da granulosa e do *cumulus oophorus* para o desenvolvimento da etapa III do trabalho..... 46
- Tabela 2.** Média dos valores de sulfato de dehidroepiandrosterona (SDHEA), em µg/dL, do sobrenadante das células murais da granulosa (CG) no estágio *early antral*, nos dias 1, 4, 6 e 8 de cultivo celular, nos grupos controle e tratado (com SDHEA)..... 48
- Tabela 3.** Média dos valores de sulfato de dehidroepiandrosterona (SDHEA), em µg/dL, do sobrenadante das células murais da granulosa (CG) no estágio pré-ovulatório, nos dias 1, 4, 6 e 8 de cultivo celular, nos grupos controle e tratado (com SDHEA)..... 48
- Tabela 4.** Média dos valores de sulfato de dehidroepiandrosterona (SDHEA), em µg/dL, do sobrenadante das células do *cumulus oophorus* (CC) no estágio pré-ovulatório, nos dias 1, 4, 6 e 8 de cultivo celular, nos grupos controle e tratado (com SDHEA)..... 48
- Tabela 5:** Média dos valores de estradiol (E₂), em pg/mL, do sobrenadante das células murais da granulosa (CG) no estágio *early antral*, nos dias 1, 4, 6 e 8 de cultivo celular, nos grupos controle e tratado (com SDHEA) 49
- Tabela 6.** Média dos valores de estradiol (E₂), em pg/mL, do sobrenadante das células murais da granulosa (CG) no estágio pré-ovulatório, nos dias 1, 4, 6 e 8 de cultivo celular, nos grupos controle e tratado (com SDHEA) 49
- Tabela 7.** Média dos valores de estradiol (E₂), em pg/mL, do sobrenadante das células do *cumulus oophorus* (CC) no estágio pré-ovulatório, nos dias 1, 4, 6 e 8 de cultivo celular, nos grupos controle e tratado (com SDHEA)..... 50
- Tabela 8.** Média dos valores de progesterona (P), em ng/mL, do sobrenadante das células murais da granulosa (CG) no estágio *early antral*, nos dias 1, 4, 6 e 8 de cultivo celular, nos grupos controle e tratado (com SDHEA)..... 50
- Tabela 9.** Média dos valores de progesterona (P), em ng/mL, do sobrenadante das células murais da granulosa (CG) no estágio pré-ovulatório, nos dias 1, 4, 6 e 8 de cultivo celular, nos grupos controle e tratado (com SDHEA)..... 50
- Tabela 10.** Média dos valores de progesterona (P), em ng/mL, do sobrenadante das células do *cumulus oophorus* (CC) no estágio pré-ovulatório, nos dias 1, 4, 6 e 8 de cultivo celular, nos grupos controle e tratado (com SDHEA)..... 51
- Tabela 11.** Valores dos ciclos de quantificação dos cinco genes alvo (*AR*, *CYP19A1*, *ER*, *FSHR* e *VCAM1*) e dos dois genes normalizadores (*ACTB* e *HPRT1*) das reações em cadeia da polimerase em tempo real a partir de transcrição reversa para as células murais da granulosa (CG) e do *cumulus oophorus* (CC)..... 62

RESUMO

O folículo ovariano é composto pelo oócito (gameta feminino) e por várias camadas de células foliculares somáticas, sendo que destas, as mais intimamente associadas com o oócito são as células do *cumulus oophorus* (CCs), as quais estão em contato direto com o gameta feminino e formam o complexo *cumulus*-oócito (CCO), e as células murais da granulosa (CGs), que revestem a parede do folículo ovariano. Visto que estas CGs e CCs são facilmente acessadas durante tratamentos de reprodução assistida (RA), que podem ser coletadas sem comprometimento do oócito e que são descartadas após a recuperação do oócito é possível que elas sejam utilizadas em pesquisas que visam elucidar a fisiologia ovariana. No entanto, quando recuperadas, nos ciclos de reprodução assistida, estas células se encontram em um estado luteinizado, devido ao tratamento hormonal que as pacientes realizam. Sabe-se que o uso de CGs luteinizadas em cultura celular para o estudo do processo molecular ovulatório é limitado visto esta prévia exposição celular às gonadotrofinas e ao seu estado luteinizado. Porém, foi demonstrado que CGs luteinizadas podem readquirir sua capacidade de resposta à estimulação por gonadotrofinas, recuperando características semelhantes às daquelas de folículos não luteinizados nos estágios iniciais de diferenciação (*early antral* não luteinizado). A estimulação destas células com FSH causa aumento na expressão de genes que caracterizam CGs típicas de folículos pré-ovulatórios (pré-ovulatório não luteinizado). Ainda, outra questão importante com relação ao folículo ovariano diz respeito à ação dos androgênios nesta estrutura ovariana, sendo que já se sabe que a ativação do receptor de androgênio, localizado nas células foliculares, é capaz de modular a expressão e a atividade de genes importantes para a manutenção do desenvolvimento do folículo ovariano. Desta forma, sugere-se que o efeito reprodutivo do tratamento com dehidroepiandrosterona (DHEA) e seu sulfato (SDHEA), importantes androgênios, pode ser devido às suas ações justamente no microambiente folicular. Portanto, o objetivo deste trabalho foi analisar a exposição de células foliculares desluteinizadas (estágios *early antral* e pré-ovulatório) ao SDHEA. Para isto, células da granulosa e do cumulus foram obtidas de pacientes submetidas à fertilização *in vitro* e foram cultivadas separadamente. Inicialmente, fez-se a determinação do melhor tempo de cultivo deste modelo celular proposto, dentre 6, 8 ou 10 dias de cultivo. As análises de viabilidade celular realizadas mostraram que o melhor tempo para o cultivo primário folicular, para as próximas etapas do trabalho, seria de oito dias. Após, também por análises de viabilidade celular, a melhor dose de SDHEA para exposição às células foliculares foi determinada dentre cinco doses testadas em comparação a um controle sem exposição hormonal. As análises mostraram

que a dose mais adequada a ser utilizada era a dose de 0,08 μM de SDHEA. Posteriormente, tendo definido o melhor tempo de cultivo e a dose ideal de exposição das células em questão ao SDHEA, os experimentos foram realizados com dois grupos experimentais distintos: células *early antral* não luteinizadas e células pré-ovulatórias não luteinizadas – expostas ao FSH. Ambos os grupos foram divididos em dois subgrupos: grupo controle (sem exposição hormonal) e grupo SDHEA (com exposição ao SDHEA). Foram feitas dosagens hormonais de SDHEA, de estradiol e de progesterona nos dias 1, 4, 6 e 8 do sobrenadante do cultivo celular. A análise ao longo do tempo mostrou que os valores das dosagens de SDHEA se mantiveram constantes no grupo controle durante todo o período de cultivo celular, não havendo diferença estatística entre as quatro dosagens hormonais feitas neste grupo. Por outro lado, no grupo tratado houve diferença nos valores deste hormônio nos dias 6 e 8, em comparação aos dias 1 e 4, devido justamente ao tratamento com SDHEA realizado neste grupo experimental. Com relação ao estradiol, independente do tipo celular e do estágio de desenvolvimento, foi possível ver que a sua secreção era elevada no primeiro dia de cultivo, diminuindo nos outros dias devido às condições e ao tempo de cultivo do protocolo de desluteinização celular. Além disso, as células tratadas com SDHEA apresentaram uma secreção de estradiol superior àquelas não tratadas. Por fim, as dosagens de progesterona revelaram que o tratamento com SDHEA não alterou a secreção deste hormônio pelas células, em nenhum dos dois estágios de desenvolvimento. Ainda, as células apresentaram uma secreção aumentada de progesterona no sexto dia de cultivo celular em comparação ao primeiro e ao quarto dia; porém, esta secreção começou a diminuir quando do oitavo dia de cultivo. Tendo em vista os resultados obtidos, podemos concluir que o tratamento com SDHEA é capaz de aumentar a secreção de estradiol de células foliculares não luteinizadas, não alterando a secreção de progesterona dessas mesmas células. Mais estudos são necessários para um melhor entendimento dos efeitos do SDHEA nos processos que compõem a foliculogênese.

Palavras-chave: sulfato de dehidroepiandrosterona; células foliculares; desluteinização; secreção hormonal.

ABSTRACT

Ovarian follicle is formed by the oocyte (female gamete) and somatic follicular cells. Those closer to the oocyte are cumulus oophorus cells (CCs), which are in direct contact with the female gamete, and the granulosa mural cells (GCs), which form the wall of the ovarian follicle. As GCs and CCs are easily accessed during assisted reproduction procedures and are discarded after oocyte retrieval, they can be used in research aimed at elucidating ovarian physiology. However, when recovered in assisted reproduction cycles, these cells are in a luteinized state due patient hormonal treatment. It is known that the use of luteinized GCs to study the molecular ovulatory process is limited due to this prior cellular exposure to gonadotrophins and their luteinized state. However, luteinized CGs have been shown to reacquire similar characteristics to those of non-luteinized follicles in early stages of differentiation (non-luteinized early antral). Stimulation of these cells with follicle stimulating hormone (FSH) increases expression of genes that characterize CGs typical of pre ovulatory follicles (non-luteinized pre ovulatory). Another important question regarding the ovarian follicle relates to androgens action in this ovarian structure. As it is known, androgen receptor activation, located in follicular cells, is able to modulate expression and activity of important genes for the maintenance of ovarian follicle development. Thus, authors suggest that the reproductive effect of dehydroepiandrosterone (DHEA) and their sulfate (SDHEA) treatment, important androgens, may be due their actions precisely in the follicular microenvironment. Consequently, the aim of this work was to analyze the exposure to SDHEA of non-luteinized follicular cells (early antral and pre-ovulatory stages). Granulosa and cumulus cells were obtained from patients submitted to in vitro fertilization and were separately cultivated. Initially, the best culture time of this proposed cellular model was determined among 6, 8 or 10 days of culture. Cellular viability analysis showed that primary follicular culture for the next steps of the study would be of 8 days. Thereafter, cellular viability assays were used to determine the best SDHEA dose among 5 doses to follicular cells exposure in comparison to a control without hormonal exposure. The analysis showed that the best dose to use was 0,08 μM of SDHEA. Subsequently, after defined the best culture time and the ideal exposure dose of the cells to SDHEA, experiments were performed with two different experimental groups: non-luteinized early antral cells and non-luteinized pre ovulatory cells – exposed to FSH. Both groups were divided in two subgroups: control group (no hormonal exposure) and SDHEA group (with SDHEA exposure). SDHEA, estradiol and progesterone hormonal dosages of the cell culture supernatant were done on days 1, 4, 6 and 8. Over time analysis revealed that

SDHEA values were constant in control group during all the cell culture period, without statistical difference between the four hormonal dosages performed in this group. However, treated group showed a difference in the values of this hormone on days 6 and 8, compared to days 1 and 4, due to treatment with SDHEA of these experimental group . Regarding estradiol, independent of cell type and stage of development, it was possible to see that its secretion was high on the first day of culture, decreasing in others due to conditions and time of culture of the non-luteinized cells protocol. In addition, the SDHEA treated cells presented higher estradiol secretion than those not treated. Finally, progesterone dosages revealed that treatment with SDHEA did not alter this hormone secretion from the cells in either of the two development stages. Besides that, the cells had an increased progesterone secretion on the sixth cell culture day compared to first and fourth day; however, this secretion began to decrease on the eight day of culture. In conclusion, SDHEA treatment is able to increases the non-luteinized follicular cells secretion of estradiol, but it is not able to modify the progesterone secretion of the same cells. More studies are needed to better understand the effects of SDHEA on the process that make part of folliculogenesis.

Keywords: dehydroepiandrosterone sulfate; follicular cells; non-luteinized cells; hormonal secretion.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. HIPÓTESES OPERACIONAIS (H ₀) E CONCEITUAIS (H _c)	25
3. OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo geral	26
3.2 Objetivos específicos	26
4. MÉTODO	27
4.1 Delineamento do estudo	27
4.2 Local de execução	27
4.3 Pacientes	27
4.4 Punção ovariana e coleta das células murais da granulosa	27
4.5 Coleta das células do <i>cumulus oophorus</i>	28
4.6 Cultivo das células murais da granulosa e do <i>cumulus oophorus</i>	28
4.7 Delineamento experimental	28
4.8 Cálculo do tamanho de amostra	31
4.9 Avaliação da viabilidade celular	31
4.10 Dosagens hormonais no sobrenadante celular	32
4.11 Descarte de resíduos	33
4.12 Análise estatística	33
4.13 Aspectos éticos	34
5. RESULTADOS	35
Resultados gerais	36

Determinação do tempo de cultivo das células murais da granulosa e das células do <i>cumulus oophorus</i>	39
Determinação da dose de sulfato de dehidroepiandrosterona a ser utilizada em cultura primária de células foliculares	42
Análise de dosagens hormonais do sobrenadante do cultivo celular no modelo celular estabelecido	46
6. DISCUSSÃO	52
7. CONCLUSÕES	63
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
9. ANEXOS	68
9.1 Anexo 1	68
9.2 Anexo 2	71
9.3 Anexo 3	76
9.4 Anexo 4	80

1. INTRODUÇÃO

O folículo ovariano (estrutura funcional do ovário) é composto pelo oócito (gameta feminino) e por várias camadas de células somáticas (células da teca externa, células da teca interna, células murais da granulosa, células do *cumulus oophorus*) que têm como principais funções proteger e nutrir o oócito e, por influência hormonal, guiá-lo através de eventos necessários para que este possa alcançar sua competência nuclear e citoplasmática (Fragouli, Lalioti et al. 2014). Sabe-se que as células foliculares mais intimamente associadas com o oócito são as células do *cumulus oophorus* (CCs), as quais estão em contato direto com o gameta feminino e formam o complexo *cumulus*-oócito (COC), e as células murais da granulosa (CGs), que revestem a parede do folículo ovariano (Fragouli, Lalioti et al. 2014), como pode ser visto na parte A da figura 1. Existe importante intercomunicação entre os tipos celulares mencionados anteriormente (oócito, CG e CC) (figura 1B), como por exemplo, a obtenção de nutrientes do oócito para seu metabolismo energético através destas células somáticas (Uyar, Torrealday et al. 2013). Esta interação provê condições adequadas para o desenvolvimento oocitário, para a ovulação, para a fertilização e para a implantação, através da expressão e da transferência de importantes moléculas entre as células (Ophir, Yung et al. 2014). Desta forma, como as células foliculares encontram-se no mesmo microambiente que o oócito que circundam, elas são capazes de revelar informações importantes sobre o gameta feminino, bem como prever, de forma indireta, a qualidade oocitária (Fragouli, Lalioti et al. 2014). Assim, visto que CGs e CCs são facilmente acessadas durante tratamentos de reprodução assistida (RA), que podem ser coletadas sem comprometimento do oócito e que são descartadas após a recuperação do oócito é possível que elas sejam utilizadas em pesquisas que visam elucidar a fisiologia ovariana (Fragouli, Lalioti et al. 2014). Considera-se que seja importante a avaliação da qualidade destas células foliculares quando de sua utilização como modelo experimental, e, visto isso, foram encontrados resultados que relacionaram a proteína VCAM1 (molécula de adesão celular vascular 1) com este tópico. A VCAM1 é uma glicoproteína transmembrana que pertence à superfamília das imunoglobulinas. Sabe-se que ela é uma mediadora importante na adesão e no extravasamento de células brancas sanguíneas durante reações imunes e inflamatórias (Stocco and Fum 2008). Moléculas de adesão desempenham um papel essencial no reconhecimento intercelular, bem como nas interações ovarianas, participando da regulação dos processos de remodelamento cíclicos ovarianos. Visto isso, correlações entre o conteúdo intrafolicular de VCAM1 e resultados reprodutivos foram observadas em mulheres que foram

submetidas a protocolo longo de estimulação com agonista do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) (Fornaro, Cobellis et al. 2007). Benifla e colaboradores, em 2001 (Benifla, Bringuier et al. 2001), mostraram uma relação positiva altamente significativa entre as concentrações foliculares de VCAM1 e a taxa de fertilização, sugerindo, assim, que a concentração desta molécula possa ser utilizada como um marcador de fertilização. Portanto, fazer uma avaliação da expressão gênica de *VCAM1* poderia ser um bom indicador da qualidade das células foliculares em estudo.

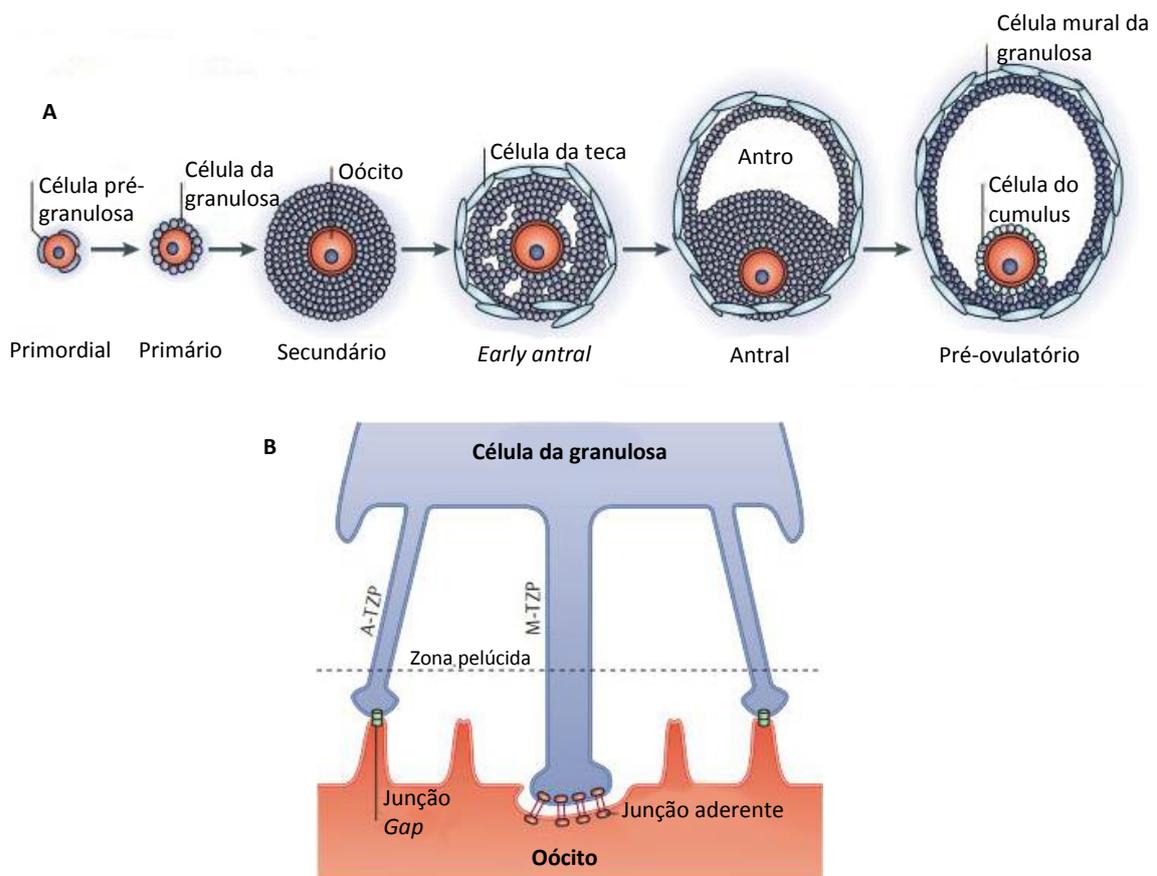


Figura 1. Desenvolvimento folicular (A) e interações do oócito com as células somáticas (B). Modificado de Li, 2013 (Li and Albertini 2013).

Porém, apesar da origem em comum e do compartilhamento de ambiente, a expressão gênica das células foliculares varia, como demonstrado por Koks e colaboradores (Koks, Velthut et al. 2010), havendo, por exemplo, maior expressão de genes relacionados com a esteroidogênese em células da granulosa quando comparado com células do *cumulus*. Da mesma forma, Schneider e colaboradores (2014, dados ainda não publicados) demonstraram variação quanto aos genes de referência para análises de expressão gênica em cultivo

primário de CG e de CC, sendo necessário um gene para normalização dos experimentos com CC e dois para os com CG. Além da diferença de expressão gênica, as células somáticas que compõem o folículo ovariano podem divergir com relação à atividade de algumas enzimas. Enzimas androgênicas, por exemplo, são expressas principalmente nas células da teca, não tendo expressão significativa em CGs, sendo que as principais enzimas já são expressas pela primeira vez no folículo secundário e, então, mais intensamente nos folículos antrais (Ford 2013) - o que sugere uma importância primária dos androgênios especialmente nos estágios iniciais da maturação folicular (Gleicher, Weghofer et al. 2011). Também foi descrito que os androgênios podem, potencialmente, modular as atividades do hormônio folículo estimulante (FSH) em CGs em desenvolvimento, agindo, portanto, como importantes moduladores da diferenciação de células da granulosa e da maturação folicular, especialmente durante os estágios antrais iniciais (Gleicher, Weghofer et al. 2011) (figura 2). Por exemplo, já foi comprovado que androgênios estimulam o efeito do FSH de aumentar expressão da enzima aromatase (CYP19A1) – necessária para a conversão dos androgênios em estrogênios, evidenciando que estes hormônios produzidos pelas células da teca agem, não somente como um substrato para a síntese de estrogênios, mas também modulando a ação do FSH via a ativação de receptores de androgênios (AR) (Stocco 2008). Interações entre AR e FSH podem, assim, ser vistas como uma forma de sinergismo, visto que as CGs respondem ao FSH com mudanças no metabolismo androgênico (Gleicher, Weghofer et al. 2011). No entanto, apesar da grande quantidade de artigos que descrevem o processo de foliculogênese, o entendimento do desenvolvimento deste processo é ainda incompleto (Fragouli, Lalioti et al. 2014) e, portanto, diversos autores realizam estudos objetivando entender o desenvolvimento folicular. Assim, eles utilizam as células foliculares coletadas de pacientes submetidas a tratamentos de infertilidade como modelo experimental do estudo, visto que elas são descartadas em alguns procedimentos de RA (Fragouli, Lalioti et al. 2014), conforme afirmado anteriormente.

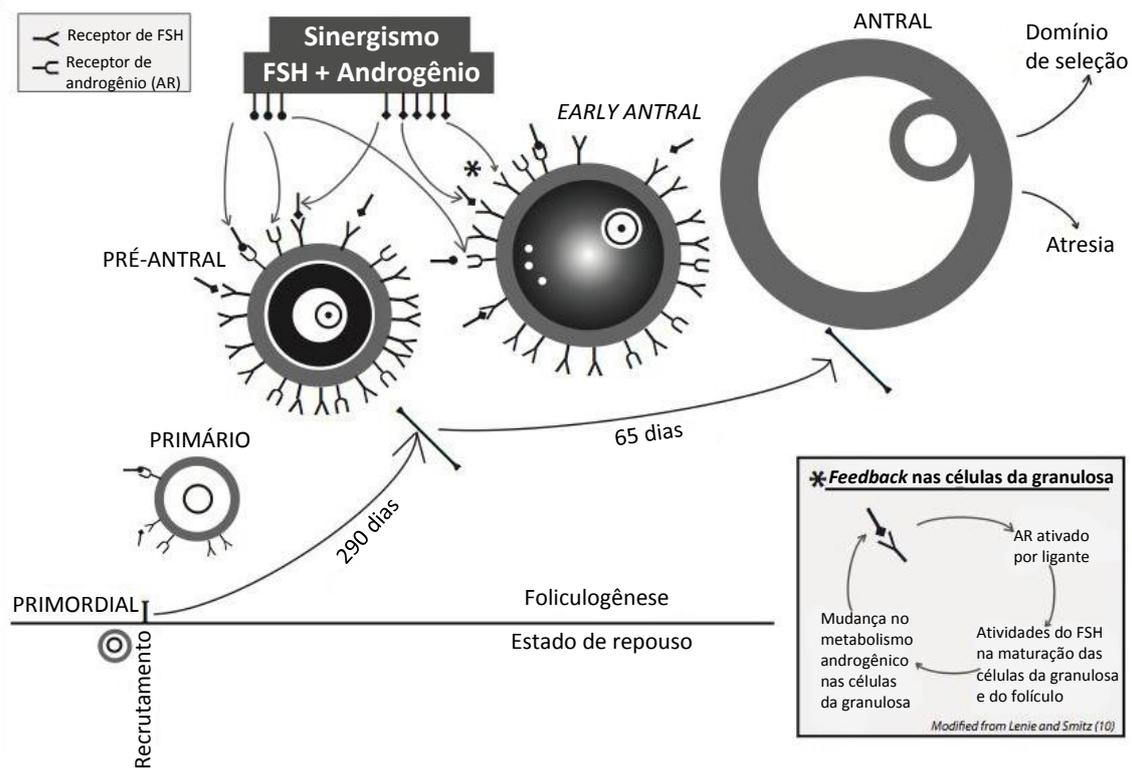


Figura 2. Sinergismo entre androgênio e FSH. A figura ilustra o potencial sinergismo de androgênios e hormônio folículo estimulante (FSH) durante a foliculogênese inicial. Modificado de Gleicher, 2011 (Gleicher, Weghofer et al. 2011).

Os hormônios esteroides sexuais, produzidos nos folículos ovarianos, desempenham um papel crucial na regulação da função ovariana, proporcionando a manutenção do desenvolvimento folicular (Gervasio, Bernuci et al. 2014). Dentre estes, os progestágenos e os estrógenos são amplamente estudados e os mecanismos pelos quais atuam nos ciclos ovariano e menstrual já estão bem estabelecidos. Os estrogênios são secretados principalmente na fase proliferativa ovariana, sendo responsáveis pelo crescimento dos folículos, em ação conjunta ao FSH, além de estimularem a proliferação do endométrio e induzirem o pico de LH (hormônio luteinizante) responsável pela ovulação (Moore 2008). A progesterona, principal progestágeno, está presente principalmente na fase lútea ovariana; sua secreção induz a luteinização das células foliculares e estimula o epitélio glandular do endométrio a secretar líquido contendo glicogênio (Moore 2008). O estradiol (E_2), principal estrogênio produzido em humanos, age no ovário, juntamente com as gonadotrofinas secretadas pela hipófise anterior, para proporcionar uma foliculogênese e uma produção de esteroides bem sucedidas (Stocco 2008). As células da granulosa expressam receptores para FSH e produzem estrogênios. As células da teca, por sua vez, expressam o receptor para LH e produzem quantidades significativas de androstenediona e de testosterona (Koeppen and

Stanton 2009; Fragouli, Lalioti et al. 2014); estes androgênios, então, são convertidos em estrogênios pelas células da granulosa. A figura 3 ilustra o modelo conhecido como “duas células dois hormônios para a esteroidogênese”, o qual descreve o papel das células da teca e da granulosa na produção dos esteroides, enfatizando a cooperação entre os dois tipos celulares que é necessária para a produção de estrogênio (Drummond 2006). O FSH estimula a proliferação de CGs e induz a expressão da enzima aromatase, para que esta faça a conversão dos androgênios em estrogênios (Koeppen and Stanton 2009; Fragouli, Lalioti et al. 2014). Além disso, o FSH estimula o aparecimento de receptores de LH nas células da granulosa durante a segunda metade da fase folicular (Garzo and Dorrington 1984; Koeppen and Stanton 2009), já que no estágio de desenvolvimento folicular imediatamente anterior à ovulação, o LH apresenta efeito também nestas células, convertendo tanto as células tecais, quanto as CGs, em células secretoras de progesterona. Após a ovulação, as células da granulosa e as tecais internas remanescentes (a massa celular é, nesta fase, denominada corpo lúteo) se transformam em células luteínicas, devido, justamente, à ação do LH (processo denominado luteinização) (Hall 2011).

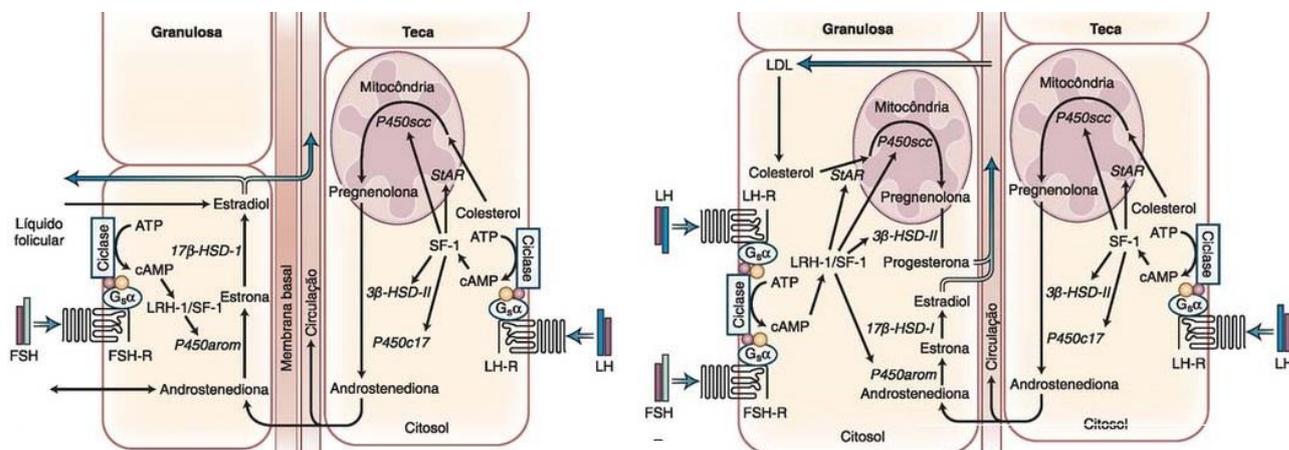


Figura 3. Modelo duas células dois hormônios para a esteroidogênese. Retirado de Kronenberg, 2010 (Kronenberg, Melmed et al. 2010).

Durante a maturação dos folículos ovarianos primordiais em folículos pré-ovulatórios, as células foliculares passam por grandes mudanças (tanto morfológicas quanto funcionais), como resultado de uma dinâmica folicular complexa, bem como por diferentes estágios de

diferenciação, de acordo com sua localização no ovário e com a fase do ciclo reprodutivo feminino (Koeppen and Stanton 2009; Vireque, Campos et al. 2015). A figura 4 ilustra um folículo antral inicial, o qual apresenta uma cavidade antral em formação, e um folículo antral grande recrutável, o qual já atingiu o estado em que pode ser recrutado para se tornar um folículo pré-ovulatório (Koeppen and Stanton 2009). A formação do antro folicular coincide com a diferenciação das células da granulosa em duas linhagens celulares anatomicamente distintas, as células murais da granulosa, que contornam a parede folicular, e as células do *cumulus oophorus*, que circundam o oócito (Koeppen and Stanton 2009; Fragouli, Lalioti et al. 2014). A foliculogênese propriamente dita pode ser dividida em duas fases, sendo que a primeira (denominada pré-antral ou dependente de gonadotrofinas) é caracterizada pelo crescimento e diferenciação do oócito, e a segunda (denominada antral ou independente de gonadotrofinas) é caracterizada pelo grande aumento de tamanho do folículo ovariano (Williams and Erickson 2012).

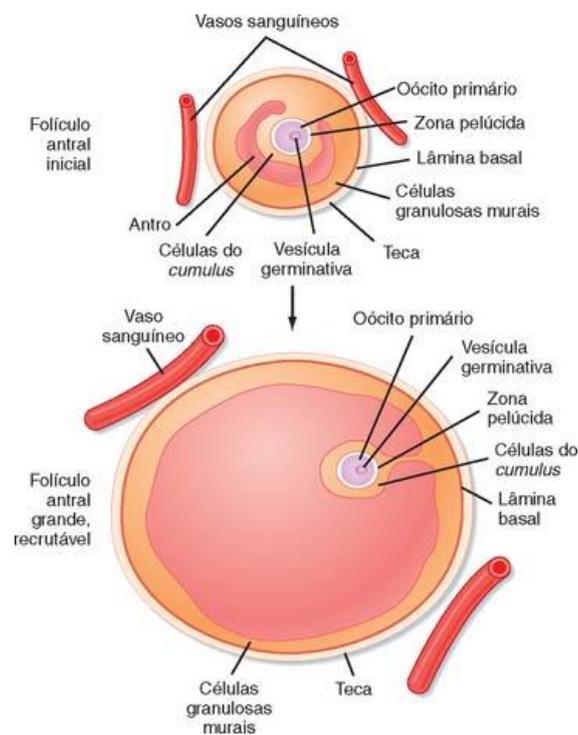


Figura 4. Desenvolvimento de um folículo antral inicial para um folículo antral recrutável. Retirado de Koeppen, 2009 (Koeppen and Stanton 2009).

Além disso, diferentes padrões de expressão gênica em cultura primária de CGs foram demonstrados conforme estas células passam do estado luteinizado (estado em que as células são recuperadas nos ciclos de reprodução assistida, devido ao tratamento hormonal

das pacientes) para o não luteinizado e, portanto, o uso de CGs luteinizadas em cultura celular para o estudo do processo molecular ovulatório é limitado devido à prévia exposição destas células às gonadotrofinas e ao seu estado luteinizado (Ophir, Yung et al. 2014). Devido à estimulação hormonal dos procedimentos de fertilização *in vitro* (FIV), as células da granulosa se tornam insensíveis e perdem sua capacidade de resposta aos hormônios hCG (gonadotrofina coriônica humana) e FSH quando cultivadas. Porém, foi demonstrado que CGs luteinizadas readquirem sua capacidade de resposta à estimulação por gonadotrofinas após alguns dias em cultura em um meio livre de hormônios (Breckwoldt, Selvaraj et al. 1996). Sugere-se que, após quatro dias de cultivo, CGs luteinizadas obtidas de procedimentos de FIV transformam seus padrões de expressão gênica (quando em um ambiente livre de hormônios com troca diária de meio de cultura) para aqueles de folículos não luteinizados nos estágios iniciais de diferenciação (*early antral* não luteinizado), como mostrado na figura 5. A estimulação destas células com FSH por 48 horas causa aumento na expressão de genes que caracterizam CGs típicas de folículos pré-ovulatórios (pré-ovulatório não luteinizado) (Ophir, Yung et al. 2014). Visto isso, a possível limitação de trabalho com estas células (o fato de elas serem recuperadas com características de células luteinizadas) pode ser metodologicamente contornada, apesar de ser necessária a comprovação bioquímica e/ou molecular da reprogramação celular ocorrida.

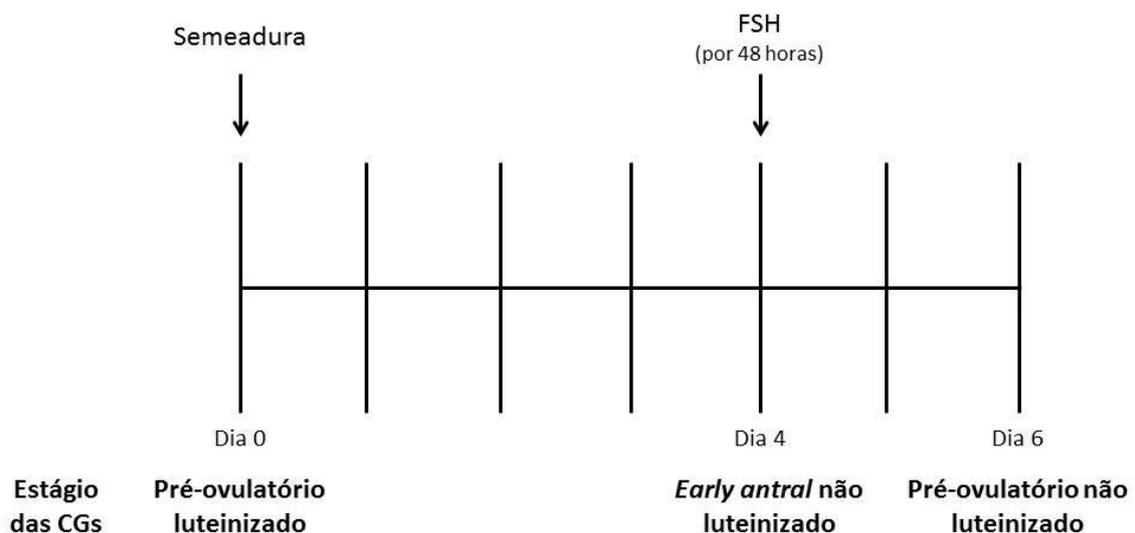


Figura 5. Esquema de protocolo para obtenção de células da granulosa não luteinizadas em diferentes estágios de desenvolvimento folicular. Adaptado de Ophir, 2014 (Ophir, Yung et al. 2014).

A habilidade das células foliculares de sintetizar estrogênio já foi demonstrada como sendo um pré-requisito para o desenvolvimento normal do folículo (Garzo and Dorrington 1984), sendo que já foi comprovado que camundongos *knockout* para o receptor de estrogênio (ER), tanto do subtipo α (*Esr1*) quanto do subtipo β (*Esr2*), apresentam distintos defeitos ovarianos que levam ao comprometimento da fertilidade. No entanto, o fenótipo ovariano em camundongos *knockout* somente para *Esr1* ou somente para *Esr2* sugere que este último desempenhe um papel intraovariano mais crítico do que o primeiro. Esta hipótese é reforçada por evidências que mostram que o ER β é a forma de ER predominantemente expressa nas células da granulosa de folículos maduros e em crescimento no ovário de roedores (Esfahani, Pisansky et al. 2011). Análises *in situ* de localização do ER em ovários de roedores também mostraram que os níveis de RNA mensageiro (mRNA) do ER β são predominantemente maiores em células da granulosa, enquanto que os do ER α apresentam-se maiores no tecido luteinizado (Sharma, Clemens et al. 1999). Assim como Couse e colaboradores (Couse, Yates et al. 2005), Sharma e colaboradores (Sharma, Clemens et al. 1999) demonstraram que o ER β é o subtipo de ER predominante presente em células da granulosa imaturas e pré-ovulatórias, estando ausente em culturas de CGs luteinizadas. Por outro lado, Jakimiuki e colaboradores (Jakimiuk, Weitsman et al. 2002), demonstraram que, no ovário humano, o ER α é mais expresso nas células da granulosa do que nas células da teca, enquanto que o ER β é expresso em níveis similares nestes dois tipos celulares. Em suma, todos estes dados são consistentes com a hipótese de que o estradiol apresenta um papel na regulação do crescimento e do desenvolvimento de folículos dominantes em mulheres, sendo que estudos em animais *knockout* para os receptores de estrogênio mostraram que os ERs são um pré-requisito para o funcionamento apropriado do eixo hipotalâmico-hipofisário-ovariano e para que ocorra uma ovulação bem sucedida (Rajaei, Barzegar et al. 2010). Corroborando estes achados, também já foi evidenciado que o estradiol e os seus receptores têm um grande impacto em regular a função celular ovariana e a expressão de genes específicos nas células da granulosa (Sharma, Clemens et al. 1999).

Outra classe de hormônios que se relaciona com os folículos ovarianos é a dos androgênios. Porém, o entendimento dos efeitos destes hormônios na maturação folicular e na indução da ovulação vem sendo alterado, já que o papel dos androgênios, tido como prejudicial à foliculogênese, está sendo contestado (Gleicher, Weghofer et al. 2011). Estudos *in vitro* têm demonstrado que distintos androgênios podem estimular o crescimento e o desenvolvimento dos folículos ovarianos em mamíferos (Gervasio, Bernuci et al. 2014). No entanto, também há evidências na literatura da ação nociva dos androgênios sobre o folículo

ovariano quando presentes em quantidades excessivas (Gervasio, Bernuci et al. 2014). Desta forma, faz-se importante o entendimento da real função destes hormônios na regulação da foliculogênese. Ao avaliarmos a fisiologia ovariana, cronologicamente, primeiro os oócitos apresentam receptor de androgênio e, posteriormente, este passa a ser expresso pelas células da teca, revelando a ocorrência da troca de efeito - as células somáticas são as responsáveis por criar o ambiente adequado para a maturação do oócito, sendo que foi demonstrado que a presença de AR no oócito de mamíferos pode até ser prejudicial. Logo, tem-se que os androgênios atuam sobre as células somáticas e, assim, apresentam efeito indireto sobre o oócito (Gleicher, Weghofer et al. 2011). Conseqüentemente, o estudo da ação dos androgênios está em crescimento, e já se sabe que a ativação do receptor de androgênio, localizado nas células foliculares, é capaz de modular a expressão e a atividade de genes importantes para a manutenção do desenvolvimento do folículo ovariano (Gervasio, Bernuci et al. 2014). Desta forma, autores sugerem que os efeitos reprodutivos do tratamento com dehidroepiandrosterona (DHEA), importante androgênio, pode ser devido à sua ação justamente no microambiente folicular (Ford 2013).

A DHEA e o seu sulfato (sulfato de dehidroepiandrosterona – SDHEA) são dois androgênios ativos produzidos principalmente pela zona reticular das glândulas adrenais (Stocco and Anderson 2008; Stocco 2008). O primeiro é o principal pró-hormônio relacionado com a biossíntese de testosterona e de estrogênio, seus níveis séricos seguem o ritmo circadiano e sua meia-vida é de aproximadamente 25 minutos. Por outro lado, o SDHEA tem uma meia-vida de 10 horas e seus níveis séricos são, normalmente, estáveis ao longo do dia (Burkhardt, Schmidt et al. 2013). Ambos circulam no organismo humano em grandes quantidades durante a vida reprodutiva feminina. No entanto, suas concentrações diminuem progressivamente com a idade (Orentreich, Brind et al. 1984), o que gerou especulações de que a reposição de DHEA e de SDHEA nos indivíduos mais idosos poderia ter efeitos retardadores da idade (Stocco 2008). Nos ovários de humanos, a DHEA e outros androgênios são produzidos principalmente pelas células da teca. Nestas mesmas células, a DHEA é convertida em androstenediona e testosterona, as quais são transportadas para as células da granulosa (Ford 2013). A enzima aromatase, expressa pelas CGs, então, converte androstenediona e testosterona em estrona (um estrógeno fraco) e 17 β estradiol (um estrógeno potente) (Koeppen and Stanton 2009). O gene responsável pela produção desta enzima tem sua expressão controlada de maneira específica da célula, de tempo e de espaço, o que faz com que produção significativa de estradiol seja vista apenas nas células murais da granulosa de folículos antrais grandes e em células lúteas (Stocco 2008).

Os possíveis efeitos terapêuticos da suplementação com DHEA (devido ao aumento dos níveis sanguíneos de IGF-1) em pacientes com resposta ovariana diminuída (ROD) foram primeiramente relatados por Casson e colaboradores (Casson, Lindsay et al. 2000; Stocco 2008; Qin, Fan et al. 2016) e, desde lá até hoje, aproximadamente 26% das clínicas que realizam procedimento de fertilização *in vitro* (FIV), em 45 países, têm utilizado protocolos de suplementação com DHEA em mulheres com reserva ovariana diminuída (Xu, Li et al. 2014; Qin, Fan et al. 2016). O estudo de série de casos realizado por Casson, em 2000 (Casson, Lindsay et al. 2000), mostrou que as cinco pacientes participantes do estudo tiveram uma resposta aumentada ao tratamento com gonadotrofinas exógenas quando da suplementação oral com DHEA concomitante. Morales e colaboradores, em 1994 (Koksal and Oktem 2010), demonstraram que a suplementação com DHEA, tanto em homens quanto em mulheres, aumentou as concentrações séricas de IGF-1 e propuseram, portanto, um possível mecanismo de ação para este hormônio no organismo humano. Por outro lado, Haning e colaboradores (Rangan, Pippin et al. 2005) propuseram um mecanismo de ação diferente para a DHEA, no qual ela exerce seus efeitos através da sua molécula sulfatada. Foi demonstrado, portanto, o papel da SDHEA em atuar como um pré-hormônio da testosterona, sendo que 48% da testosterona do fluido folicular originou-se da SDHEA circulante nas pacientes tratadas com este hormônio. Ou seja, a SDHEA atua como um pró-hormônio de grande importância para a esteroidogênese sexual folicular ovariana (Rangan, Pippin et al. 2005). A meta-análise realizada por Qin e colaboradores (Qin, Fan et al. 2016), mostrou que, por um lado, resultados de estudos (Wiser, Gonen et al. 2010; Yeung, Chai et al. 2014; Zhang, Xu et al. 2014) revelaram que o pré-tratamento com DHEA para FIV em mulheres com diminuição da reserva ovariana (DOR) não aumentou a taxa clínica de gravidez. Porém, por outro lado, diversos estudos retrospectivos (Barad, Brill et al. 2007; Xu, Li et al. 2014) tiveram conclusões opostas. Visto isso, percebe-se que o mecanismo de ação deste hormônio esteroide continua obscuro e que existem diversas controvérsias a respeito deste tópico.

Desta forma, unindo-se o que foi afirmado anteriormente, pode-se perceber que o estudo da exposição das células foliculares aos androgênios, em especial à DHEA e ao seu sulfato, está em evolução, mas que é importante fazer com que estas células se encontrem em um estado não luteinizado. Portanto, tem-se que o objetivo deste trabalho é analisar, sob diferentes aspectos, a exposição de células foliculares não luteinizadas (estágios *early antral* e pré-ovulatório) ao sulfato de dehidroepiandrosterona.

2. HIPÓTESES OPERACIONAIS (H_0) E CONCEITUAIS (H_c)

H_{01} : a secreção de estradiol é igual nas células foliculares expostas ao SDHEA em comparação às não expostas (grupo controle).

H_{c1} : a secreção de estradiol é maior nas células foliculares expostas ao SDHEA em comparação às não expostas (grupo controle).

H_{02} : a secreção de progesterona é igual nas células foliculares expostas ao SDHEA em comparação às não expostas (grupo controle).

H_{c2} : a secreção de progesterona é maior nas células foliculares expostas ao SDHEA em comparação às não expostas (grupo controle).

H_{03} : a secreção de estradiol se mantém constante durante o tempo do protocolo de desluteinização.

H_{c3} : a secreção de estradiol diminui durante o tempo do protocolo de desluteinização.

H_{04} : a secreção de progesterona se mantém constante durante o tempo do protocolo de desluteinização.

H_{c4} : a secreção de progesterona diminui durante o tempo do protocolo de desluteinização.

3. OBJETIVOS

3.1 – Objetivo geral

Estabelecer o cultivo do modelo celular proposto e analisar os efeitos da exposição das células murais da granulosa e das células do *cumulus oophorus*, nos estágios *early antral* e pré-ovulatório não luteinizados, ao sulfato de dehidroepiandrosterona.

3.2 – Objetivos específicos

a) Determinar o tempo de cultivo do modelo celular proposto bem como a dose hormonal adequada a ser utilizada;

b) Avaliar a secreção dos hormônios E_2 , progesterona e SDHEA no sobrenadante do cultivo primário das células murais da granulosa e das células do *cumulus oophorus* nos estados *early antral* não luteinizado e pré-ovulatório não luteinizado nos diferentes grupos experimentais.

4. MÉTODO

4.1 – Delineamento do estudo

Trata-se de estudo experimental *in vitro*.

4.2 – Local de execução

Os experimentos, bem como as soluções e reagentes necessários para estes, foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral (LaBiMET), localizado na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, na Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP) e no Centro de Terapia Gênica (CTG) localizados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

4.3 – Pacientes

Os complexos *cumuli*-oócito foram provenientes de pacientes submetidas à fertilização *in vitro* nas clínicas de reprodução assistida Generar e ProSer que foram submetidas à estimulação ovariana. O protocolo de indução (estimulação ovariana controlada) utilizado pela paciente foi realizado a critério médico, sendo independente do estudo. Foram recrutadas pacientes que realizaram protocolo longo de estimulação com agonista do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), bem como pacientes que foram submetidas ao protocolo curto de estimulação com antagonista do GnRH. As pacientes que concordaram em participar do estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1) autorizando a utilização das células da granulosa e dos COCs, obtidas durante a punção de seus oócitos, nos experimentos. Os critérios de inclusão do estudo foram: pacientes submetidas à fertilização *in vitro*, com idade entre 20 e 45 anos, que tenham sido submetidas ou ao protocolo longo de estimulação com agonista do GnRH ou ao protocolo curto de estimulação com antagonista do GnRH. Pacientes com síndrome do ovário policístico (SOP) ou com número de folículos igual ou menor a 3 não foram incluídas no estudo.

4.4 – Punção ovariana e coleta das células murais da granulosa

A estimulação hormonal e subsequente aspiração dos gametas e de seu líquido folicular apresentam protocolos independentes deste estudo. O líquido folicular coletado, após a

seleção dos gametas recuperados, foi utilizado a fim de recuperar as células murais da granulosa. Ele foi centrifugado por 15 minutos a 1100 x g para sedimentação das células foliculares e sanguíneas; o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* formado foi adicionado sobre solução de gradiente de densidade de 50% (*IsolateConcentrate e HTF* modificado com Hepes – *Irvine Scientific*). A mistura foi centrifugada para separação das células da granulosa por 8 minutos a 1100 x g, duas vezes, quando necessário. As células da granulosa, então, foram ressuspensas em meio de cultivo (DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico – kanamicina), contabilizadas (utilizando câmara de Neubauer) e semeadas na concentração adequada para o tipo de experimento a ser realizado.

4.5 – Coleta das células do *cumulus oophorus*

Após desnudamento dos gametas de suas células do *cumulus oophorus*, com protocolo independente deste estudo, o líquido contendo estas células foi ressuspensas em 2 mL de DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (kanamicina). A quantidade de células recuperadas foi contabilizada (utilizando câmara de Neubauer) e, após, as células foram semeadas na concentração adequada para o tipo de experimento a ser realizado.

4.6 – Cultivo das células murais da granulosa e do *cumulus oophorus*

As células da granulosa e do *cumulus* foram cultivadas separadamente e incubadas em estufa a 37° C, com atmosfera úmida e adição automática de 5% de CO₂. Sempre que a troca de meio de cultivo era realizada, as células eram observadas em microscópio óptico, a fim de acompanhar, visualmente, a proliferação celular a cada dia de cultivo. Dependendo da etapa experimental do trabalho e do tipo de célula, diferentes concentrações de semeadura foram utilizadas.

4.7 – Delineamento experimental

Inicialmente, foi realizada a primeira parte deste estudo a fim de determinar por quanto tempo CGs e CCs permaneciam viáveis em cultivo. Ambos os tipos celulares foram semeados na concentração de $0,1 \times 10^4$ células por poço, em placas de 96 poços. Foram testados três tempos de cultivo diferentes (6, 8 e 10 dias) e as culturas tiveram seus meios de cultivo trocados diariamente até o dia 4 e, então, de 48 em 48 horas. O número amostral foi

de quatro culturas, sendo que cada cultura foi dividida em três grupos: o primeiro foi cultivado por um período de seis dias, o segundo por um período de oito dias e o terceiro por um período de dez dias (figura 5). A viabilidade celular de cada grupo foi avaliada pelos ensaios de MTT [3-(4, 5-dimetiltiazol-2)-2, 5-brometo de difeniltetrazólio] e de sulforrodamina B.

Após a determinação do melhor tempo de cultivo para as células foliculares, foi realizado outro experimento, a fim de definir qual a melhor concentração de SDHEA para exposição às células na etapa posterior. Para isto, fez-se uma curva de doses de SDHEA, elaborada com base nos trabalhos de Esfahani, A. e colaboradores (Esfahani, Kendall et al. 2010) e Nheu, L. e colaboradores (Nheu, Nazareth et al. 2011), sendo as doses utilizadas 0,01 μM , 0,02 μM , 0,04 μM , 0,08 μM e 0,16 μM (figura 6). As células da granulosa e do cumulus foram semeadas nas concentrações de 2×10^4 e 1×10^4 células por poço, respectivamente, em placas de 96 poços com 100 μL de meio de cultivo por poço. Cada tipo celular foi dividido em 6 grupos (controle – sem hormônio, dose 1 – 0,01 μM , dose 2 – 0,02 μM , dose 3 – 0,04 μM , dose 4 – 0,08 μM e dose 5 – 0,16 μM), sendo que as culturas tiveram seus meios de cultivo (específicos de cada grupo – com adição, ou não de hormônio) trocados diariamente até o dia 4, e, então, de 48 em 48 horas. A viabilidade celular de cada grupo foi avaliada pelos ensaios de MTT [3-(4, 5-dimetiltiazol-2)-2, 5-brometo de difeniltetrazólio] e de sulforrodamina B. O número amostral foi de quatro culturas para células do cumulus avaliadas pelo ensaio de MTT e de cinco culturas para células da granulosa (para ambos os ensaios) e para células do cumulus avaliadas pelo ensaio de sulforrodamina B.

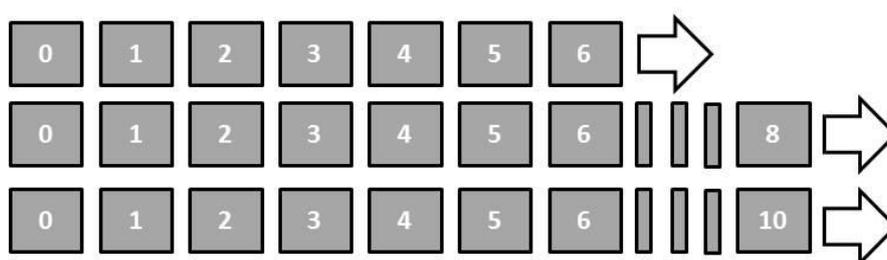


Figura 6. Representação esquemática do desenvolvimento da parte I do trabalho.

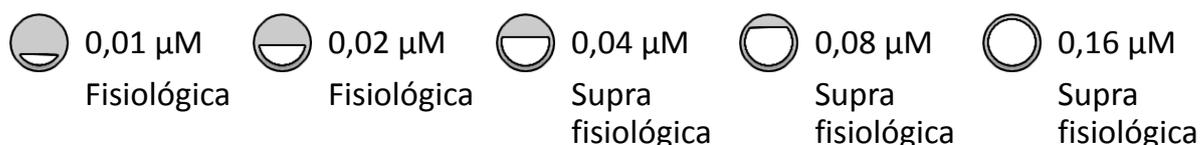


Figura 7. Representação esquemática do desenvolvimento da parte II do trabalho.

Posteriormente, tendo definido o melhor tempo de cultura e a dose ideal de exposição das células em questão ao SDHEA, os experimentos foram realizados com dois grupos experimentais distintos: células *early antral* não luteinizadas (figura 8) e células pré-ovulatórias não luteinizadas – expostas ao FSH (na concentração de 1 UI/mL) nos dias 4 e 6 (figura 9). A concentração de FSH utilizada baseou-se no trabalho de Ophir e colaboradores (Ophir, Yung et al. 2014). Ambos os grupos foram divididos em dois subgrupos: grupo controle (sem exposição hormonal) e grupo SDHEA (exposição ao SDHEA). As células da granulosa e do cumulus foram semeadas nas concentrações de 8×10^4 e 4×10^4 células por poço, respectivamente, em placas de 6 poços com 2 mL de meio de cultivo por poço. Durante os quatro primeiros dias de cultura, foi feita a troca do meio de cultivo de 24 em 24 horas e não houve exposição hormonal a nenhum dos subgrupos dos dois grupos, sendo que este tempo, livre de hormônios, é o descrito como necessário para que ocorra a desluteinização das células (Ophir, Yung et al. 2014).

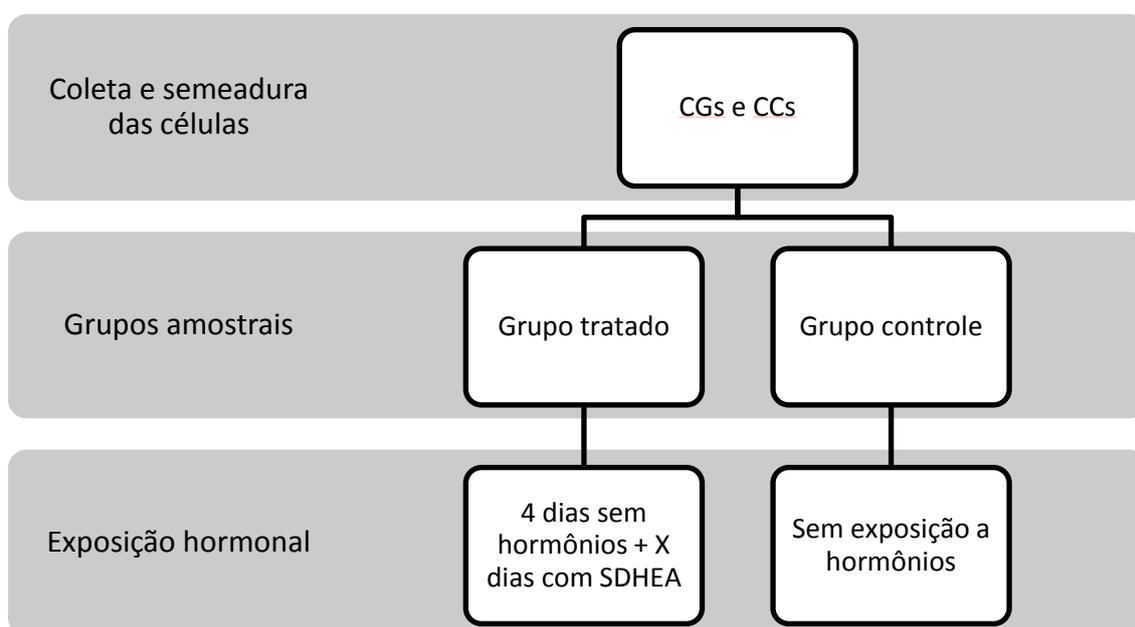


Figura 8. Delineamento experimental para as células *early antral* não luteinizadas.

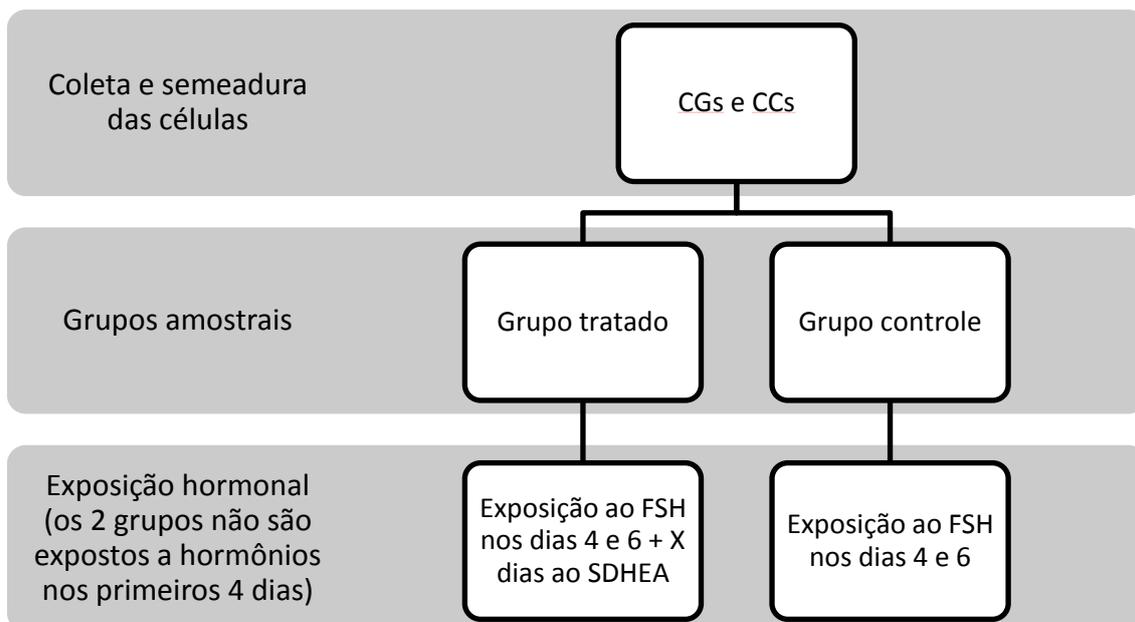


Figura 9. Delineamento experimental para as células pré-ovulatórias não luteinizadas (expostas ao FSH nos dias 4 e 6).

4.8 – Cálculo do tamanho de amostra

O número de experimentos necessários foi calculado com base em estudos anteriores (Ophir, Yung et al. 2014; Alcoba, Schneider et al. 2017). Foram utilizados como parâmetros de avaliação para o cálculo os níveis de progesterona e a viabilidade celular (atividade mitocondrial). Para encontrar uma diferença de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ na secreção de progesterona, entre as amostras controle e tratada, com um poder de 80% e intervalo de confiança de 95%, foram necessários 5 experimentos independentes. Para detectar uma diferença de 0,021 na viabilidade celular, entre as amostras controle e tratada, também foram necessárias 5 culturas celulares. Levando em consideração a necessidade de 5 experimentos na primeira etapa (determinação do tempo), 5 na segunda (determinação da dose de SDHEA) e 5 na terceira (dosagem hormonal), foi necessário o recrutamento de 15 pacientes. O cálculo do tamanho de amostra foi realizado com auxílio do programa Winpepi.

4.9 – Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pelos ensaios de MTT [3-(4, 5-dimetiltiazol-2)-2, 5-brometo de difeniltetrazólio] e de sulforrodamina B. Para ambos os ensaios, as células foram semeadas em placas de 96 poços, nas concentrações de 2×10^4 células por poço para CG e 1×10^4 células por poço para CC, sendo cultivadas com 100 μL de meio de cultivo por poço.

O ensaio de MTT requer atividade metabólica celular para converter o tetrazólio incolor em produto com coloração púrpura (formazan) e, desta forma, detecta e cora células viáveis (Vichai and Kirtikara 2006). O tetrazólio MTT é clivado por todas as células que estejam vivas e metabolicamente ativas. Sendo assim, células ativas produzem mais formazan do que células menos ativas, o que permite a detecção de atividade celular mesmo na ausência de proliferação (Karck, Reister et al. 1996). Para realizar o ensaio de MTT, nos dias de avaliação foram retirados 10 μ L do meio de cultivo de cada poço e adicionados 10 μ L de solução de 5 mg de MTT/mL de PBS com pH de 7,2. As placas, então, foram incubadas por 3 horas a temperatura de 37° C e atmosfera úmida e com 5% de CO₂. Depois de decorridas 3 horas, o meio de cultivo, misturado com a solução de MTT, foi aspirado. Adicionou-se 100 μ L de solvente orgânico DMSO (*Dimethyl sulfoxide*) por poço e a placa foi deixada em temperatura ambiente por 3 minutos. Por fim, fez-se a leitura da densidade óptica em aparelho de espectrofotometria em comprimento de onda de 540 nm.

O ensaio de sulforrodamina B se baseia na habilidade dessa substância de se ligar a componentes proteicos de células que tenham sido fixadas em placas de cultura pelo ácido tricloroacético (TCA). Como a ligação da sulforrodamina B é estequiométrica, a quantidade de corante extraído das células coradas é diretamente proporcional à massa celular (Vichai and Kirtikara 2006). Esta técnica apresenta baixa variabilidade inter-experimentos (boa reprodutibilidade) e é capaz de detectar pequenas variações na quantidade de células entre grupos experimentais (van Tonder, Joubert et al. 2015). Para realizar o ensaio de sulforrodamina B, nos dias de avaliação foram adicionados 25 μ L de TCA 50% (ácido tricloroacético) em cada poço, sendo as placas armazenadas a temperatura de 4° C pelo período de 1 hora. Após, os poços foram lavados com água destilada (duas vezes). Depois de secos, adicionou-se 50 μ L da solução de sulforrodamina B (0,4% em ácido acético 1%) em cada poço e as placas foram deixadas, no escuro, a temperatura ambiente por 25 minutos. Posteriormente, os poços foram lavados (duas vezes) com ácido acético 1% (para eliminar o excesso de corante), adicionou-se 100 μ L de TRIS [Tris(hidroximetil)aminometano] 10 mM por poço e, então, as placas foram incubadas por agitação por 10 minutos a temperatura ambiente. Por fim, fez-se a leitura da densidade óptica em aparelho de espectrofotometria em comprimento de onda de 510 nm.

4.10 – Dosagens hormonais no sobrenadante celular

Foram semeadas 8×10^4 CGs e 4×10^4 CCs por poço (placas de 6 poços contendo 2 mL de meio por poço). Nos dias 1, 4, 6 e 8 da cultura celular, o sobrenadante foi coletado e os níveis

de estradiol, progesterona e sulfato de dehidroepiandrosterona (SDHEA) foram mensurados por eletroquimioluminescência (ECL), ECL competitiva e imunoenensaio quimioluminescente de micropartículas Architect, respectivamente, utilizando kits comerciais (Cobas e602, Cobas e601 e Ci4100 ABBOTT). Estas dosagens hormonais foram feitas pelo serviço de Bioquímica do HCPA, de acordo com a rotina laboratorial do Hospital.

4.11 – Descarte de resíduos

De acordo com a Resolução número 306 de 07 de dezembro de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária e a Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) número 358 de 29 de abril de 2005, que dispõe sobre o tratamento e disposição final de resíduos de serviço de saúde, os resíduos biológicos gerados neste estudo (células humanas) fazem parte do grupo A3. Esses resíduos foram acondicionados em sacos brancos contendo o símbolo universal de risco biológico, sem quaisquer outros tipos de resíduos misturados (algodão, gaze, compressas, etc). A correta segregação dos resíduos e sua destinação, de acordo com a RDC nº 306, é responsabilidade da própria unidade geradora, por isso seguiu o plano de gerenciamento de resíduos de serviços de saúde das unidades onde os experimentos foram realizados.

4.12 – Análise estatística

Os resultados de viabilidade celular, obtidos na primeira e na segunda etapas experimentais, e das dosagens hormonais foram avaliados quantitativamente através do teste de Equações de Estimção Generalizadas (*Generalized Estimating Equations* - GEE) seguido do teste *post hoc* de Bonferroni para as comparações múltiplas. A análise das dosagens hormonais foi realizada utilizando-se uma matriz de covariância de estimador robusto e uma matriz de correlação trabalho *exchangeable*. O método GEE foi, primeiramente, proposto por Zeger e Liang (Sherman, Dolenko et al. 1975), com o objetivo de estimar consistentemente parâmetros de regressão, assumindo-se que há correlação entre as observações dos sujeitos em estudo. O modelo GEE avalia a relação entre a variável resposta e as variáveis preditoras em um contexto populacional, e não somente individual. A análise por GEE, assim, torna-se adequada já que uma correção é feita para a dependência das observações de um indivíduo (Fuller, Christensen et al. 1975).

Em situações nas quais os sujeitos em estudo são independentes, mas a informação sobre uma determinada variável é coletada repetidas vezes ao longo do tempo, estas

observações são correlacionadas. Desta forma, o teste de GEE é o mais indicado para as avaliações realizadas em nosso trabalho, pois permite a observação de diversas medidas de uma mesma variável em um mesmo sujeito, levando em consideração a relação da amostra com o sujeito da qual ela foi coletada (Sherman, Culik et al. 1975).

Para todos os testes, foi considerada diferença estatisticamente significativa quando $P \leq 0,05$. Todas as análises foram feitas utilizando-se o processador de dados SPSS 20.0 (*Statistical Package for the Social Sciences*).

4.13 – Aspectos éticos

Este trabalho está de acordo ética e metodologicamente com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa envolvendo Seres Humanos (Resoluções 196/96 e 303/00 do Conselho Nacional de Saúde), e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (projeto nº 15-0288), sendo cadastrado na Plataforma, com Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) número 45987115.7.0000.5327.

5. RESULTADOS

O presente estudo apresentará, inicialmente, resultados gerais e, então, terá seus resultados divididos em três partes:

- I. Determinação do tempo de cultivo das células murais da granulosa e das células do *cumulus oophorus*;
- II. Determinação da dose de sulfato de dehidroepiandrosterona a ser utilizada em cultura primária de células foliculares;
- III. Análise de dosagens hormonais do sobrenadante do cultivo celular no modelo celular estabelecido.

Resultados gerais

Pela variabilidade inerente entre os indivíduos, o cultivo celular primário nem sempre atinge o sucesso esperado. Na figura 10, em A, pode-se visualizar o número total de amostras coletadas para a realização das três etapas deste trabalho (N=49), sendo possível distinguir aquelas que foram cultivadas com sucesso (N=39) e puderam ser utilizadas para a obtenção dos resultados do estudo, e aquelas que não tiveram seus cultivos finalizados (N=10) e, portanto, não foram utilizadas para a obtenção dos resultados. Este último valor representa um índice de insucesso das células submetidas ao cultivo de 20,4%, aproximadamente um quarto do total de amostras, evidenciando a maior dificuldade de realização de estudos que utilizem cultivos celulares primários.

Na parte B da figura pode-se visualizar o número de amostras celulares coletadas e cultivadas com sucesso (N=39) de uma forma dividida pelo tipo celular da amostra obtida. Ou seja, das 39 amostras utilizadas, 21 foram de células murais da granulosa e 18 foram de células do *cumulus oophorus*. Por outro lado, em C é possível ver as causas de insucesso de cultivo das 10 culturas não finalizadas, sendo que, destas, 3 foram inutilizadas devido a contaminação bacteriana, 1 apresentou um experimento final mal sucedido e 6 não puderam ser semeadas devido ao pequeno número de células presentes na amostra. Além desta restrição para a semeadura encontrada em algumas amostras (devido ao baixo número de células), muitas vezes este fator restringe, também, a quantidade de grupos experimentais do estudo. Porém, apesar desta dificuldade, as culturas que obtiveram êxito puderam ser utilizadas para o estabelecimento do modelo proposto. As culturas utilizadas apresentavam morfologia característica e não apresentavam contaminação microbiológica evidente.

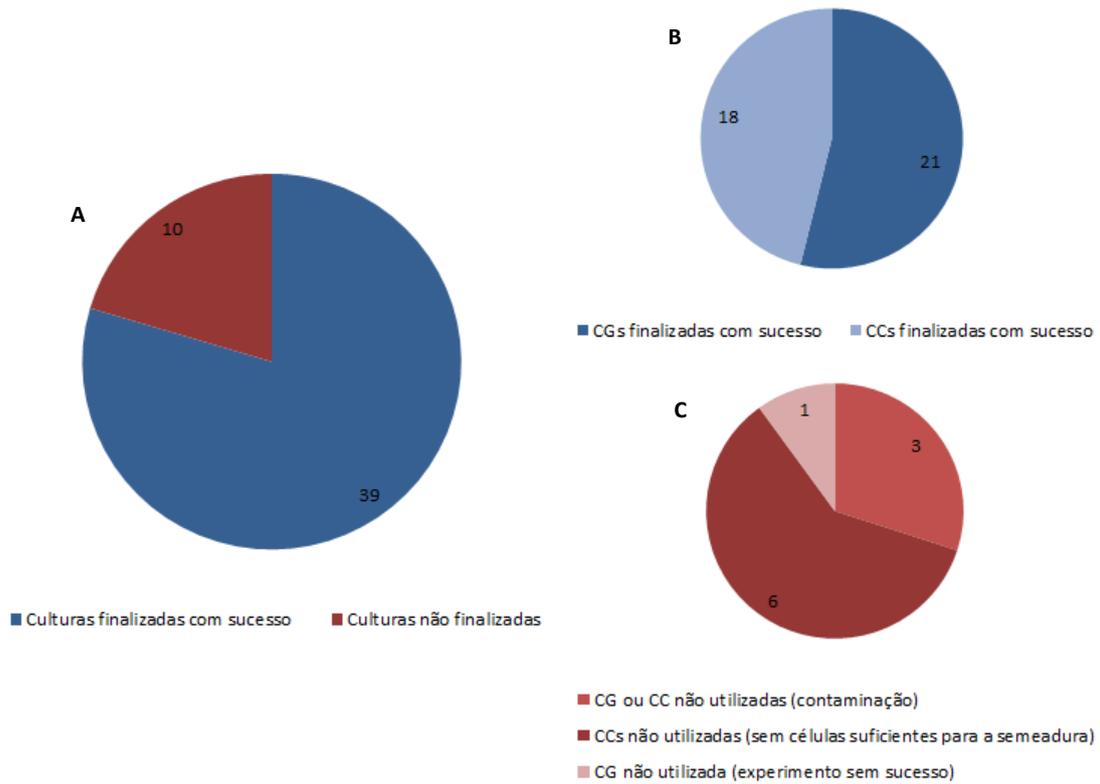


Figura 10. Culturas finalizadas com sucesso (N=39) e culturas não finalizadas (N=10), de um total de 49 amostras coletadas (A). Culturas de granulosa (N=21) e de cumulus (N=18) finalizadas com sucesso (B). Amostras de cumulus não utilizadas (N=6) devido à pequena quantidade de células, cultura de granulosa não utilizada (N=1) devido ao insucesso do experimento e culturas de granulosa ou cumulus não utilizadas (N=3) devido à contaminação bacteriana (C). CG - células da granulosa; CC - células do cumulus.

A figura 11 ilustra um cultivo celular, de células murais da granulosa, realizado em placa de 6 poços, tendo sido semeadas 8×10^4 células por poço. A imagem foi capturada no último dia de cultivo (oitavo), mostrando uma grande quantidade de células.

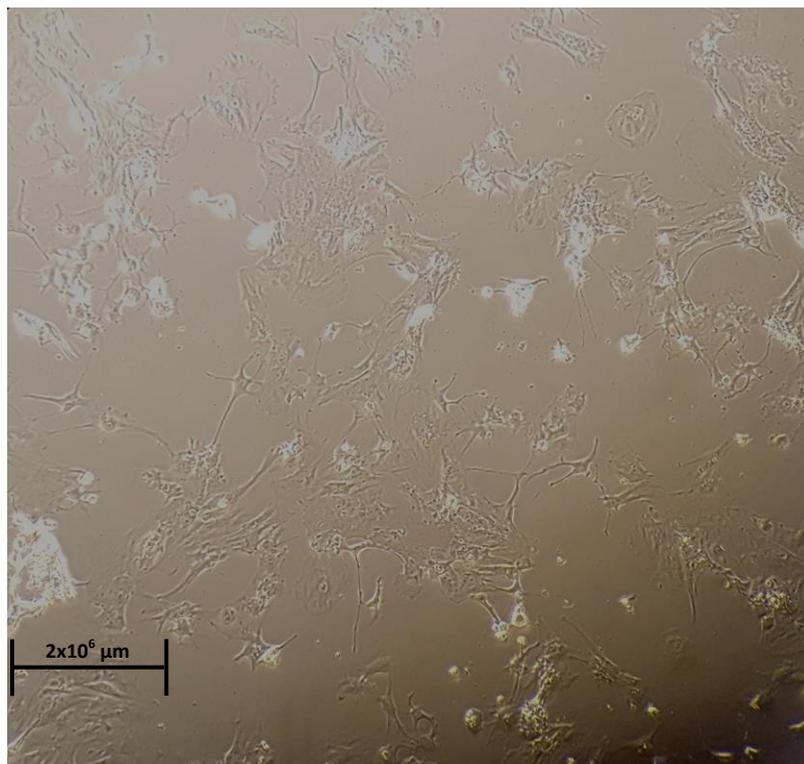


Figura 11. Células da granulosa, semeadas em placa de 6 poços, na concentração de 8×10^4 células por poço, no oitavo dia de cultivo celular.

Determinação do tempo de cultivo das células murais da granulosa e das células do *cumulus oophorus*

As condições ideais de cultivo para as células foliculares já foram padronizadas em trabalho realizado pelo nosso grupo de pesquisa (Alcoba, Gödde et al. 2012). No entanto, o tempo de cultivo necessário para o desenvolvimento do protocolo de desluteinização, proposto por Ophir e colaboradores, em 2014, e utilizado como base para este trabalho, e para, concomitantemente, a exposição das células à SDHEA, tornou necessária a determinação de por quanto tempo as células se manteriam viáveis no nosso estudo.

Para tanto, cinco pacientes submetidas à estimulação hormonal ovariana e à punção ovariana participaram da etapa I do estudo, obtendo-se um número amostral de cinco culturas para CG e quatro culturas para CC. Os dois tipos de células foliculares foram cultivados, separadamente, por um tempo máximo de 10 dias, sendo que a análise da viabilidade celular foi realizada nos dias 6, 8 e 10 do cultivo celular. Tanto as CGs quanto as CCs mantiveram-se viáveis durante todo o tempo de cultivo, não havendo diferença estatisticamente significativa na viabilidade celular (por ambos os ensaios realizados – sulforrodamina B e MTT) nos tempos de cultivo analisados. Os resultados obtidos nesta parte do trabalho estão representados nas figuras 12, 13, 14 e 15.

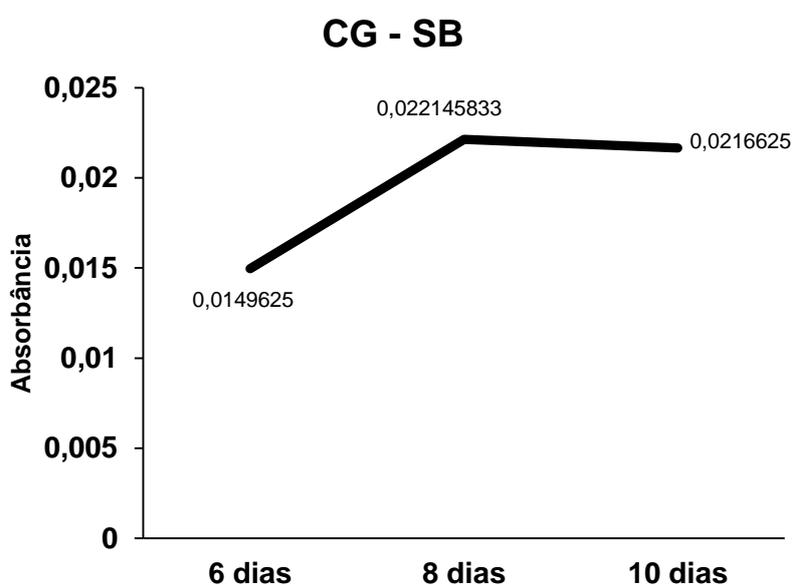


Figura 12. Análise da viabilidade celular das células da granulosa (CG) por sulforrodamina B (SB) nos dias 6, 8 e 10 (os valores representam a média dos resultados) N=5.

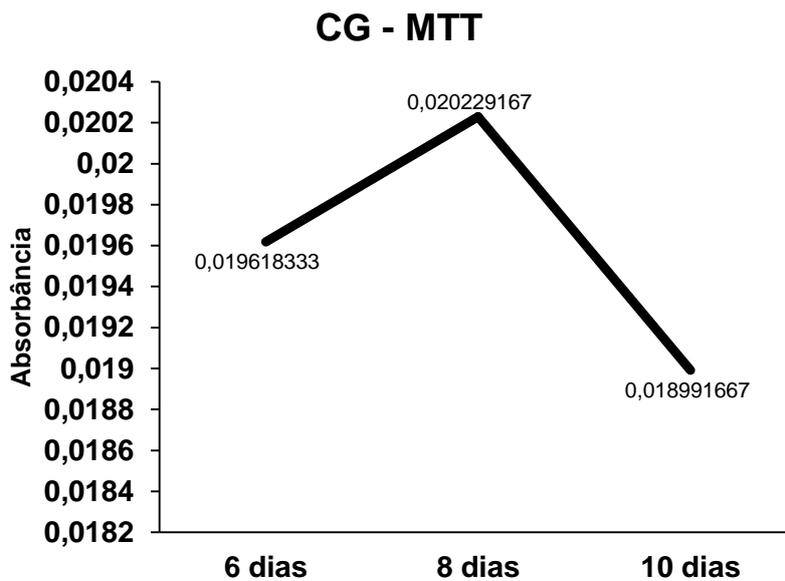


Figura 13. Análise da viabilidade celular das células da granulosa (CG) por MTT nos dias 6, 8 e 10 (os valores representam a média dos resultados) N=5.

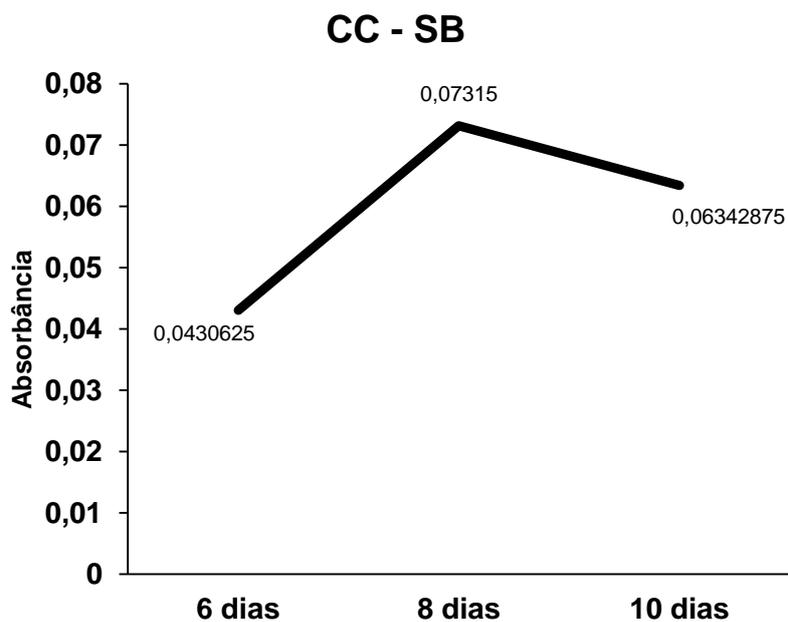


Figura 14. Análise da viabilidade celular das células do cumulus (CC) por sulforrodamina B (SB) nos dias 6, 8 e 10 (os valores representam a média dos resultados) N=4.

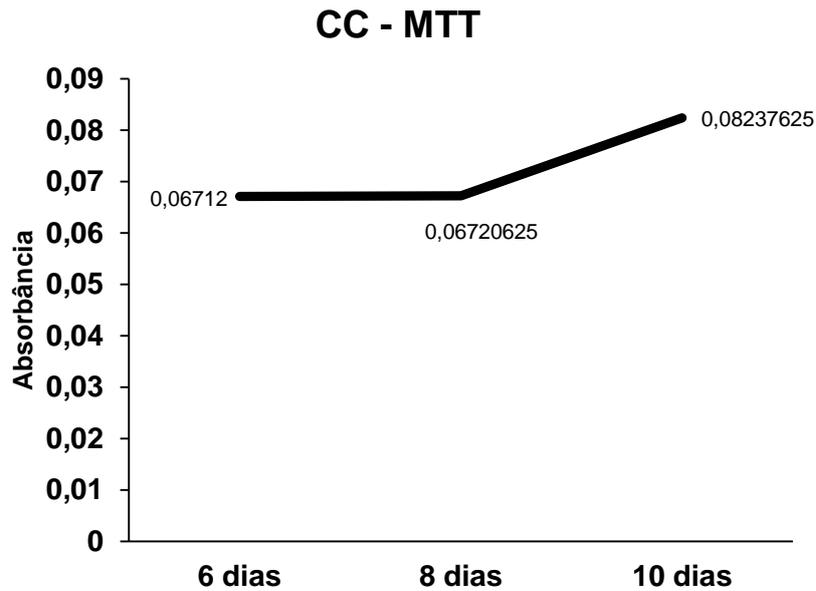


Figura 15. Análise da viabilidade celular das células do cumulus (CC) por MTT nos dias 6, 8 e 10 (os valores representam a média dos resultados) N=4.

Visto a ausência de diferença significativa entre os dias de cultivo analisados, ou seja, a manutenção da viabilidade celular durante todo o período do cultivo, optou-se por cultivar as células pelo período de 8 dias para a realização das próximas duas etapas do trabalho. Esta escolha baseou-se no fato de que, apesar de não haver diferença estatisticamente significativa, o tempo de cultivo escolhido foi o que mostrou maior viabilidade celular em 3 dos 4 experimentos realizados, ou seja, em 75% dos experimentos.

Determinação da dose de sulfato de dehidroepiandrosterona a ser utilizada em cultura primária de células foliculares

As concentrações de SDHEA testadas na etapa II do trabalho foram estabelecidas com base em artigos científicos que expunham suas culturas celulares à DHEA e/ou SDHEA (Nheu, Nazareth et al. 2011; Rijk, Bovee et al. 2012) e com base nas concentrações fisiológicas e supra-fisiológicas humanas femininas deste hormônio (Esfahani, Kendall et al. 2010). Nheu e colaboradores adicionaram ao meio de cultivo concentrações variando de 5 a 50 nM (0,005 a 0,05 μ M) de DHEA, valores que se enquadram nas condições hormonais fisiológicas e também nas supra-fisiológicas. Por outro lado, Rijk e colaboradores (2012) utilizaram concentrações de 0,1, 1, 10, 50 e 100 μ M de DHEA por poço, enquanto que as concentrações séricas fisiológicas de DHEA em mulheres jovens e pré-menopáusicas são de 10 a 35 nM (0,01 a 0,035 μ M). Comumente, a administração oral de DHEA para pacientes submetidas a tratamentos de reprodução assistida que utilizam este hormônio é de aproximadamente 75 mg diárias de hormônio (Stocco 2008; Wiser, Gonen et al. 2010; Liu, Wang et al. 2016), ou seja, o organismo das pacientes é exposto a concentrações de DHEA muito superiores às fisiológicas. Desta forma, a fim de testarmos concentrações fisiológicas e supra-fisiológicas em nosso cultivo de células foliculares, determinamos as concentrações utilizadas em nosso estudo como sendo de 0,01, 0,02, 0,04, 0,08 e 0,16 μ M de SDHEA.

Para tanto, cinco pacientes submetidas à estimulação hormonal ovariana e à punção ovariana participaram da etapa II do estudo, obtendo-se um número amostral de cinco culturas para CG (para ambos os ensaios de viabilidade celular), de cinco culturas para CC (para o ensaio de sulforrodamina B) e de quatro culturas para CC (para o ensaio de MTT). Os dois tipos de células foliculares foram cultivados, separadamente, por um período de 8 dias, sendo que até o dia 4 as culturas tiveram seus meios de cultivo trocado de 24 em 24 horas, e, após, de 48 em 48 horas. A cada troca de meio de cultivo, meio sem hormônio foi adicionado ao grupo controle e meio com cada uma das concentrações de SDHEA estabelecida ao respectivo grupo tratado. Visto a variabilidade de respostas que cada cultura apresentou frente à exposição às doses hormonais, devido às diferenças biológicas de cada indivíduo, os resultados foram expostos em porcentagem dos grupos tratados em relação ao grupo controle, que foi considerado como 100% (resultados complementares, em valores absolutos, podem ser vistos nos anexos – Anexo 2). Nenhum dos grupos tratados das células da granulosa se mostrou diferente em relação ao controle, tanto no ensaio de sulforrodamina B quanto no de MTT. Nas

células do cumulus, também não foram observadas diferenças entre os grupos quando a análise foi feita pelo ensaio de sulforrodamina B; porém, pelo ensaio de MTT foi vista uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo tratado com 0,16 μM de SDHEA e o grupo controle, havendo uma diminuição da viabilidade no grupo tratado. Portanto, a dose hormonal escolhida para ser utilizada na parte III do trabalho foi de 0,08 μM , pois foi a maior dose testada que não alterou a viabilidade celular de ambas as células por nenhum dos dois ensaios e, assim como as doses às quais as pacientes utilizam nos tratamentos de reprodução assistida, é uma dose supra-fisiológica. Os resultados obtidos nesta parte do trabalho estão representados nas figuras 16, 17, 18 e 19.

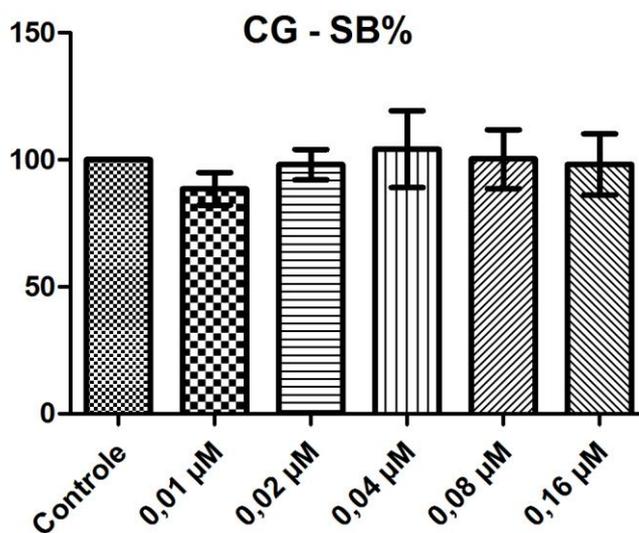


Figura 16. Análise da viabilidade celular das células da granulosa (CG) por sulforrodamina B (SB) nos grupos controle e tratados com 5 diferentes doses de SDHEA. Dados apresentados como porcentagem em relação ao controle \pm erro padrão. N=5.

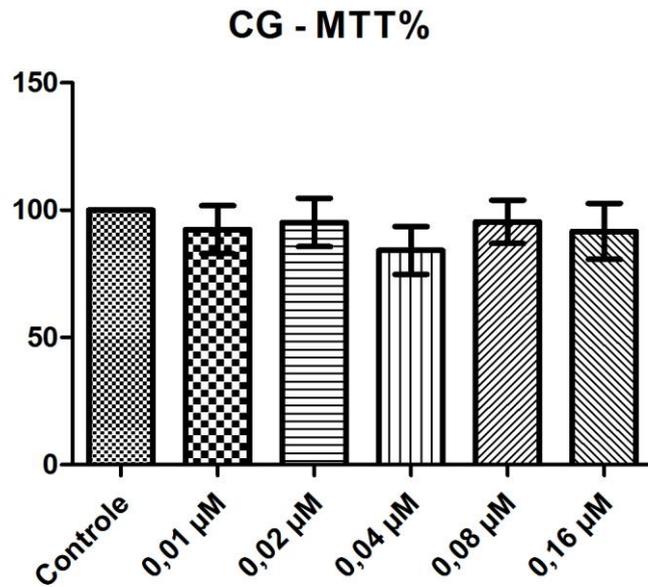


Figura 17. Análise da viabilidade celular das células da granulosa (CG) por MTT nos grupos controle e tratados com 5 diferentes doses de SDHEA. Dados apresentados como porcentagem em relação ao controle \pm erro padrão. N=5.

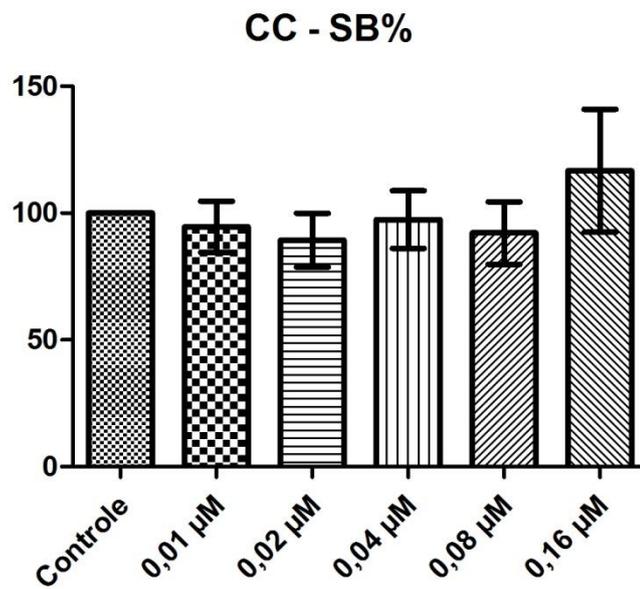


Figura 18. Análise da viabilidade celular das células do cumulus (CC) por sulforrodamina B (SB) nos grupos controle e tratados com 5 diferentes doses de SDHEA. Dados apresentados como porcentagem em relação ao controle \pm erro padrão. N=5.

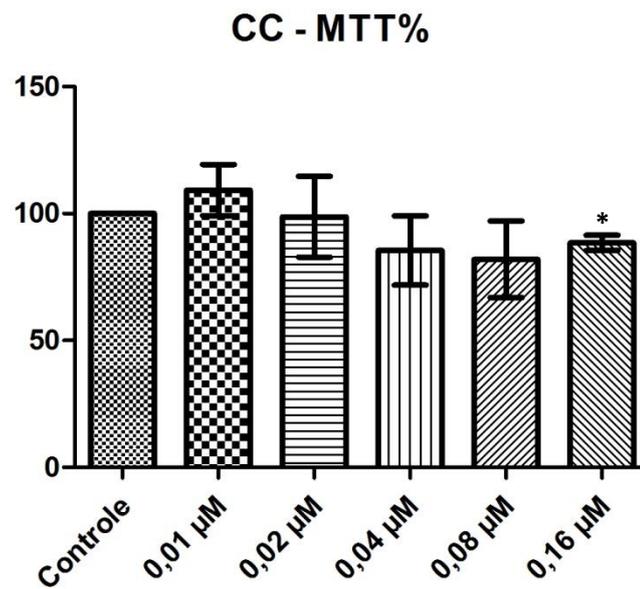


Figura 19. Análise da viabilidade celular das células do cumulus (CC) por MTT nos grupos controle e tratados com 5 diferentes doses de SDHEA. Dados apresentados como porcentagem em relação ao controle \pm erro padrão. Asterisco (*) representa diferença significativa com $P \leq 0,05$ comparado com o controle. N=4.

Análise de dosagens hormonais do sobrenadante do cultivo celular no modelo celular estabelecido

Na tabela 1 podem ser visualizadas informações a respeito de pacientes das quais foram coletadas as células foliculares utilizadas para a realização da etapa III do trabalho. A média de idade das pacientes foi de 38,45 anos (desvio padrão de 4,03) e elas foram submetidas a dois distintos protocolos de estimulação hormonal ovariana (protocolo longo e protocolo curto com agonista ou antagonista de GnRH). Além disto, pode-se ver a grande variação no número de folículos recuperados de cada paciente, ressaltando a variabilidade de respostas de cada paciente à estimulação hormonal recebida.

Tabela 1. Informações das pacientes das quais foram coletadas células da granulosa e do *cumulus oophorus* para o desenvolvimento da etapa III do trabalho (CG – células da granulosa; CC – células do *cumulus*).

Paciente	Tipo celular	Idade	Número de folículos	Protocolo de estimulação hormonal
P14	CG	39	6	Curto
P15	CG e CC	41	9	Longo
P16	CG e CC	34	23	Curto
P17	CG e CC	38	5	Longo
P18	CG	40	7	Curto
P19	CG e CC	31	13	Curto
P20	CG e CC	39	11	Longo
P21	CG e CC	42	8	Curto
P22	CG	34	16	Curto
P23	CC	45	10	Curto
P26	CG	40	8	Curto

Visto a pequena quantidade de células do *cumulus oophorus* que normalmente se obtém quando da coleta amostral, para o desenvolvimento desta parte do trabalho só foi possível fazer o cultivo de células do cumulus no estágio pré-ovulatório, não sendo possível cultivar estas células no estágio *early antral*. Para as células da granulosa, o cultivo de ambos os estágios de desenvolvimento celular foi realizado. As dosagens hormonais do sobrenadante dos cultivos celulares foram feitas nos dias 1, 4, 6 e 8 do cultivo celular, nos grupos controle e tratado com DHEA.

Os resultados das dosagens hormonais foram avaliados quantitativamente pelo teste estatístico GEE (descrito anteriormente na seção 9.13 - análise estatística). Para os três

hormônios analisados (SDHEA, E₂ e progesterona), nos dois tipos celulares (CG e CC) e nos dois estágios de desenvolvimento (*early antral* e pré-ovulatório), foi feita uma análise comparativa entre os tempos (dias 1, 4, 6 e 8), entre os grupos (controle e tratado) e entre a interação tempo-grupo. Desta forma, pode-se encontrar significância estatística entre a interação destes dois fatores ou nas análises individuais de cada fator, isto é, do tempo fixado (com variação do grupo) ou do grupo fixado (com variação do tempo). Quando a interação tempo-grupo não é significativa, os resultados utilizados são aqueles obtidos das análises individuais de cada fator. Em cada uma das tabelas abaixo, as letras maiúsculas representam diferença estatística na coluna, ou seja, entre os grupos controle e tratado, enquanto que as letras minúsculas representam diferença estatística na linha, isto é, entre os tempos analisados (dias 1, 4, 6 e 8). Gráficos representativos dos resultados obtidos podem ser vistos no Anexo 3 deste trabalho.

Nas tabelas 2 e 3 é possível visualizar os valores da média das dosagens de SDHEA (em µg/dL) obtidos do sobrenadante do cultivo celular das células murais da granulosa em estágio *early antral* e pré-ovulatório, respectivamente. Tanto no estágio *early antral* quanto no pré-ovulatório as células da granulosa apresentaram valores semelhantes de SDHEA. Nos dias 1 e 4 estes valores são baixos em ambos os grupos (controle e tratado) visto que este período de cultivo (4 dias) é feito sem a presença de nenhum hormônio no meio de cultura utilizado para que ocorra o processo de desluteinização; por outro lado, nos dias 6 e 8 há uma diferença estatisticamente significativa nos valores de SDHEA entre os grupos controle e tratado, devido justamente ao tratamento com SDHEA feito no grupo tratado. A análise ao longo do tempo mostrou que os valores de SDHEA se mantiveram constantes no grupo controle durante todo o período de cultivo celular, não havendo diferença estatística entre as quatro dosagens hormonais feitas neste grupo. Já na tabela 4, podem ser visualizados os resultados obtidos do cultivo das células do cumulus pré-ovulatórias. Este tipo celular apresentou valores de SDHEA mais elevados do que as células da granulosa no dia 1, porém, no dia 4 estes valores já haviam diminuído e ficado semelhantes aos das células da granulosa, se mantendo baixos no grupo controle nos dias subsequentes e aumentando no grupo tratado com SDHEA. Novamente houve uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e tratado nos dias 6 e 8, o que comprova que houve, efetivamente, a adição de SDHEA ao meio de cultivo do grupo tratado.

Tabela 2. Média dos valores de sulfato de dehidroepiandrosterona (SDHEA), em $\mu\text{g/dL}$, do sobrenadante das células murais da granulosa (CG) no estágio *early antral*, nos dias 1, 4, 6 e 8 de cultivo celular, nos grupos controle e tratado (com SDHEA). Dados expressos em média \pm erro padrão.

CG <i>early antral</i>	Grupo	N	SDHEA			
			Dia 1	Dia 4	Dia 6	Dia 8
	Controle	36	0,24 \pm 0,11 ^{Aa}	0,51 \pm 0,14 ^{Aa}	0,35 \pm 0,15 ^{Aa}	0,30 \pm 0,15 ^{Aa}
	Tratado	36	0,35 \pm 0,16 ^{Aa}	0,356 \pm 0,13 ^{Aa}	4,61 \pm 0,32 ^{Bb}	4,74 \pm 0,35 ^{Bb}

^{A,B} Letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente entre os grupos controle e tratado ($p \leq 0,05$).

^{a,b} Letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre os tempos ($p \leq 0,05$).

Tabela 3. Média dos valores de sulfato de dehidroepiandrosterona (SDHEA), em $\mu\text{g/dL}$, do sobrenadante das células murais da granulosa (CG) no estágio pré-ovulatório, nos dias 1, 4, 6 e 8 de cultivo celular, nos grupos controle e tratado (com SDHEA). Dados expressos em média \pm erro padrão.

CG pré-ovulatório	Grupo	N	SDHEA			
			Dia 1	Dia 4	Dia 6	Dia 8
	Controle	40	0,44 \pm 0,17 ^{Aa}	0,40 \pm 0,14 ^{Aa}	0,48 \pm 0,15 ^{Aa}	0,36 \pm 0,11 ^{Aa}
	Tratado	40	0,44 \pm 0,16 ^{Aa}	0,42 \pm 0,15 ^{Aa}	4,49 \pm 0,33 ^{Bb}	4,71 \pm 0,37 ^{Bb}

^{A,B} Letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente entre os grupos controle e tratado ($p \leq 0,05$).

^{a,b} Letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre os tempos ($p \leq 0,05$).

Tabela 4. Média dos valores de sulfato de dehidroepiandrosterona (SDHEA), em $\mu\text{g/dL}$, do sobrenadante das células do *cumulus oophorus* (CC) no estágio pré-ovulatório, nos dias 1, 4, 6 e 8 de cultivo celular, nos grupos controle e tratado (com SDHEA). Dados expressos em média \pm erro padrão.

CC pré-ovulatório	Grupo	N	SDHEA			
			Dia 1	Dia 4	Dia 6	Dia 8
	Controle	28	1,76 \pm 0,53 ^{Aa}	0,37 \pm 0,17 ^{Ab}	0,44 \pm 0,14 ^{Ab}	0,56 \pm 0,25 ^{Ab}
	Tratado	28	1,63 \pm 0,51 ^{Aa}	0,53 \pm 0,17 ^{Aa}	4,70 \pm 0,50 ^{Bb}	5,17 \pm 0,64 ^{Bb}

^{A,B} Letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente entre os grupos controle e tratado ($p \leq 0,05$).

^{a,b} Letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre os tempos ($p \leq 0,05$).

Os valores da média das dosagens de estradiol (em pg/mL) obtidos do sobrenadante do cultivo celular das células murais da granulosa em estágio *early antral* e pré-ovulatório encontram-se nas tabelas 5 e 6, respectivamente. Em ambas as tabelas, é possível ver que no dia 1 de cultivo celular estas células apresentavam uma secreção de estradiol bastante elevada, devido ao estado luteinizado no qual elas se encontram quando coletadas. Após os 4 dias de cultivo celular sem a adição de nenhum hormônio ao meio de cultura, esta secreção hormonal diminui drasticamente, havendo uma diferença estatisticamente significativa entre os valores dos dias 1 e 4, tanto no grupo controle quanto no grupo tratado. Estes valores se

mantêm baixos no grupo controle, até o final do período de cultivo celular, enquanto que no grupo tratado com SDHEA há um aumento significativo da secreção de estradiol em comparação ao grupo controle. Na tabela 7, onde estão os resultados obtidos do cultivo das células do *cumulus* pré-ovulatórias, observa-se valores tais que indicam que: a secreção de estradiol é elevada no primeiro dia de cultivo, mas diminui durante o período de desluteinização (4 primeiros dias), sendo baixa no dia 4; estes valores se mantêm baixos no grupo controle, porém, no grupo tratado com SDHEA a secreção de estradiol aumenta em relação ao controle, havendo uma diferença estatisticamente significativa. O padrão de valores e de resposta ao tratamento com SDHEA das células do *cumulus* é semelhante ao das células da granulosa, havendo diferença apenas nos valores da secreção de estradiol do dia 1, os quais são menores nas células do *cumulus*.

De maneira geral, independente do tipo celular e do estágio de desenvolvimento, é possível ver que a secreção de estradiol, elevada no primeiro dia de cultivo, diminuiu devido às condições e ao tempo de cultivo do protocolo de desluteinização celular. Além disso, as células tratadas com SDHEA apresentaram uma secreção de estradiol superior àquelas não tratadas.

Tabela 5. Média dos valores de estradiol (E_2), em pg/mL, do sobrenadante das células murais da granulosa (CG) no estágio *early antral*, nos dias 1, 4, 6 e 8 de cultivo celular, nos grupos controle e tratado (com SDHEA). Dados expressos em média \pm erro padrão.

CG <i>early antral</i>	Grupo	N	E_2			
			Dia 1	Dia 4	Dia 6	Dia 8
	Controle	36	1294,81 \pm 395,31 ^{Aa}	37,63 \pm 1,46 ^{Ab}	39,31 \pm 2,61 ^{Ab}	37,62 \pm 4,75 ^{Ab}
	Tratado	35	1247,42 \pm 353,95 ^{Aa}	37,22 \pm 1,72 ^{Ab}	184,27 \pm 22,80 ^{Bc}	131,80 \pm 23,32 ^{Bd}

^{A,B} Letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente entre os grupos controle e tratado ($p \leq 0,05$).

^{a,b,c,d} Letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre os tempos ($p \leq 0,05$).

Tabela 6. Média dos valores de estradiol (E_2), em pg/mL, do sobrenadante das células murais da granulosa (CG) no estágio pré-ovulatório, nos dias 1, 4, 6 e 8 de cultivo celular, nos grupos controle e tratado (com SDHEA). Dados expressos em média \pm erro padrão.

CG pré-ovulatório	Grupo	N	E_2			
			Dia 1	Dia 4	Dia 6	Dia 8
	Controle	40	1509,00 \pm 422,03 ^{Aa}	38,77 \pm 2,24 ^{Ab}	44,44 \pm 3,25 ^{Ac}	40,96 \pm 5,85 ^{AcB}
	Tratado	40	1396,21 \pm 343,28 ^{Aa}	37,71 \pm 1,90 ^{Ab}	211,45 \pm 21,42 ^{Bc}	170,38 \pm 28,02 ^{Bd}

^{A,B} Letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente entre os grupos controle e tratado ($p \leq 0,05$).

^{a,b,c,d} Letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre os tempos ($p \leq 0,05$).

Tabela 7. Média dos valores de estradiol (E_2), em pg/mL, do sobrenadante das células do *cumulus oophorus* (CC) no estágio pré-ovulatório, nos dias 1, 4, 6 e 8 de cultivo celular, nos grupos controle e tratado (com SDHEA). Dados expressos em média \pm erro padrão.

CC pré-ovulatório	Grupo	N	E_2			
			Dia 1	Dia 4	Dia 6	Dia 8
	Controle	27	404,56 \pm 172,49 ^{Aab}	38,77 \pm 4,22 ^{Aa}	44,64 \pm 3,37 ^{Aa}	61,16 \pm 3,62 ^{Ab}
	Tratado	28	406,51 \pm 174,94 ^{Aab}	38,66 \pm 4,47 ^{Aa}	235,39 \pm 44,08 ^{Bb}	275,40 \pm 35,41 ^{Bb}

^{A,B} Letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente entre os grupos controle e tratado ($p \leq 0,05$).

^{a,b} Letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre os tempos ($p \leq 0,05$).

Nas tabelas 8, 9 e 10 pode-se visualizar os valores da média das dosagens de progesterona (em ng/mL) obtidos do sobrenadante do cultivo celular das células murais da granulosa, em estágio *early antral* e pré-ovulatório, e das células do *cumulus oophorus*, em estágio pré-ovulatório, respectivamente. O tratamento com SDHEA não alterou a secreção de progesterona das células, em nenhum dos dois estágios de desenvolvimento. As células da granulosa *early antrais* mostraram uma secreção de progesterona aumentada no sexto dia de cultivo celular em comparação ao primeiro e ao quarto dia. Esta secreção, porém, começou a diminuir quando do oitavo dia de cultivo. Da mesma forma, este aumento com subsequente diminuição da secreção de progesterona aconteceu nas células da granulosa e do cumulus pré-ovulatórios; no entanto, neste estágio de desenvolvimento celular, este aumento da secreção hormonal foi maior, havendo mais diferença entre os valores do sexto dia de cultivo e os do primeiro e do quarto dias, quando comparado aos do estágio *early antral*.

Tabela 8. Média dos valores de progesterona (P), em ng/mL, do sobrenadante das células murais da granulosa (CG) no estágio *early antral*, nos dias 1, 4, 6 e 8 de cultivo celular, nos grupos controle e tratado (com SDHEA). Dados expressos em média \pm erro padrão.

CG <i>early antral</i>	Grupo	N	Progesterona			
			Dia 1	Dia 4	Dia 6	Dia 8
	Controle	23	238,82 \pm 42,74 ^a	206,77 \pm 41,73 ^a	335,65 \pm 64,72 ^b	205,25 \pm 44,85 ^c
	Tratado	24	214,97 \pm 36,69 ^a	193,55 \pm 23,25 ^a	301,68 \pm 54,31 ^b	195,63 \pm 46,76 ^c

^{a,b,c} Letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre os tempos ($p \leq 0,05$).

Tabela 9. Média dos valores de progesterona (P), em ng/mL, do sobrenadante das células murais da granulosa (CG) no estágio pré-ovulatório, nos dias 1, 4, 6 e 8 de cultivo celular, nos grupos controle e tratado (com SDHEA). Dados expressos em média \pm erro padrão.

CG pré-ovulatório	Grupo	N	Progesterona			
			Dia 1	Dia 4	Dia 6	Dia 8
			Controle	28	258,34 ± 44,15 ^a	218,59 ± 27,61 ^a
Tratado	27	260,99 ± 44,50 ^a	203,60 ± 25,67 ^a	607,23 ± 81,92 ^b	399,83 ± 41,30 ^c	

^{a,b,c} Letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre os tempos ($p \leq 0,05$).

Tabela 10. Média dos valores de progesterona (P), em ng/mL, do sobrenadante das células do *cumulus oophorus* (CC) no estágio pré-ovulatório, nos dias 1, 4, 6 e 8 de cultivo celular, nos grupos controle e tratado (com SDHEA). Dados expressos em média ± erro padrão.

CC pré-ovulatório	Grupo	N	Progesterona			
			Dia 1	Dia 4	Dia 6	Dia 8
			Controle	20	95,50 ± 21,91 ^a	255,50 ± 86,95 ^a
Tratado	20	101,70 ± 21,83 ^a	270,00 ± 102,10 ^a	1276,80 ± 214,60 ^b	1001,90 ± 196,50 ^c	

^{a,b,c} Letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre os tempos ($p \leq 0,05$).

6. DISCUSSÃO

Estudos que utilizam células foliculares como modelo experimental podem contribuir para o entendimento do desenvolvimento folicular e oocitário, auxiliando no esclarecimento dos mecanismos envolvidos em desordens reprodutivas de cunho ovariano. Visto que estas células fazem parte de um mesmo ambiente que o oócito com o qual estão associadas, elas podem ser capazes de revelar informações importantes a respeito do gameta feminino. Sendo assim, já que elas são facilmente acessadas durante os procedimentos de reprodução assistida e podem ser coletadas sem o comprometimento do oócito, são alvos atrativos para o desenvolvimento de ensaios não invasivos de determinação da competência oocitária (Fragouli, Lalioti et al. 2014).

No entanto, apesar de as células foliculares serem um bom modelo de estudo para o entendimento de questões relacionadas ao oócito, existe um ponto negativo do cultivo destas células relacionado com as altas doses hormonais às quais elas são expostas antes de serem cultivadas (Lindeberg, Carlstrom et al. 2007). Sabe-se que CGs obtidas de mulheres submetidas à fertilização *in vitro* (FIV) se tornam refratárias à estimulação adicional por gonadotrofinas quando em cultura, devido ao tratamento hormonal prévio das pacientes (Breckwoldt, Selvaraj et al. 1996). Portanto, células foliculares recuperadas de pacientes submetidas à FIV encontram-se luteinizadas, e o fato de elas já se encontrarem neste estágio faz com que já tenham passado pela fase de desenvolvimento folicular na qual participam do processo de maturação do folículo e do oócito (Lindeberg, Carlstrom et al. 2007). Desta forma, a utilização de um modelo celular folicular desluteinizado, baseado no protocolo de Ophir e colaboradores, como feito no trabalho em questão, contorna esta limitação metodológica. Além disso, a utilização de um cultivo celular primário pode fornecer dados mais representativos da variabilidade de respostas de cada paciente aos tratamentos experimentais realizados no estudo.

O presente estudo propôs o estabelecimento de um modelo de células foliculares não luteinizadas, a fim de analisar os efeitos da exposição do sulfato de dehidroepiandrosterona a estas células. A determinação do tempo de cultivo das células utilizadas se fez necessária e, para isso, estas foram cultivadas por um período máximo de 10 dias, sendo que a viabilidade celular foi verificada por meio de dois ensaios distintos nos dias 6, 8 e 10 do cultivo celular. As células tiveram seu meio de cultivo trocado diariamente, sem a adição de nenhum hormônio,

até o dia 4 de cultivo, a fim de se tornarem desluteinizadas e, então, de 48 em 48 horas, até os dias 6, 8 e 10.

Medidas de viabilidade e proliferação celular são a base para inúmeros ensaios *in vitro* de resposta da população celular a algum fator em estudo. Sais tetrazólicos podem mensurar a atividade de várias enzimas desidrogenases, sendo que o anel tetrazólico (componente da técnica de MTT) é clivado em mitocôndrias ativas e, portanto, a reação ocorre apenas em células vivas. Portanto, a técnica do MTT é um método indireto baseado no metabolismo celular que avalia, principalmente, a atividade mitocondrial das células, de forma que o produto da reação de redução (azul de Formazan) é proporcional à respiração celular e, indiretamente, ao número de células viáveis em cultura. Sendo assim, células ativas produzem mais formazan do que células menos ativas, o que permite a detecção de atividade celular mesmo na ausência de proliferação (Karck, Reister et al. 1996). Por outro lado, o ensaio de sulforrodamina B apresenta resultados que são diretamente proporcionais à massa celular, visto que este ensaio quantifica o conteúdo proteico celular total (Vichai and Kirtikara 2006; van Tonder, Joubert et al. 2015). Além disto, esta técnica apresenta baixa variabilidade inter-experimentos e é capaz de detectar pequenas variações na quantidade de células entre grupos experimentais (van Tonder, Joubert et al. 2015). Desta forma, a realização de duas técnicas de análise neste trabalho permitiu a obtenção de maior quantidade de resultados para que se possa fazer a determinação do tempo de cultivo de células foliculares desluteinizadas.

Neste estudo, ambos os ensaios realizados com as células da granulosa (sulforrodamina B e MTT) e o ensaio de sulforrodamina B realizado com as células do cumulus mostraram maiores valores de absorbância quando do oitavo dia de cultivo celular. Mesmo não havendo diferença estatisticamente significativa entre os 3 dias de cultivo analisado pelas duas técnicas, esta maior absorbância representa maior viabilidade e massa celular, e isto pode ser observado em 75% dos resultados no dia 8 de cultivo. Apenas no ensaio de MTT realizado com as células do cumulus este padrão não foi observado, mas, apesar disso, a diferença entre os valores deste ensaio no dia 6 (0,06712) e no dia 8 (0,06720625) foi mínima.

Portanto, as duas técnicas utilizadas na parte I deste trabalho mostraram que os dois tipos celulares mantiveram-se viáveis nos 3 tempos de cultivo testados e, sendo assim, optou-se por cultivar as células pelo período de 8 dias para a realização das duas próximas etapas do estudo. Esta escolha foi feita com base em dois principais fatores: o primeiro, já exposto anteriormente, diz respeito aos resultados dos experimentos realizados nesta parte do trabalho (maior absorbância no dia 8 de cultivo em 75% dos resultados); e o segundo, por sua

vez, relaciona-se com o fato de este não ser um tempo tão prolongado de cultivo (menor do que o terceiro tempo testado – 10 dias), visto os maiores obstáculos e dificuldades encontrados quando da manutenção de uma cultura celular primária por períodos muito prolongados.

Além disto, para a realização de um estudo com exposição de células foliculares desluteinizadas ao sulfato de dehidroepiandrosterona, até então não descrito na literatura, foi necessário o estabelecimento da concentração hormonal de SDHEA a ser utilizada. Visto isso, todos os grupos experimentais foram cultivados com meio de cultivo que apresentava o hormônio, cada um com a concentração específica determinada, com exceção do grupo controle, que durante todo o tempo de experimento não foi submetido a nenhuma exposição hormonal. As concentrações de SDHEA utilizadas foram estipuladas a partir de estudos presentes na literatura e das concentrações fisiológicas deste hormônio (Esfahani, Kendall et al. 2010; Nheu, Nazareth et al. 2011; Rijk, Bovee et al. 2012).

Dentre os estudos utilizados como base, tem-se o de Nheu e colaboradores (Nheu, Nazareth et al. 2011), os quais investigaram os efeitos fisiológicos de androgênios em culturas de células humanas endoteliais vasculares e de músculo liso com relação à viabilidade celular, à proliferação, à síntese de colágeno e à expressão de genes relevantes ao estudo. Ainda, Rijk e colaboradores buscaram investigar a precisão de fatias hepáticas como um modelo *in vitro* multifuncional para o estudo da bioativação da DHEA e dos efeitos resultantes do seu metabólito. Apesar de estes estudos não terem sido realizados com células foliculares, eles foram utilizados como base para a determinação das doses hormonais a serem utilizadas em nosso trabalho, visto a ausência de trabalhos com o modelo celular que propusemos. Além disto, as concentrações fisiológicas humanas femininas de DHEA e de SDHEA serviram como base para a determinação das doses a serem testadas em nosso trabalho. Valores entre 10 a 35 nM (0,01 a 0,035 μ M) são as concentrações séricas fisiológicas de DHEA em mulheres jovens pré-menopáusicas (Esfahani, Kendall et al. 2010), enquanto que valores entre 40 a 430 μ g/dL (1 a 11 mM) são as concentrações séricas de SDHEA em fase precoce do desenvolvimento folicular (3^o ao 5^o dia do ciclo menstrual) em mulheres jovens pré-menopáusicas (Pinheiro and Clapauch 2001).

Como afirmado anteriormente, é sabido que o sulfato de DHEA apresenta uma meia-vida em torno de 20 vezes maior do que a DHEA, apresentando, assim, níveis séricos estáveis ao longo do dia (Garzon, Schulz et al. 1984). Portanto, visto esta informação e os dados anteriormente expostos sobre doses utilizadas em outros estudos, o hormônio utilizado neste

estudo foi o SDHEA, e as doses hormonais testadas neste trabalho (0,01, 0,02, 0,04, 0,08 e 0,16 μM) incluíram valores que já foram utilizados em culturas de células humanas, bem como abrangeram valores séricos desse hormônio que variam de fisiológicos a supra-fisiológicos.

Mulheres que realizam procedimento de fertilização *in vitro*, em aproximadamente 26% das clínicas de reprodução assistida de 45 países, têm sido submetidas a protocolos de suplementação oral com DHEA (Xu, Li et al. 2014; Qin, Fan et al. 2016). Normalmente, estas pacientes recebem uma dose de 75 mg diárias de hormônio (Stocco 2008; Wisner, Gonen et al. 2010; Liu, Wang et al. 2016) e, portanto, elas têm sido expostas a concentrações supra-fisiológicas bastante elevadas do hormônio em questão. As doses utilizadas neste estudo são, claramente, inferiores às quantidades hormonais administradas às pacientes. No entanto, sabe-se que os processos de esvaziamento gástrico, de trânsito intestinal, de dissolução dos fármacos, de difusão pela membrana intestinal de fármacos dissolvidos e todos os processos de permeação do medicamento pelas membranas celulares até que ele alcance o sangue podem sofrer variações devido a vários fatores e/ou interações e, assim, influenciar na absorção do fármaco (Fleisher, Li et al. 1999). Visto isso, até mesmo nanotecnologia tem sido utilizada na tentativa de expansão do potencial terapêutico de fármacos, visando a liberação de fármacos no organismo de uma maneira específica na célula (Lin, Yue et al. 2016). Portanto, mesmo que as doses de SDHEA utilizadas neste trabalho sejam visivelmente menores que as 75 mg diárias orais administradas às pacientes, as células utilizadas neste estudo, ainda assim, foram expostas a quantidades notavelmente elevadas deste hormônio, visto a diferença entre uma administração oral de fármaco e uma exposição celular direta ao mesmo.

Sabe-se que é de grande importância a obtenção de resultados precisos e confiáveis de ensaios *in vitro* que mostrem as possíveis ações toxicológicas de substâncias químicas e/ou de fármacos empregados em pesquisa, já que estes dados podem influenciar na correta escolha de um candidato a medicamento ou substância para tratamento (Ndossi, Frizzell et al. 2012; van Tonder, Joubert et al. 2015). Da mesma forma, muitos ensaios biológicos necessitam da determinação da quantidade de células vivas e/ou em proliferação na amostra utilizada (Karck, Reister et al. 1996), pois se sabe que células de mamíferos, quando cultivadas em ambiente artificial, dividem-se constantemente e que agentes químicos tóxicos ou com potencial de toxicidade podem gerar uma diminuição do potencial proliferativo destas células, repercutindo na quantidade/viabilidade de células que permanecem mantidas em cultura (www.oecd.org/ehs).

Portanto, foram feitos, nesta parte do trabalho, dois diferentes experimentos que indicam medidas de viabilidade e proliferação celular, a fim de analisar os possíveis efeitos, tóxicos ou não, do SDHEA sob estes parâmetros quando da exposição deste hormônio às células em estudo. Os resultados desta parte do trabalho mostraram que ambos os ensaios (sulforrodamina B e MTT), realizados com as células da granulosa e do *cumulus*, não mostraram diferença estatística, com relação ao grupo controle, da dose de 0,01 μ M até a dose de 0,08 μ M. Ainda, ambos os ensaios realizados com CG e o ensaio de sulforrodamina B realizado com CC não apresentaram diferença estatística entre a maior dose hormonal testada (0,16 μ M de SDHEA) e o grupo controle. Apenas no ensaio de MTT realizado com as células do *cumulus* foi vista uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo tratado com esta dose de 0,16 μ M de SDHEA e o grupo controle, havendo uma diminuição da viabilidade no grupo tratado. Assim sendo, decidiu-se por utilizar na etapa III do trabalho a dose hormonal de 0,08 μ M de SDHEA, visto que esta dose não alterou a viabilidade celular dos dois tipos celulares por nenhum dos dois ensaios realizados e, assim como as doses às quais as pacientes utilizam nos tratamentos de reprodução assistida, é uma dose hormonal supra-fisiológica.

Como mencionado anteriormente, a exposição de células foliculares desluteinizadas ao sulfato de dehidroepiandrosterona não está descrita na literatura até o momento, e, neste estudo, esta exposição foi realizada em dois grupos experimentais diferentes, sendo eles os estágios de desenvolvimento folicular *early antral* e o pré-ovulatório. Os resultados obtidos foram referentes a dosagens hormonais realizadas no sobrenadante do cultivo celular. Além disto, características das pacientes das quais as células foliculares foram obtidas e dos protocolos de estimulação hormonal aos quais foram submetidas também foram analisadas.

A idade das pacientes e o número de folículos recuperados foram aspectos que se mostraram bastante variados. A idade das pacientes variou entre 31 e 45 anos, sendo a média de idade, 38,45 anos (desvio padrão de 4,03). Considera-se que aos 32 anos a fertilidade feminina diminua significativamente, havendo um declínio ainda mais rápido após os 37 anos (Liu, Wang et al. 2016). Portanto, avaliando-se a média de idade das pacientes deste estudo, podemos considerar que este trabalho foi realizado com uma amostra obtida de pacientes com idade reprodutiva avançada. Além disto, estas pacientes foram submetidas a dois diferentes tipos de protocolos de estimulação hormonal. Sabe-se que existem diferentes protocolos de estimulação hormonal para ovulação, os quais consistem em aumentar a exposição dos ovários às gonadotrofinas exógenas, promovendo o crescimento de múltiplos folículos ovarianos por ciclo. Além disto, há aumento da quantidade de receptores hormonais, de fatores de crescimento e da síntese de estradiol em resposta ao aumento da concentração

de gonadotrofinas nas células da granulosa (Cornel, Grieco et al.). No esquema longo, o análogo de GnRH (agonista) é iniciado em torno do 23º dia da fase lútea do ciclo prévio à estimulação ou no 1º dia do ciclo na dose de 0,10 mUI por dia por um período de 2 ou 3 semanas, até se conseguir um bloqueio hipofisário (níveis de estradiol menores que 30-40 pg/mL), sendo continuado durante a estimulação ovariana na dose de 0,05 mUI por dia, até um dia antes da administração do hCG. Por outro lado, no esquema curto o análogo do GnRH é iniciado na fase lútea do ciclo prévio e após a menstruação e, quando confirmados níveis baixos de estradiol, é iniciada a estimulação ovariana. O hMG (*Human Menopausal Gonadotrophin*) é um hormônio frequentemente utilizado no esquema curto e que contém quantidades iguais de LH e de FSH, liofilizados. Os agonistas de GnRH realizam a dessensibilização hipofisária, tanto na fase folicular inicial quanto na fase lútea média, enquanto que os antagonistas realizam um bloqueio hipofisário após o início da estimulação ovariana (Cornel, Grieco et al.). Tanto o protocolo de estimulação hormonal longo quanto o curto aplicados às pacientes das quais as células foram coletadas apresentaram variações dos hormônios utilizados; porém, este foi um fator independente deste estudo, sendo definido a critério médico dependendo das características de cada paciente.

Devido a estas variações nos tipos e quantidades de hormônios que as pacientes fazem uso, as respostas hormonais de cada cultura celular primária podem ser distintas, ou seja, é normal haver grande variação dos resultados devido às variações biológicas dos indivíduos e aos tratamentos prévios (Lindeberg, Carlstrom et al. 2007). Além disto, independente do protocolo utilizado, quando recuperadas nos ciclos de reprodução assistida, as células encontram-se em um estado luteinizado, devido ao tratamento hormonal das pacientes. Como já afirmado anteriormente, o uso destas células foliculares luteinizadas em cultura celular é limitado devido esta prévia exposição das células às gonadotrofinas e ao seu estado luteinizado (Ophir, Yung et al. 2014). Ou seja, devido à estimulação hormonal dos procedimentos de fertilização *in vitro*, as células se tornam insensíveis e perdem sua capacidade de resposta ao FSH, por exemplo, quando cultivadas (Breckwoldt, Selvaraj et al. 1996). Portanto, neste estudo, as células foram cultivadas por um período de quatro dias após a semeadura com troca diária do meio de cultivo e sem a adição de nenhum tipo de hormônio, seguindo o protocolo proposto por Ophir e colaboradores para desluteinização das células foliculares.

Já é bem documentado que as concentrações de estradiol e de outros hormônios esteroides variam no organismo feminino dependendo da fase do ciclo ovariano em que a mulher se encontra. As concentrações plasmáticas de estradiol, por exemplo, variam de,

aproximadamente, 140 pmol/L, na fase menstrual, a 400 pmol/L na fase lútea (Sherman and Korenman 1975; Phillips and Sherwin 1992). Ou seja, a produção de estradiol varia, em µg/24 horas, de 36 (durante um estágio de desenvolvimento *early* folicular) para 380 (durante um estágio pré-ovulatório), para 250 (durante um estágio lúteo intermediário) (Reed and Carr 2015). Sabe-se que o estradiol é produzido pelas células foliculares, em especial pelas células da granulosa e do *cumulus* (Drummond 2006; Reed and Carr 2015; Vireque, Campos et al. 2015); portanto, considerando estes dados, tem-se que a secreção de estradiol de células foliculares luteinizadas deve ser elevada e, quando estas células são submetidas a um protocolo de desluteinização, esta secreção deveria diminuir. Corroborando essas informações, as dosagens de estradiol feitas do sobrenadante do cultivo celular neste estudo apresentaram valores consideravelmente menores no quarto dia de cultivo (37,633 pg/mL para CGs *early antrais*; 38,770 pg/mL para CGs pré-ovulatórias; 38,771 pg/mL para CCs pré-ovulatórias – dados do grupo controle) quando comparados aos do primeiro dia (1294,811 pg/mL para CGs *early antrais*; 1509,000 pg/mL para CGs pré-ovulatórias; 404,557 pg/mL para CCs pré-ovulatórias – dados do grupo controle). Isto mostra que, empregando-se os valores das dosagens de estradiol como fator de análise, as células deste trabalho passaram, efetivamente, por um processo de desluteinização. Lindeberg e colaboradores, em 2007 (Lindeberg, Carlstrom et al. 2007), mostraram uma forma diferente de se trabalhar com células foliculares não luteinizadas. Eles recuperaram células de pacientes submetidas a tratamento de maturação *in vitro* (MIV), no qual as pacientes, na maioria das situações, não necessitam passar por tratamento hormonal. Portanto, quando eles obtinham a amostra, as células já se encontravam em um estado não luteinizado. Porém, como afirmado pelos próprios autores, a quantidade de material obtida deste tipo de coleta celular é ainda menor do que do procedimento de fertilização *in vitro*, diminuindo ainda mais a possibilidade de se trabalhar com diversos grupos experimentais. No entanto, mesmo trabalhando com uma fonte diferente de células foliculares não luteinizadas daquela utilizada neste trabalho, Lindeberg e colaboradores mostraram que a secreção celular de estradiol é bastante inferior em células não luteinizadas quando comparada a das células luteinizadas, fato este que foi visto, também, neste estudo.

Em 2014, Ophir e colaboradores (Ophir, Yung et al. 2014) demonstraram um aumento da secreção de progesterona por CGs, cultivadas em um meio livre de hormônios, nos dois primeiros dias de cultivo, ocorrendo, posteriormente, um declínio nessa secreção, a qual atinge um *plateau* no sétimo dia de cultivo. Entretanto, estes autores evidenciaram que o aumento da secreção deste hormônio nos dois primeiros dias de cultivo foi menor quando

houve troca diária do meio de cultivo. Além disto, a subsequente diminuição da secreção foi acelerada pela troca diária de meio de cultivo, alcançando o *plateau* em torno do quarto a quinto dia. No modelo de cultivo celular utilizado no nosso trabalho, a troca do meio de cultivo foi realizada diariamente até o quarto dia, e, após, de 48 em 48 horas. Seguindo o mesmo padrão de variações visto por Ophir e colaboradores (Ophir, Yung et al. 2014), a secreção de progesterona das células deste estudo sofreu, inicialmente, um aumento (porém, neste trabalho, este aumento foi visto no sexto dia de cultivo) e, posteriormente, uma diminuição (vista, neste trabalho, no oitavo dia de cultivo). Ainda, os resultados deste estudo mostraram haver uma secreção hormonal maior (com maior diferença entre os valores do sexto dia de cultivo e os do primeiro e do quarto dias) nas células em estágio de desenvolvimento pré-ovulatório quando comparadas às células em estágio *early antral*.

No cultivo celular realizado neste trabalho, as células foram divididas em dois distintos grupos (controle e tratado). O grupo tratado foi exposto a uma concentração hormonal de SDHEA de 0,08 μM , visto que os resultados obtidos com os ensaios realizados na parte II deste trabalho mostraram ser essa a dose de SDHEA a ser utilizada nos experimentos seguintes. Portanto, estas células foram tratadas com tal concentração hormonal nos dias 4 e 6 de cultivo (depois de passado o tempo de cultivo sem a presença de hormônios, estabelecido pelo protocolo de desluteinização) (Ophir, Yung et al. 2014). As dosagens hormonais realizadas a partir do sobrenadante do cultivo celular confirmaram a presença deste hormônio no grupo tratado de ambos os estágios de desenvolvimento (*early antral* e pré-ovulatório) e tipos celulares (CGs e CCs). Os valores de SDHEA obtidos no dia 1 de cultivo das células do *cumulus* foram um pouco mais elevados do que os valores das células da granulosa, porém, no dia 4 estes valores já haviam diminuído e ficado semelhantes aos das células da granulosa. Algumas das culturas de pacientes incluídas no estudo apresentaram dosagens individuais de SDHEA elevadas no primeiro dia de cultivo, fazendo com que o valor médio, expresso nos resultados, ficasse elevado. No entanto, como afirmado para o valor médio, os valores individuais das culturas também reduziram e se apresentaram baixos no quarto dia de cultivo, mantendo-se baixo no grupo controle até o final do período de cultivo celular.

Acredita-se que nos estágios iniciais da foliculogênese, os androgênios promovam o crescimento folicular (Drummond 2006), agindo, provavelmente, nas células foliculares da granulosa e do *cumulus*, sendo que a forte expressão de receptores de androgênio nestes dois tipos celulares em ovários de roedores já foi confirmada há bastante tempo (Tetsuka, Whitelaw et al. 1995). Portanto, diversos estudos têm sugerido que o tratamento com DHEA, que é um importante androgênio produzido pelas glândulas adrenais e pelas células ovarianas

da teca (Liu, Wang et al. 2016), possa ser efetivo em mulheres inférteis classificadas como má respondedoras (MR) (Wiser, Gonen et al. 2010; Xu, Li et al. 2014; Liu, Wang et al. 2016). Liu e colaboradores, em 2016, afirmaram que visto que a DHEA pode modificar o microambiente folicular, melhorando o desenvolvimento folicular e a qualidade do oócito e diminuindo as taxas de aborto, este androgênio é, hoje em dia, amplamente utilizado em pacientes que não respondem bem à estimulação com gonadotrofinas, ou seja, pacientes MR.

No entanto, durante décadas, os androgênios foram considerados prejudiciais à maturação folicular (Aerts and Bols 2010). Porém, recentemente, evidências sugeriram que eles poderiam ser essenciais para a foliculogênese normal e para a fertilidade feminina. Foi evidenciado, portanto, que a DHEA é muito importante para a esteroidogênese sexual, visto que ela é convertida a androstenediona e estrona no folículo ovariano, e estes últimos são as fontes de testosterona e estradiol (Liu, Wang et al. 2016), importantes esteroides sexuais. Portanto, por se saber que os esteroides sexuais desempenham um papel de importância no crescimento e na diferenciação de tecidos reprodutivos e na manutenção da fertilidade (Drummond 2006), cada vez mais estudos dedicam-se em pesquisar o mecanismo de ação da DHEA no ovário (Liu, Wang et al. 2016). No entanto, ainda não se sabe com certeza de que maneira a administração oral de DHEA para pacientes que realizam tratamentos de reprodução assistida gera os efeitos benéficos que têm sido encontrados.

Este estudo demonstrou que a exposição das células foliculares ao SDHEA causou um aumento da quantidade de estradiol no sobrenadante do cultivo celular, ou seja, um aumento da secreção deste hormônio pelas células. Drummond e colaboradores (Drummond 2006), evidenciaram que folículos pré-antrais de camundongos cultivados por quatro dias com exposição à testosterona, ou à di-hidrotestosterona, ou à androstenediona, ou à DHEA ou ao SDHEA tiveram seu diâmetro aumentado e suas células da granulosa coradas fortemente com um marcador indicador de proliferação celular. Contrariamente, os ensaios de viabilidade e proliferação realizados na etapa II deste trabalho não demonstraram maior proliferação celular dos grupos tratados com SDHEA em comparação ao grupo controle. Portanto, pode-se supor que o aumento da secreção de estradiol encontrado neste trabalho se deu devido à maior produção hormonal tanto de células da granulosa quanto de células do *cumulus* no grupo tratado com SDHEA em comparação ao grupo controle, e não devido a uma maior quantidade de células. O importante papel do estradiol para o correto desenvolvimento folicular já foi demonstrado anteriormente (Garzo and Dorrington 1984; Stocco 2008), sendo que foi comprovado que tal hormônio e seus receptores apresentam um grande impacto na regulação da função celular ovariana e na expressão de genes específicos nas células da granulosa

(Sharma, Clemens et al. 1999). Além disto, Jakimiuk e colaboradores (Jakimiuk, Weitsman et al. 2002), confirmaram que a principal característica que define um folículo dominante é a alta concentração de estradiol no microambiente folicular. Visto isso, os resultados de aumento da secreção de estradiol pelas células foliculares tratadas com DHEA obtidos neste estudo podem sugerir que este androgênio apresente um efeito importante em auxiliar no aumento do número de folículos em desenvolvimento a folículos dominantes que possam ser fertilizados.

Liu e colaboradores (Liu, Wang et al. 2016), demonstraram que os seus resultados sugerem que a DHEA possa exercer seu efeito reprodutivo positivo por aumentar a qualidade oocitária e embrionária. Eles mostraram que a administração de DHEA resultou em uma diminuição significativa na duração e na quantidade de FSH requerido para a estimulação ovariana. Portanto, estes autores acreditam que a DHEA exógena utilizada pelas pacientes aumente a sensibilidade da estimulação por gonadotrofinas em mulheres com idade reprodutiva avançada. Unindo estas informações com os resultados de aumento da secreção celular de estradiol deste trabalho, é possível sugerir que a DHEA, por aumentar a sensibilidade celular ao FSH, cause aumento da secreção de estradiol nos folículos (o que comprovamos pelas dosagens hormonais realizadas) - já que o FSH estimula a produção de estradiol. Porém, apenas o grupo experimental de células pré-ovulatórias deste trabalho foi exposto ao FSH, e, portanto, a secreção de estradiol deve ser causada não só por este fator, mas por outros ainda desconhecidos. Sabendo-se da necessidade de estradiol para o correto desenvolvimento folicular (Garzo and Dorrington 1984; Stocco 2008), estes fatores descritos anteriormente levariam ao aumento da qualidade oocitária, encontrada por Liu e colaboradores (Liu, Wang et al. 2016), quando DHEA exógena é administrada.

Na via de síntese de hormônios esteroides (ilustrada na figura 3 da introdução), partindo-se do colesterol em direção à produção de estradiol, a progesterona é produzida anteriormente à DHEA (Drummond 2006; Koeppen and Stanton 2009). Sabendo-se disso, pode-se levantar a hipótese de que a exposição das células foliculares à DHEA e seu sulfato (o qual utilizamos em nosso trabalho) realmente não altere a secreção celular de progesterona, visto a ordem cronológica e fisiológica de produção destes hormônios. Confirmando esta hipótese, Lindeberg e colaboradores (Lindeberg, Carlstrom et al. 2007), trataram suas culturas de CGs recuperadas de FIV com androstenediona (produto da dehidroepiandrosterona), e mostraram que o tratamento hormonal não influenciou nos níveis hormonais de progesterona. Corroborando estes achados, os resultados deste estudo mostraram não haver diferença entre

a secreção de progesterona das células foliculares do grupo controle e do grupo tratado com SDHEA.

Ensaio de expressão gênica, a fim de demonstrar a expressão dos genes *AR*, *CYP19A1*, *ER*, *FSHR* e *VCAM1*, em amostras de células foliculares (muras da granulosa e do *cumulus oophorus*) já foram realizados anteriormente em nosso laboratório. Juntamente com estes genes alvos, reações para os genes *ACTB* e *HPRT1*, determinados como genes de referência para células foliculares por trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa (com dados ainda não publicados), foram realizadas. Para as células da granulosa, ambos os genes são necessários para serem utilizados como normalizadores de experimentos de RT-qPCR (Reação em cadeia da polimerase em tempo real a partir de transcrição reversa), enquanto que para as células do *cumulus* apenas o gene *HPRT1* é necessário para esta função. Todos os cinco genes alvos citados, bem como os dois normalizadores, mostraram expressão tanto nas células murais da granulosa quanto nas células do *cumulus oophorus*. Na tabela 11 abaixo podem ser vistos os valores dos C_{Qs} (ciclos de quantificação) de cada gene testado para cada tipo celular. O valor de C_Q pode ser definido como o ciclo da reação de PCR no qual a fluorescência da amostra excede a fluorescência do *background* (fluorescência basal) (Uyar, Torrealday et al. 2013; Zhang, Yang et al. 2014). Os gráficos representativos das reações de amplificação para os transcritos dos genes em estudo e dos dois genes normalizadores encontram-se no anexo 4 deste trabalho.

Tabela 11. Valores dos ciclos de quantificação dos cinco genes alvo (*AR*, *CYP19A1*, *ER*, *FSHR* e *VCAM1*) e dos dois genes normalizadores (*ACTB* e *HPRT1*) das reações em cadeia da polimerase em tempo real a partir de transcrição reversa feitas com as células murais da granulosa (CG) e do *cumulus oophorus* (CC).

Tipo celular	Ciclo de quantificação (C_Q)						
	<i>AR</i>	<i>ACTB</i>	<i>CYP19A1</i>	<i>ER</i>	<i>FSHR</i>	<i>HPRT1</i>	<i>VCAM1</i>
CG	27,238	18,756	35,422	28,657	27,338	27,704	25,846
CC	22,576	-	32,516	25,184	23,869	23,618	24,102

7. CONCLUSÕES

Este trabalho estabeleceu um modelo experimental, baseado em um protocolo de desluteinização já existente (Ophir, Yung et al. 2014), de cultura primária de células foliculares (muras da granulosa e do *cumulus oophorus*) desluteinizadas, para podermos entender melhor o processo molecular ovulatório, o qual é limitado quando se trabalha com células luteinizadas. Pode-se concluir que o modelo proposto, com duração de cultivo de oito dias, é viável, sendo que a viabilidade celular manteve-se durante todo o período de cultivo.

As alterações ocorridas nas secreções hormonais de estradiol e de progesterona, devido ao tempo e características de cultivo do modelo experimental, forneceram informações novas, bem como condisseram com estudos já existentes, aumentando a confiabilidade do modelo experimental utilizado.

A partir deste modelo, podem ser feitas análises sobre fatores envolvidos no processo de foliculogênese, como também estudos da ação de substâncias sobre fases de desenvolvimento do folículo ovariano anteriores à luteinização celular. Trabalhos com cultivo primário celular refletem, na maioria das vezes, *in vitro* a variabilidade de respostas dos indivíduos, proporcionando uma ferramenta para o estudo de diferentes ações farmacológicas e/ou tratamentos.

O tratamento com SDHEA apresentou um efeito de aumento da secreção celular de estradiol nos estágios de desenvolvimento *early antral* e pré-ovulatório, tanto nas células da granulosa quanto nas células do cumulus. Por outro lado, a secreção de progesterona, em ambos os estágios de desenvolvimento e tipos celulares, não foi alterada devido ao tratamento com SDHEA.

São necessários estudos posteriores que avaliem outros desfechos da exposição celular ao SDHEA, como a expressão gênica de genes de interesse nas vias hormonais importantes da foliculogênese. Isto pode auxiliar na descoberta do real papel da DHEA exógena administrada para pacientes e, ainda, no entendimento da via pela qual este hormônio exerce seus efeitos.

Como perspectiva principal para este trabalho, tem-se a realização de reações de RT-qPCR, para análise da expressão dos genes *AR*, *CYP191A*, *ER*, *FSHR* e *VCAM1*, com amostras celulares cultivadas nas condições experimentais definidas neste trabalho.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aerts, J. M. and P. E. Bols (2010). "Ovarian follicular dynamics. A review with emphasis on the bovine species. Part II: Antral development, exogenous influence and future prospects." Reprod Domest Anim **45**(1): 180-187.
- Alcoba, D., J. Schneider, et al. (2017). "Brilliant cresyl blue staining does not present cytotoxic effects on human luteinized follicular cells, according to gene/protein expression, as well as to cytotoxicity tests." Reproductive Biology
- Alcoba, D. D., S. Gödde, et al. (2012). "Morphology of human mural granulosa and cumulus cells." Revista HCPA **32**.
- Barad, D., H. Brill, et al. (2007). "Update on the use of dehydroepiandrosterone supplementation among women with diminished ovarian function." J Assist Reprod Genet **24**(12): 629-634.
- Benifla, J. L., A. F. Bringuier, et al. (2001). "Vascular endothelial growth factor, platelet endothelial cell adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in the follicular fluid of patients undergoing IVF." Hum Reprod **16**(7): 1376-1381.
- Breckwoldt, M., N. Selvaraj, et al. (1996). "Expression of Ad4-BP/cytochrome P450 side chain cleavage enzyme and induction of cell death in long-term cultures of human granulosa cells." Mol Hum Reprod **2**(6): 391-400.
- Burkhardt, T., N. O. Schmidt, et al. (2013). "DHEA(S)--a novel marker in Cushing's disease." Acta Neurochir (Wien) **155**(3): 479-484; discussion 484.
- Casson, P. R., M. S. Lindsay, et al. (2000). "Dehydroepiandrosterone supplementation augments ovarian stimulation in poor responders: a case series." Hum Reprod **15**(10): 2129-2132.
- Cornel, C. A., S. C. Grieco, et al. Guideline de Reprodução Assistida, Sociedade Brasileira de Reprodução Humana.
- Couse, J. F., M. M. Yates, et al. (2005). "Estrogen receptor-beta is critical to granulosa cell differentiation and the ovulatory response to gonadotropins." Endocrinology **146**(8): 3247-3262.
- Drummond, A. E. (2006). "The role of steroids in follicular growth." Reprod Biol Endocrinol **4**: 16.
- Esfahani, A., C. W. Kendall, et al. (2010). "The effect of physiological concentrations of sex hormones, insulin, and glucagon on growth of breast and prostate cells supplemented with unmodified human serum." In Vitro Cell Dev Biol Anim **46**(10): 856-862.
- Esfahani, D. R., M. T. Pisansky, et al. (2011). "Motor cortex stimulation: functional magnetic resonance imaging-localized treatment for three sources of intractable facial pain." J Neurosurg **114**(1): 189-195.
- Fleisher, D., C. Li, et al. (1999). "Drug, meal and formulation interactions influencing drug absorption after oral administration. Clinical implications." Clin Pharmacokinet **36**(3): 233-254.
- Ford, J. H. (2013). "Reduced quality and accelerated follicle loss with female reproductive aging - does decline in theca dehydroepiandrosterone (DHEA) underlie the problem?" J Biomed Sci **20**: 93.

- Fornaro, F., L. Cobellis, et al. (2007). "Effects of gonadotropin-releasing hormone agonist/recombinant follicle-stimulating hormone versus gonadotropin-releasing hormone antagonist/recombinant follicle-stimulating hormone on follicular fluid levels of adhesion molecules during in vitro fertilization." Fertil Steril **87**(1): 39-47.
- Fragouli, E., M. D. Lalioti, et al. (2014). "The transcriptome of follicular cells: biological insights and clinical implications for the treatment of infertility." Hum Reprod Update **20**(1): 1-11.
- Fuller, J. W., J. A. Christensen, et al. (1975). "Common bile duct obstruction secondary to peptic ulcer." Am Surg **41**(10): 640-642.
- Garzo, V. G. and J. H. Dorrington (1984). "Aromatase activity in human granulosa cells during follicular development and the modulation by follicle-stimulating hormone and insulin." Am J Obstet Gynecol **148**(5): 657-662.
- Garzon, J., R. Schulz, et al. (1984). "Application of receptor theory provides further evidence for the existence of the epsilon-opioid receptor in rat vas deferens." Neuropeptides **5**(1-3): 101-104.
- Gervasio, C. G., M. P. Bernuci, et al. (2014). "The role of androgen hormones in early follicular development." ISRN Obstet Gynecol **2014**: 818010.
- Gleicher, N., A. Weghofer, et al. (2011). "The role of androgens in follicle maturation and ovulation induction: friend or foe of infertility treatment?" Reprod Biol Endocrinol **9**: 116.
- Hall, J. E. (2011). Tratado de Fisiologia Médica - Guyton & Hall, Elsevier.
- Jakimiuk, A. J., S. R. Weitsman, et al. (2002). "Estrogen receptor alpha and beta expression in theca and granulosa cells from women with polycystic ovary syndrome." J Clin Endocrinol Metab **87**(12): 5532-5538.
- Karck, U., F. Reister, et al. (1996). "PGE2 and PGF2 alpha release by human peritoneal macrophages in endometriosis." Prostaglandins **51**(1): 49-60.
- Koepfen, B. M. and B. A. Stanton (2009). Berne & Levy Fisiologia. Rio de Janeiro, Elsevier.
- Koks, S., A. Velthut, et al. (2010). "The differential transcriptome and ontology profiles of floating and cumulus granulosa cells in stimulated human antral follicles." Mol Hum Reprod **16**(4): 229-240.
- Koksal, V. and S. Oktem (2010). "Ventriculosubgaleal shunt procedure and its long-term outcomes in premature infants with post-hemorrhagic hydrocephalus." Childs Nerv Syst **26**(11): 1505-1515.
- Kronenberg, H., S. Melmed, et al. (2010). Willians - Tratado de Endocrinologia, Saunders - Elsevier.
- Li, R. and D. F. Albertini (2013). "The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte." Nat Rev Mol Cell Biol **14**(3): 141-152.
- Lin, H., Y. Yue, et al. (2016). "Drug Delivery Nanoparticles: Toxicity Comparison in Retinal Pigment Epithelium and Retinal Vascular Endothelial Cells." Semin Ophthalmol **31**(1-2): 1-9.
- Lindeberg, M., K. Carlstrom, et al. (2007). "Gonadotrophin stimulation of non-luteinized granulosa cells increases steroid production and the expression of enzymes involved in estrogen and progesterone synthesis." Hum Reprod **22**(2): 401-406.

Liu, X., W. Wang, et al. (2016). "Effect of dehydroepiandrosterone administration in Chinese women over 37 years undergoing assisted reproductive techniques." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **202**: 9-13.

Moore, K. L. P., T.V.N (2008). Embriologia Clínica. Rio de Janeiro, Elsevier.

Ndossi, D. G., C. Frizzell, et al. (2012). "An in vitro investigation of endocrine disrupting effects of trichothecenes deoxynivalenol (DON), T-2 and HT-2 toxins." Toxicol Lett **214**(3): 268-278.

Nheu, L., L. Nazareth, et al. (2011). "Physiological effects of androgens on human vascular endothelial and smooth muscle cells in culture." Steroids **76**(14): 1590-1596.

Ophir, L., Y. Yung, et al. (2014). "Establishment and validation of a model for non-luteinized human mural granulosa cell culture." Mol Cell Endocrinol **384**(1-2): 165-174.

Orentreich, N., J. L. Brind, et al. (1984). "Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood." J Clin Endocrinol Metab **59**(3): 551-555.

Phillips, S. M. and B. B. Sherwin (1992). "Variations in memory function and sex steroid hormones across the menstrual cycle." Psychoneuroendocrinology **17**(5): 497-506.

Pinheiro, S. A. and R. Clapauch (2001). "Importância da Dosagem da 17OH- Progesterona na Síndrome dos Ovários Policísticos." Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia **45**.

Qin, J. C., L. Fan, et al. (2016). "The effect of dehydroepiandrosterone (DHEA) supplementation on women with diminished ovarian reserve (DOR) in IVF cycle: Evidence from a meta-analysis." J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris).

Rajaei, A., M. Barzegar, et al. (2010). "Antioxidant, anti-microbial and antimutagenicity activities of pistachio (*Pistachia vera*) green hull extract." Food Chem Toxicol **48**(1): 107-112.

Rangan, G. K., J. W. Pippin, et al. (2005). "C5b-9 does not mediate chronic tubulointerstitial disease in the absence of proteinuria." Kidney Int **67**(2): 492-503.

Reed, B. G. and B. R. Carr (2015). The Normal Menstrual Cycle and the Control of Ovulation. South Dartmouth: 31.

Rijk, J. C., T. F. Bovee, et al. (2012). "Bovine liver slices: A multifunctional in vitro model to study the prohormone dehydroepiandrosterone (DHEA)." Toxicol In Vitro **26**(6): 1014-1021.

Sharma, S. C., J. W. Clemens, et al. (1999). "Expression and function of estrogen receptor subtypes in granulosa cells: regulation by estradiol and forskolin." Endocrinology **140**(9): 4320-4334.

Sherman, B. M. and S. G. Korenman (1975). "Hormonal characteristics of the human menstrual cycle throughout reproductive life." J Clin Invest **55**(4): 699-706.

Sherman, D. M., V. Dolenko, et al. (1975). "[Adequate replacement of acute blood loss]." Voen Med Zh(11): 64-66.

Sherman, H., R. Culik, et al. (1975). "Reproduction, teratogenic, and mutagenic studies with benomyl." Toxicol Appl Pharmacol **32**(2): 305-315.

Stocco, A. and J. R. Anderson (2008). "Endogenous control and task representation: an fMRI study in algebraic problem-solving." J Cogn Neurosci **20**(7): 1300-1314.

- Stocco, A. and D. Fum (2008). "Implicit emotional biases in decision making: the case of the Iowa Gambling Task." *Brain Cogn* **66**(3): 253-259.
- Stocco, C. (2008). "Aromatase expression in the ovary: hormonal and molecular regulation." *Steroids* **73**(5): 473-487.
- Tetsuka, M., P. F. Whitelaw, et al. (1995). "Developmental regulation of androgen receptor in rat ovary." *J Endocrinol* **145**(3): 535-543.
- Uyar, A., S. Torrealday, et al. (2013). "Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality." *Fertil Steril* **99**(4): 979-997.
- van Tonder, A., A. M. Joubert, et al. (2015). "Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays." *BMC Res Notes* **8**: 47.
- Vichai, V. and K. Kirtikara (2006). "Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening." *Nat Protoc* **1**(3): 1112-1116.
- Vireque, A. A., J. R. Campos, et al. (2015). "Driving Human Granulosa-Luteal Cells Recovered From In Vitro Fertilization Cycles Toward the Follicular Phase Phenotype." *Reprod Sci* **22**(8): 1015-1027.
- Williams, C. J. and G. F. Erickson, Eds. (2012). *Morphology and Physiology of the Ovary*. South Dartmouth.
- Wiser, A., O. Gonen, et al. (2010). "Addition of dehydroepiandrosterone (DHEA) for poor-responder patients before and during IVF treatment improves the pregnancy rate: a randomized prospective study." *Hum Reprod* **25**(10): 2496-2500.
- www.oecd.org/ehs. "No. 129 - GUIDANCE DOCUMENT ON USING CYTOTOXICITY TESTS TO ESTIMATE STARTING DOSES FOR ACUTE ORAL SYSTEMIC TOXICITY TESTS " 2010. Retrieved Janeiro, 2017, from <http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mo/2010/20&doclanguage=en>.
- Xu, B., Z. Li, et al. (2014). "Effect of dehydroepiandrosterone administration in patients with poor ovarian response according to the Bologna criteria." *PLoS One* **9**(6): e99858.
- Yeung, T. W., J. Chai, et al. (2014). "A randomized, controlled, pilot trial on the effect of dehydroepiandrosterone on ovarian response markers, ovarian response, and in vitro fertilization outcomes in poor responders." *Fertil Steril* **102**(1): 108-115 e101.
- Zhang, H. H., P. Y. Xu, et al. (2014). "Dehydroepiandrosterone improves follicular fluid bone morphogenetic protein-15 and accumulated embryo score of infertility patients with diminished ovarian reserve undergoing in vitro fertilization: a randomized controlled trial." *J Ovarian Res* **7**: 93.
- Zhang, Y., S. Yang, et al. (2014). "A high-responsivity photodetector absent metal-germanium direct contact." *Opt Express* **22**(9): 11367-11375.

9. ANEXOS

9.1 – Anexo 1

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Projeto: Efeito do sulfato de dehidroepiandrosterona (SDHEA) sobre o desenvolvimento folicular.

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

Telefone para contato: (51) 3308 - 3559

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

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

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

Os resultados deste estudo não trarão benefícios nem prejuízos diretos para a senhora, assim como não há aumento do risco de seu tratamento de Reprodução Assistida devido a sua participação no estudo (os riscos do tratamento são independentes deste estudo), pois não será realizada nenhuma técnica a mais durante o período do tratamento (não haverá nenhuma intervenção adicional).

Se houver algum dano diretamente decorrente de sua participação no estudo, você terá direito à indenização conforme previsto em lei. Você é livre para decidir para participar ou não do estudo, assim como, retirar-se dele em qualquer momento sem prejuízo ou alteração na rotina de seu tratamento ou relacionamento com seu médico.

Todas as informações obtidas estarão à sua disposição se assim desejar. Todos os resultados referentes à pesquisa serão utilizados para fins exclusivos de pesquisa, sendo resguardada sua total confidencialidade. Da mesma forma, a amostra de seu material não será utilizada para nenhuma outra finalidade, após o cultivo dessas células o material será descartado de forma correta.

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

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

Participante:

Nome (em letra de forma) Assinatura

Porto Alegre, ____ de _____ de _____

Pesquisador:

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

Nome (em letra de forma) Assinatura

Porto Alegre, ____ de _____ de _____

9.2 – Anexo 2

Gráficos de análise da viabilidade celular das células da granulosa (figuras 1 e 2) e do cumulus (figuras 3 e 4) por sulforrodamina B e MTT nos grupos controle e tratados com 5 diferentes doses de SDHEA. Cada linha numerada representa uma paciente.

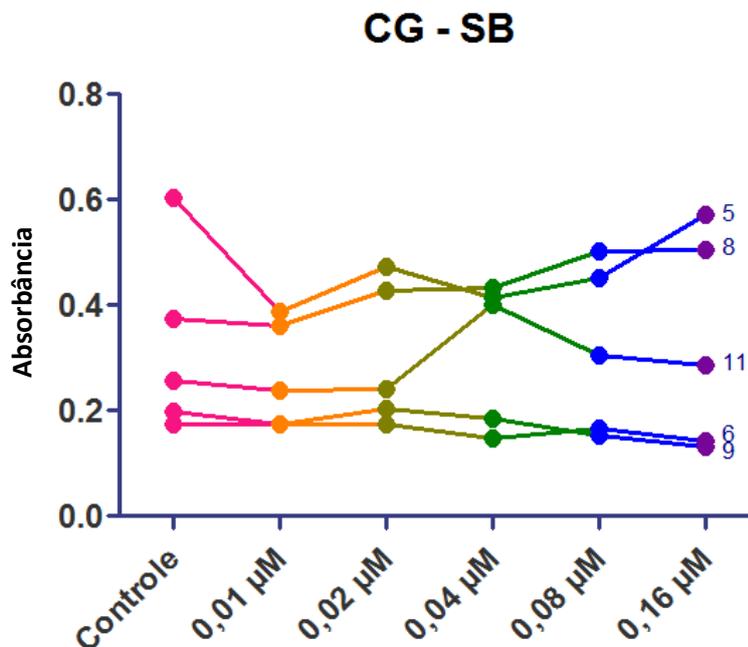


Figura 1. Análise da viabilidade celular das células da granulosa (CG) por sulforrodamina B (SB) nos grupos controle e tratados com 5 diferentes doses de SDHEA. N=5.

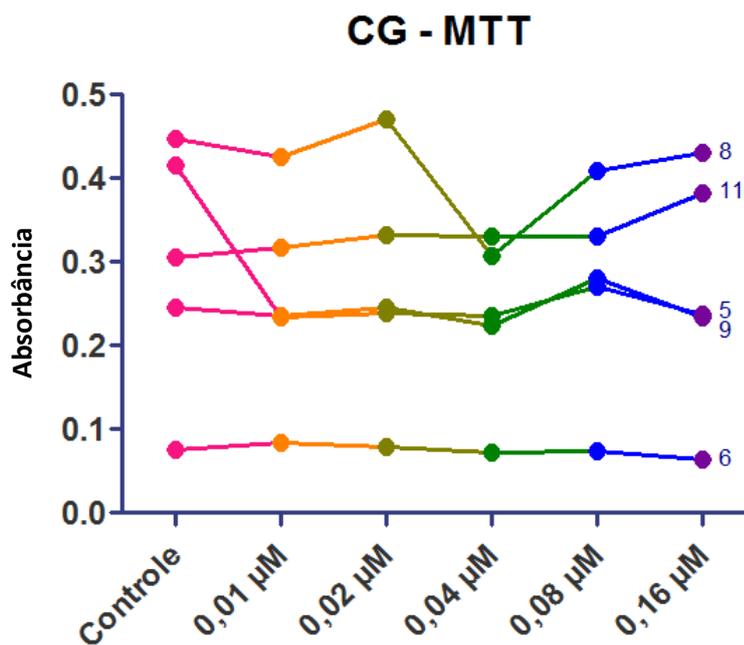


Figura 2. Análise da viabilidade celular das células da granulosa (CG) por MTT nos grupos controle e tratados com 5 diferentes doses de SDHEA. N=5.

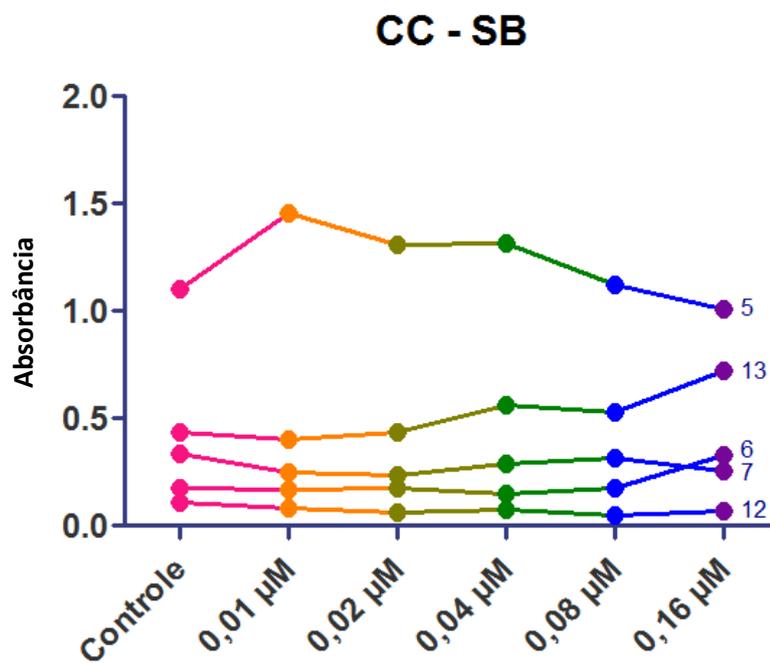


Figura 3. Análise da viabilidade celular das células do cumulus (CC) por sulforrodamina B nos grupos controle e tratados com 5 diferentes doses de SDHEA. N=5.

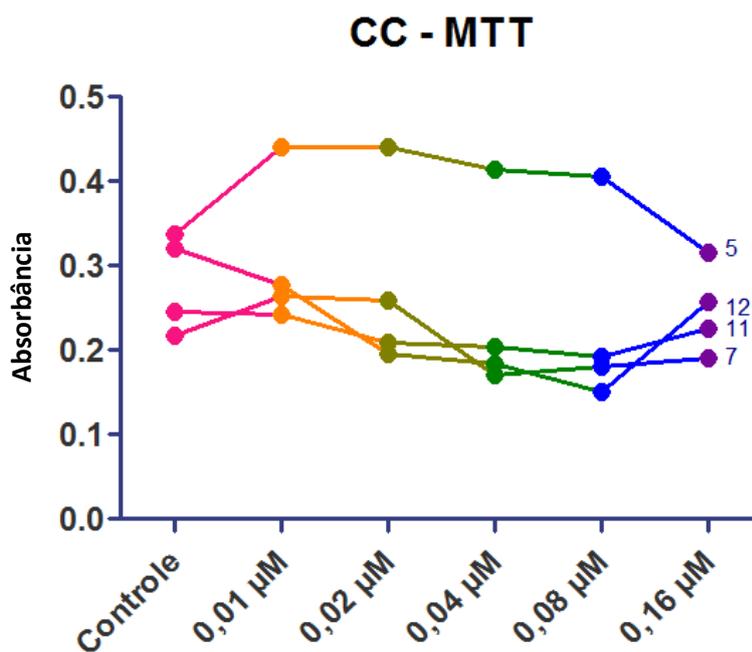


Figura 4. Análise da viabilidade celular das células do cumulus (CC) por MTT nos grupos controle e tratados com 5 diferentes doses de SDHEA. N=4.

9.3 – Anexo 3

Gráficos com os valores de SDHEA (em $\mu\text{g/dL}$), de E_2 (em pg/mL) e de progesterona (em ng/mL) do sobrenadante das células da granulosa nos estágios *early antral* (figuras 5, 8 e 11) e pré-ovulatório (figuras 6, 9 e 12), e das células do cumulus no estágio pré-ovulatório (figuras 7, 10 e 13) nos grupos controle e tratado com SDHEA.

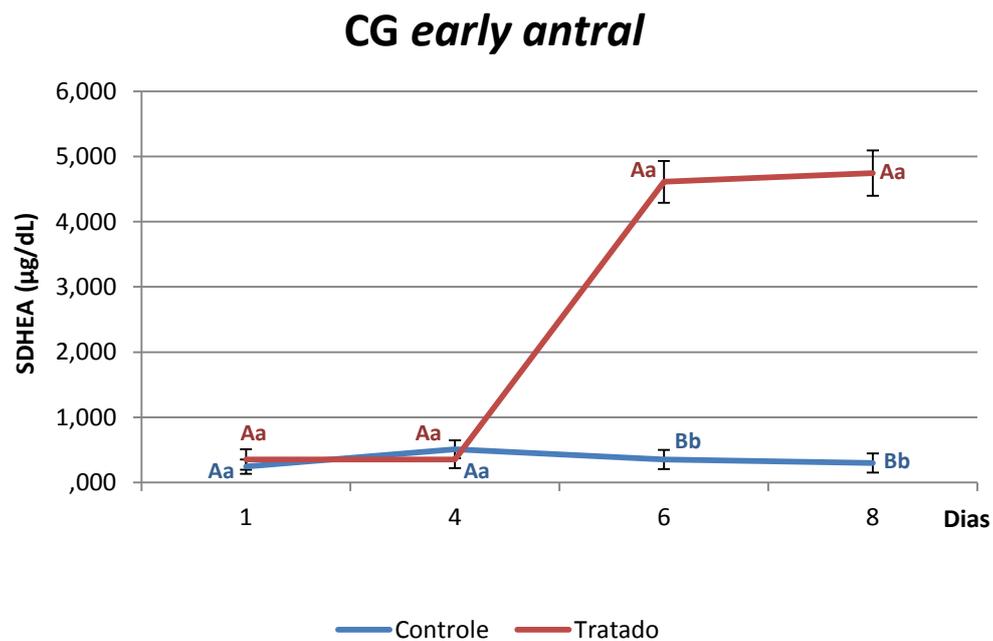


Figura 5. Valores de sulfato de dehidroepiandrosterona (SDHEA), em $\mu\text{g/dL}$, do sobrenadante das células murais da granulosa (CG) no estágio *early antral*, nos dias 1, 4, 6 e 8 de cultivo celular, nos grupos controle e tratado (com SDHEA). Dados expressos em média \pm erro padrão. Letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente entre os grupos controle e tratado ($p \leq 0,05$). Letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre os tempos ($p \leq 0,05$). N=36 (controle); N=36 (tratado).

CG pré-ovulatório

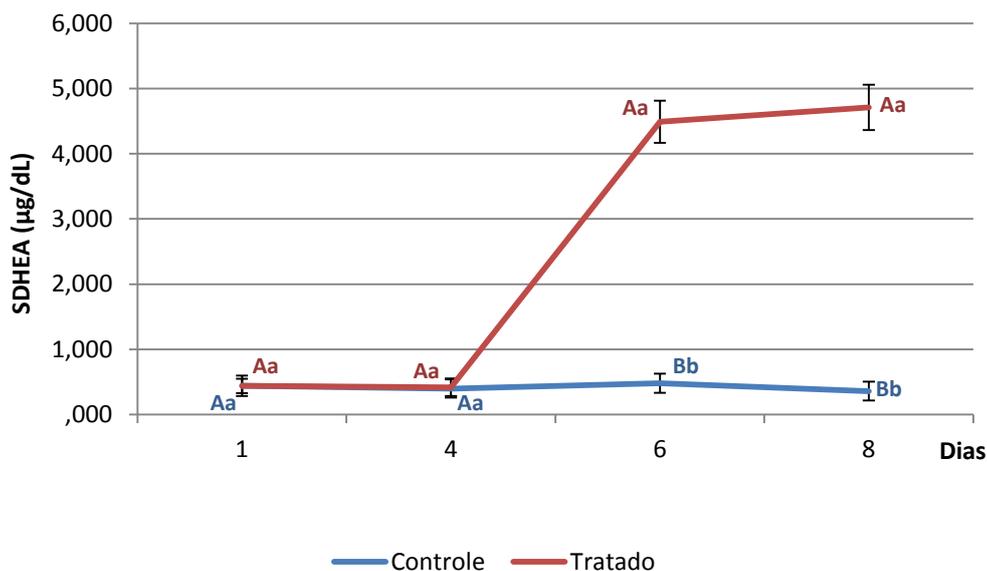


Figura 6. Valores de sulfato de dehidroepiandrosterona (SDHEA), em µg/dL, do sobrenadante das células murais da granulosa (CG) no estágio pré-ovulatório, nos dias 1, 4, 6 e 8 de cultivo celular, nos grupos controle e tratado (com SDHEA). Dados expressos em média ± erro padrão. Letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente entre os grupos controle e tratado ($p \leq 0,05$). Letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre os tempos ($p \leq 0,05$). N=40 (controle); N=40 (tratado).

CC pré-ovulatório

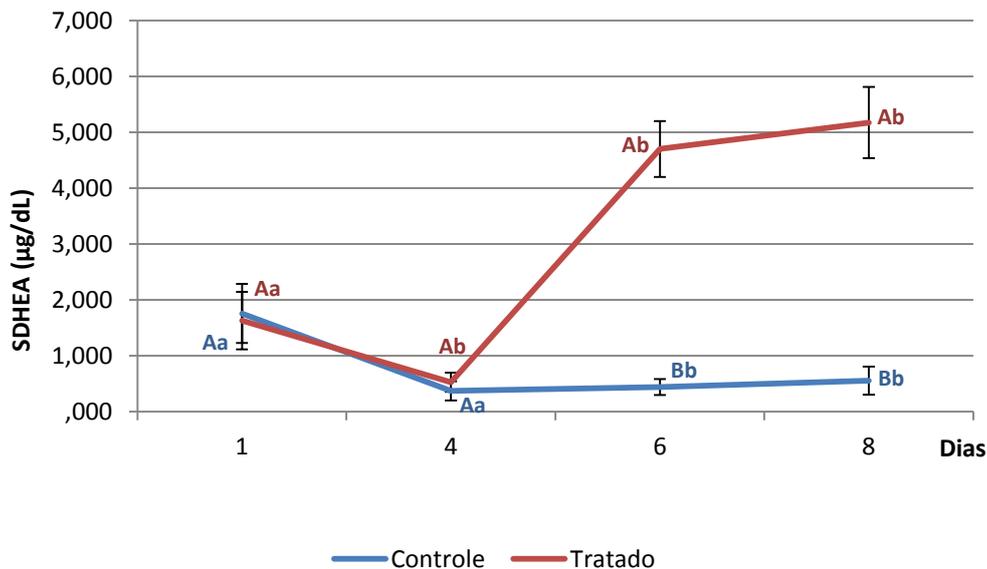


Figura 7. Valores de sulfato de dehidroepiandrosterona (SDHEA), em µg/dL, do sobrenadante das células do *cumulus oophorus* (CC) no estágio pré-ovulatório, nos dias 1, 4, 6 e 8 de cultivo celular, nos grupos controle e tratado (com SDHEA). Dados expressos em média ± erro padrão. Letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente entre os grupos controle e tratado ($p \leq 0,05$). Letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre os tempos ($p \leq 0,05$). N=28 (controle); N=28 (tratado).

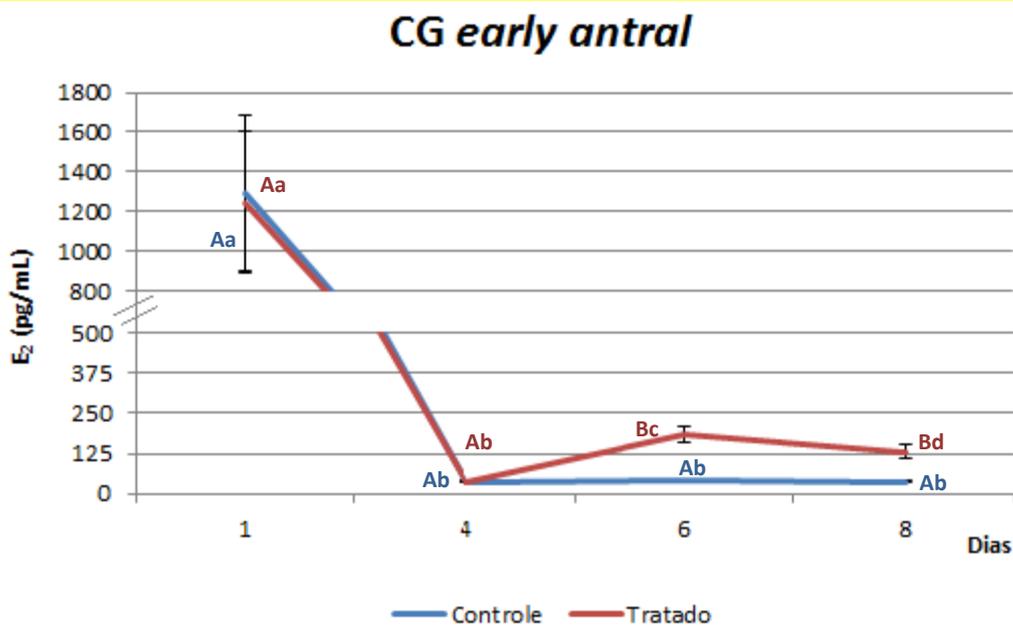


Figura 8. Valores de estradiol (E_2), em pg/mL, do sobrenadante das células murais da granulosa (CG) no estágio *early antral*, nos dias 1, 4, 6 e 8 de cultivo celular, nos grupos controle e tratado (com SDHEA). Dados expressos em média \pm erro padrão. Letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente entre os grupos controle e tratado ($p \leq 0,05$). Letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre os tempos ($p \leq 0,05$). N=36 (controle); N=35 (tratado).

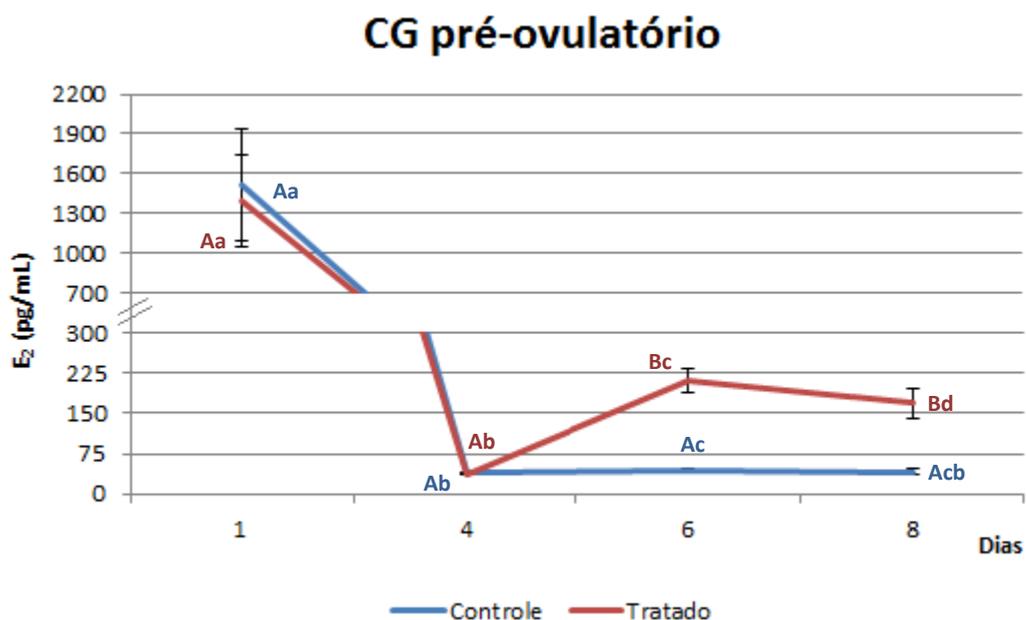


Figura 9. Valores de estradiol (E_2), em pg/mL, do sobrenadante das células murais da granulosa (CG) no estágio pré-ovulatório, nos dias 1, 4, 6 e 8 de cultivo celular, nos grupos controle e tratado (com SDHEA). Dados expressos em média \pm erro padrão. Letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente entre os grupos controle e tratado ($p \leq 0,05$). Letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre os tempos ($p \leq 0,05$). N=40 (controle); N=40 (tratado).

CC pré-ovulatório

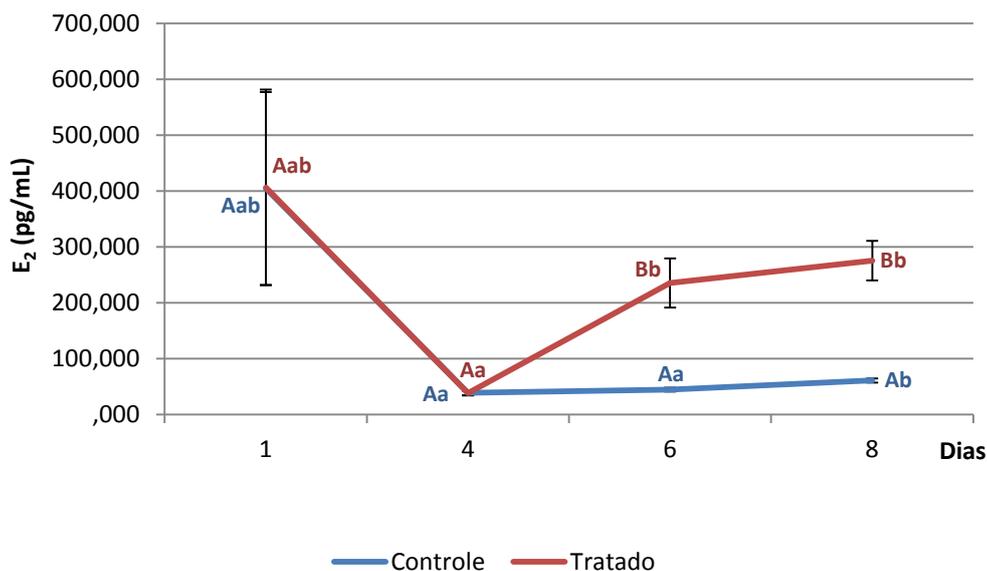


Figura 10. Valores de estradiol (E_2), em pg/mL, do sobrenadante das células do *cumulus oophorus* (CC) no estágio pré-ovulatório, nos dias 1, 4, 6 e 8 de cultivo celular, nos grupos controle e tratado (com SDHEA). Dados expressos em média \pm erro padrão. Letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente entre os grupos controle e tratado ($p \leq 0,05$). Letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre os tempos ($p \leq 0,05$). N=27 (controle); N=28 (tratado).

CG *early antral*

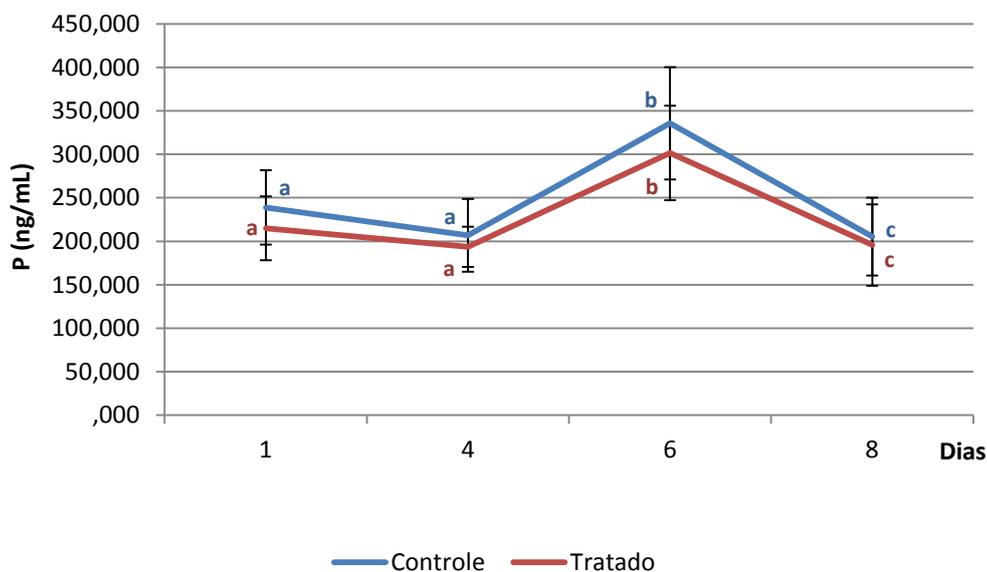


Figura 11. Valores de progesterona (P), em ng/mL, do sobrenadante das células murais da granulosa (CG) no estágio *early antral*, nos dias 1, 4, 6 e 8 de cultivo celular, nos grupos controle e tratado (com SDHEA). Dados expressos em média \pm erro padrão. Letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre os tempos ($p \leq 0,05$). N=23 (controle); N=24 (tratado).

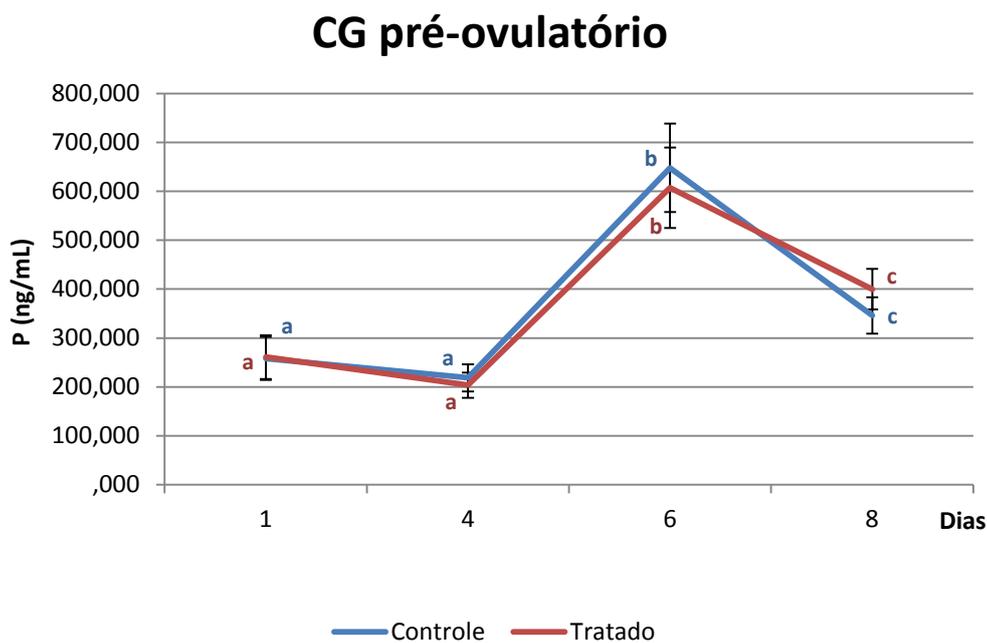


Figura 12. Valores de progesterona (P), em ng/mL, do sobrenadante das células murais da granulosa (CG) no estágio pré-ovulatório, nos dias 1, 4, 6 e 8 de cultivo celular, nos grupos controle e tratado (com SDHEA). Dados expressos em média \pm erro padrão. Letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre os tempos ($p \leq 0,05$). N=28 (controle); N=27 (tratado).

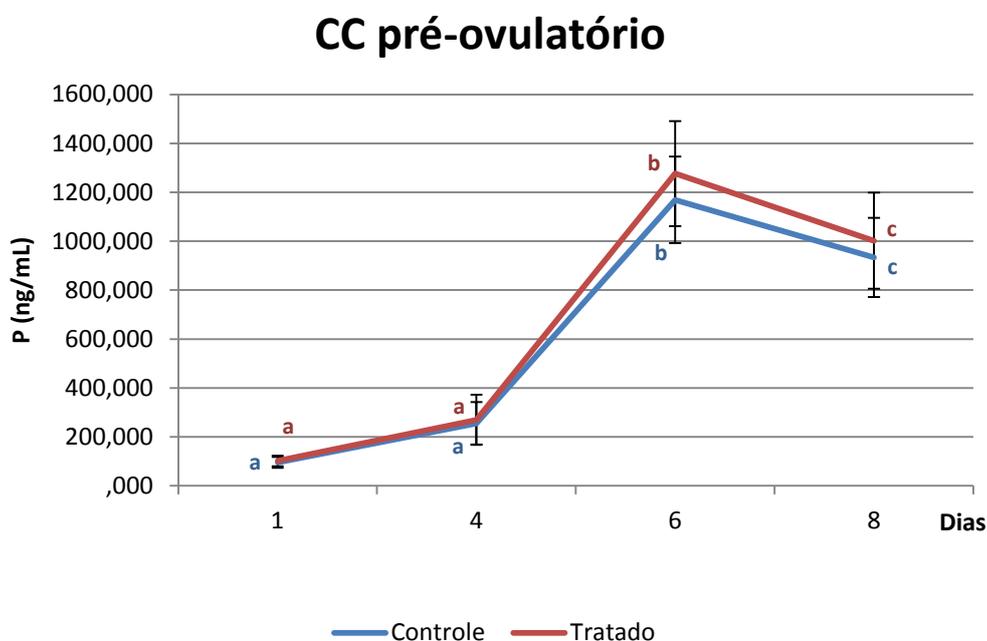


Figura 13. Média dos valores de progesterona (P), em ng/mL, do sobrenadante das células do *cumulus oophorus* (CC) no estágio pré-ovulatório, nos dias 1, 4, 6 e 8 de cultivo celular, nos grupos controle e tratado (com SDHEA). Dados expressos em média \pm erro padrão. Letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente entre os tempos ($p \leq 0,05$). N=20 (controle); N=20 (tratado).

9.4 – Anexo 4

Gráficos resultantes da amplificação dos transcritos dos genes *ACTB* (figura 14 – CG), *AR* (figura 15 – A: CG; B: CC), *CYP19A1* (figura 16 – A: CG; B: CC), *ER* (figura 17 – A: CG; B: CC), *FSHR* (figura 18 – A: CG; B: CC), *HPRT1* (figura 19 – A: CG; B: CC) e *VCAM1* (figura 20 – A: CG; B: CC). No eixo Y, o ΔRn representa a diferença entre os valores finais e iniciais da razão unidade de fluorescência da amostra por unidade de fluorescência do corante ROX (corante de referência passiva) e está plotado versus o número de ciclos da reação (no eixo X).

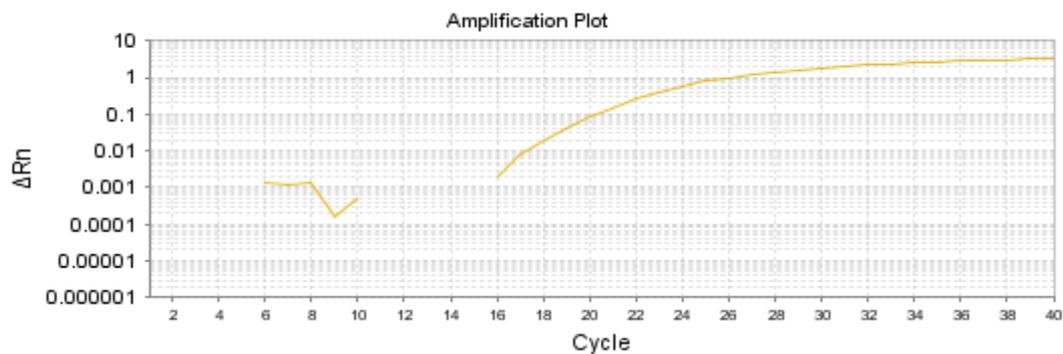


Figura 14. Gráfico representativo da reação de amplificação para o transcrito do gene *ACTB* das células murais da granulosa (Ct: 18,756).

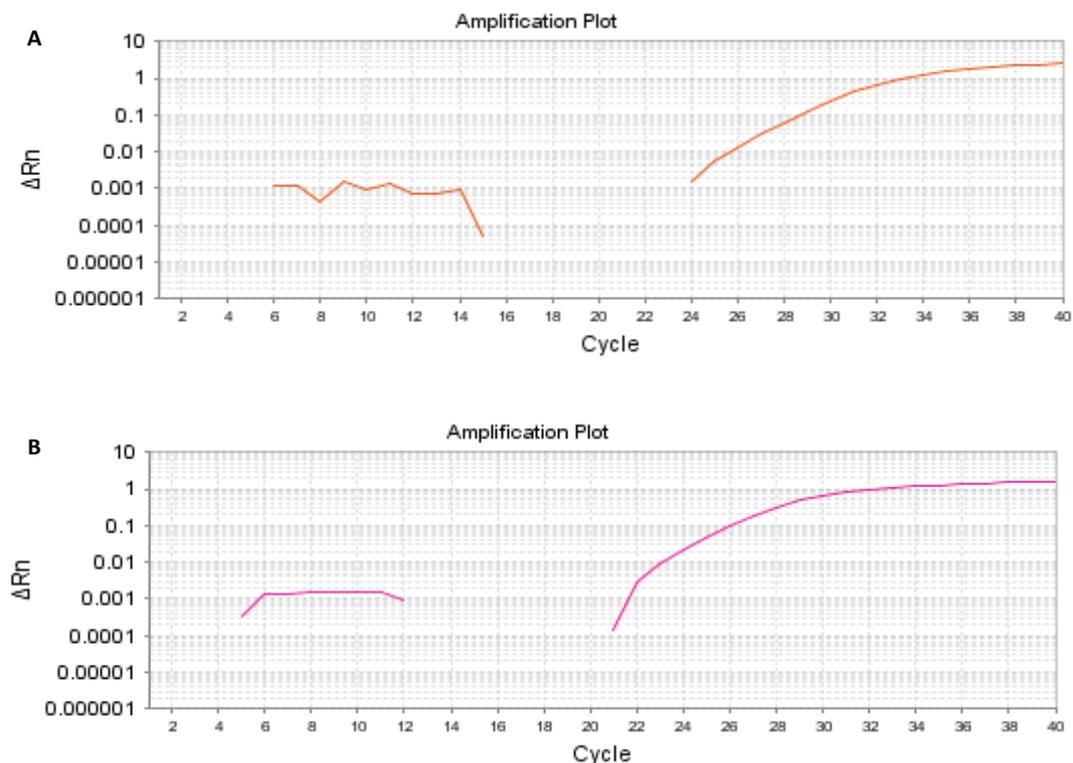


Figura 15. Gráfico representativo da reação de amplificação para o transcrito do gene AR. A: células murais da granulosa (Ct: 27,238); B: células do *cumulus oophorus* (Ct: 22,576).

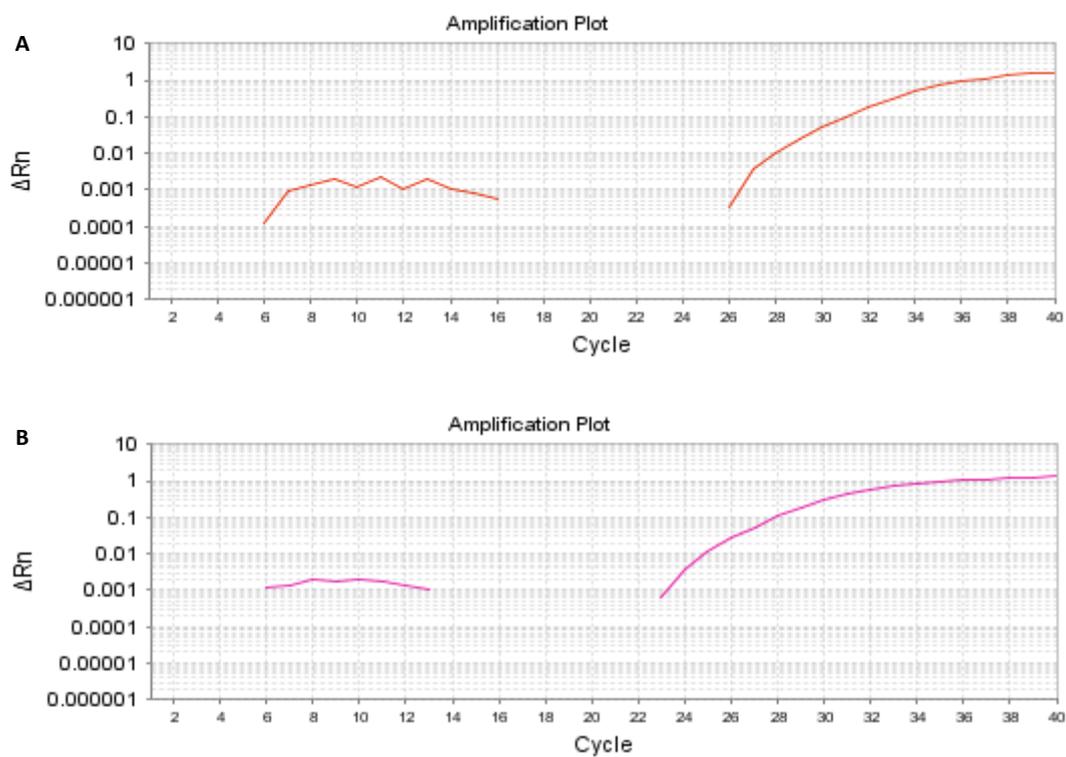
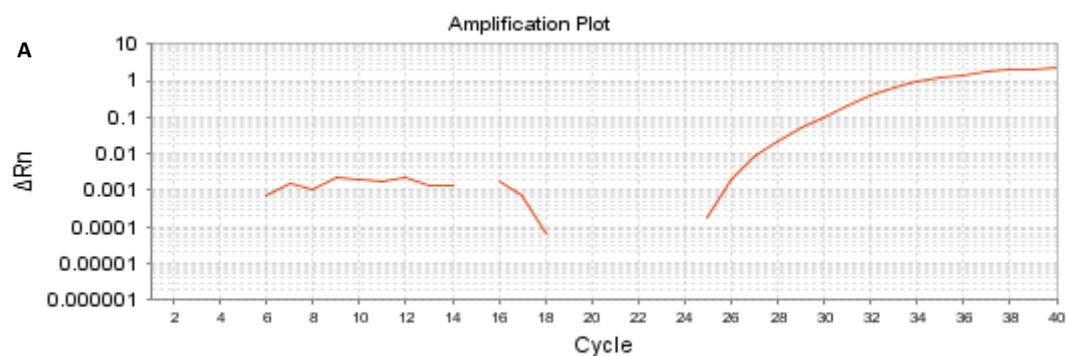


Figura 17. Gráfico representativo da reação de amplificação para o transcrito do gene ER. A: células murais da granulosa (Ct: 28,657); B: células do *cumulus oophorus* (Ct: 25,184).



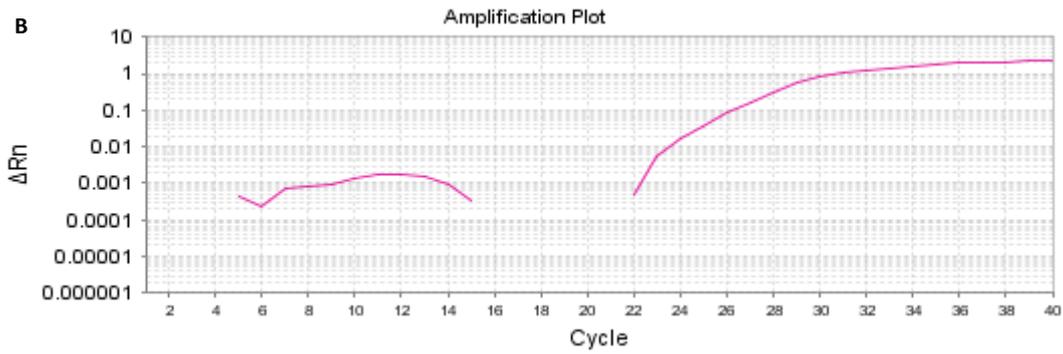


Figura 18. Gráfico representativo da reação de amplificação para o transcrito do gene FSHR. A: células murais da granulosa (Ct: 27,338); B: células do *cumulus oophorus* (Ct: 23,869).

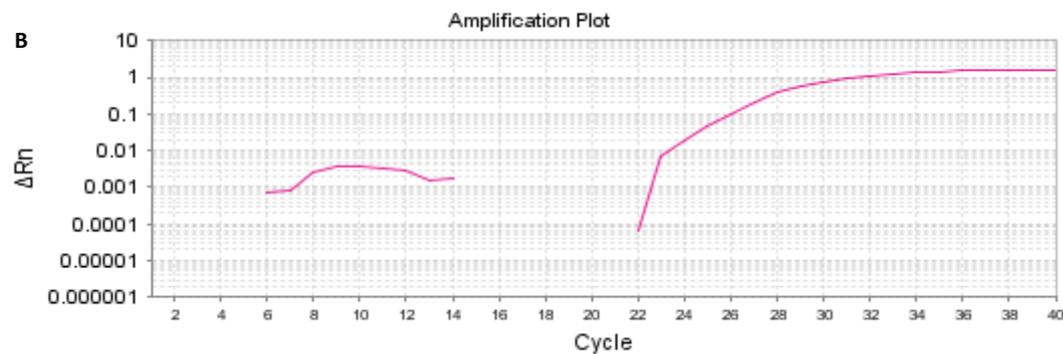
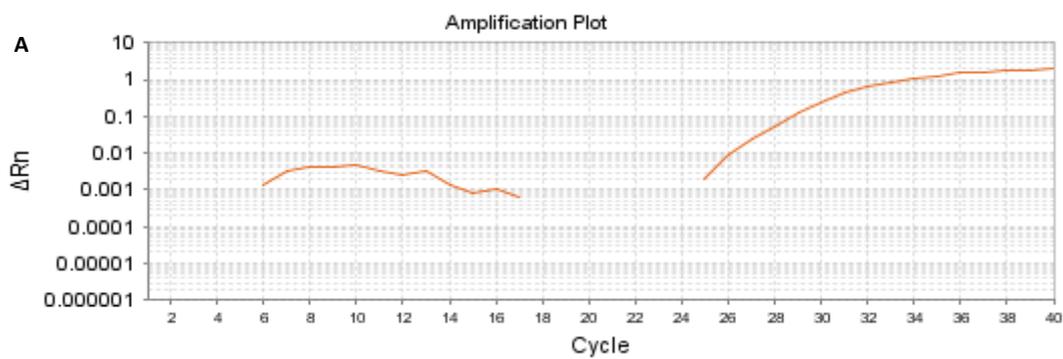


Figura 19. Gráfico representativo da reação de amplificação para o transcrito do gene HPRT1. A: células murais da granulosa (Ct: 27,704); B: células do *cumulus oophorus* (Ct: 23,618).

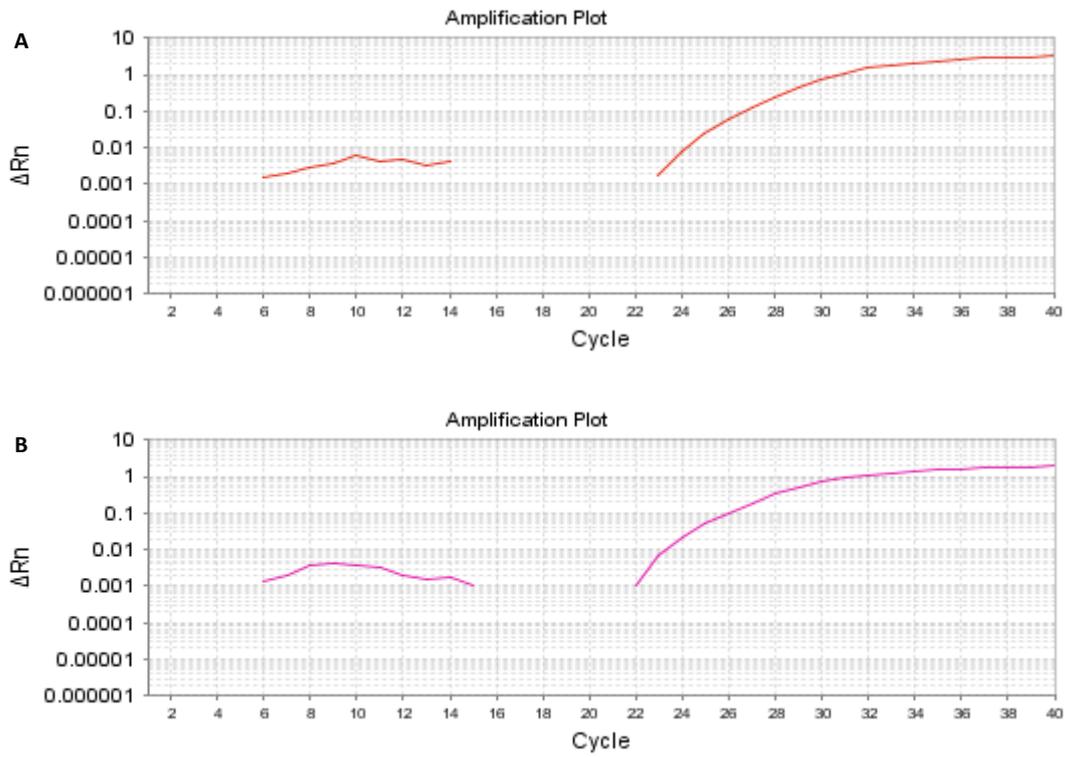


Figura 20. Gráfico representativo da reação de amplificação para o transcrito do gene VCAM1. A: células murais da granulosa (Ct: 25,846); B: células do *cumulus oophorus* (Ct: 24,102).