

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – FISILOGIA

Laura Silveira Ayres

**AÇÃO DE DIFERENTES ISOFORMAS DO FSH SOBRE O POTENCIAL DE
MEMBRANA DAS CÉLULAS DA GRANULOSA DO *CUMULUS OOPHORUS*
HUMANO**

Porto Alegre

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – FISILOGIA

Laura Silveira Ayres

**AÇÃO DE DIFERENTES ISOFORMAS DO FSH SOBRE O POTENCIAL DE
MEMBRANA DAS CÉLULAS DA GRANULOSA DO *CUMULUS OOPHORUS*
HUMANO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação como requisito parcial
à obtenção do Grau de Mestre em Ciências
Biológicas: Fisiologia.

Orientadora: BSc. MSc. PhD. Eloísa da Silveira Loss

Co-orientadora: BSc. MSc. PhD. Adriana Bos-Mikich

Porto Alegre

2013

CIP - Catalogação na Publicação

Ayres, Laura Silveira

Ação de Diferentes Isoformas do FSH sobre o Potencial de Membrana das Células da Granulosa do Cumulus Oophorus Humano / Laura Silveira Ayres. -- 2013.

82 f.

Orientador: Eloisa Da Silveira Loss.

Coorientador: Adriana Bos-Mikich.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Ação hormonal. 2. Granulosa. 3. Eletrofisiologia. 4. Hormônio Foliculoestimulante. I. Loss, Eloisa Da Silveira, orient. II. Bos-Mikich, Adriana, coorient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Aldo e Mara, e à minha irmã, Juliana, pelo constante apoio e dedicação e pelo auxílio para que eu realize os meus objetivos.

Ao Winícius, pelo amor, carinho e por estar sempre ao meu lado, incentivando as minhas conquistas.

À professora Eloísa Loss, pela oportunidade, auxílio, disponibilidade, pelos ensinamentos e por toda a dedicação.

À professora Adriana Bos-Mikich, pela oportunidade, pelos conselhos, ensinamentos, auxílio e pela dedicação constante.

À professora Ana Paula Jacobus, por idealizar e permitir que esse estudo se concretizasse, pelo apoio e ensinamentos.

À Dra. Gerta Frantz pelos conselhos, pelo apoio e auxílio através da coleta das células.

Aos colegas Fernanda Cavalari, Luciana Abreu, Gustavo Escott, Letícia Arruda, Natália Morelo e Alexandre Luz de Castro, pelo auxílio, por compartilhar as experiências e pelos momentos alegres do dia-a-dia.

À Carla Basso pelo auxílio com o banco de dados das pacientes.

Ao professor Guillermo Federico Wassermann, pela herança das pesquisas, do laboratório e pela transmissão de conhecimentos.

A Elsa Pires e Rita Alves Pereira pelo carinho.

Ao CNPq e PROPESQ-UFRGS pelo apoio financeiro.

LISTA DE ABREVIATURAS

Ω : ohm

μM : micromolar

2PN: dois pró-núcleos

$^{45}\text{Ca}^{2+}$: íon cálcio marcado radioativamente

AMH: hormônio anti-mülleriano

AMPc: adenosina monofosfato cíclica

ATP: adenosina trifosfato

C: celsius

$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$: glicose

Ca^{2+} : íon cálcio

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: cloreto de cálcio

CCDV: canais de cálcio dependentes de voltagem

CL: corpo lúteo

Cl^- : íon cloreto

COC: complexo *cumulus oophorus*

DNA: ácido desoxirribonucleico

FSH: hormônio folículo-estimulante

FSH-R: receptor do FSH

GnRH: hormônio liberador de gonadotrofinas

hCG: gonadotrofina coriônica humana

HHG: hipotálamo-hipófise-gônada

HVA: ativado por alta voltagem

Hz: hertz

I: corrente

ICBS: Instituto de Ciências Básicas da Saúde

ICSI: injeção intracitoplasmática de espermatozoides

K⁺: íon potássio

K⁺_{ATP}: canais de potássio sensíveis ao ATP

KCl: cloreto de potássio

LABENEX: Laboratório de Endocrinologia Experimental

LH: hormônio luteinizante

LH-R: receptor do LH

LVA: ativado por baixa voltagem

L-VDCC: canal de cálcio dependente de voltagem do tipo L

MΩ: mega ohms

M: molar

ME: matriz extracelular

MgCl₂: cloreto de magnésio

MII: metáfase II

mL: mililitros

mm: milímetro

mM: milimolar

mRNA: ácido ribonucleico mensageiro

ms: milissegundos

mV: milivolts

N: normal

nA: nano ampères

Na⁺: íon sódio

NaCl: cloreto de sódio

NaHCO₃: bicarbonato de sódio

NaOH: hidróxido de sódio

OSF: fatores secretados pelo oócito

PGCs: células germinativas primordiais

pH: potencial de hidrogênio

pI: ponto isoelétrico

PI3K γ : fosfatidil-inositol-3 cinase gama

PLC: fosfolipase C

s: segundos

SOP: síndrome dos ovários policísticos

TGF- β : fator de crescimento transformador β

TSH: hormônio estimulador da tireoide

TZP: processos citoplasmáticos trans-zonais

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UI: unidades internacionais

V: volts

α : alfa

β : beta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Controle hormonal do ciclo menstrual.....	19
Figura 1.2: Diagrama da Oogênese e da Foliculogênese.....	24
Figura 4.1: Placa com células aderidas ao fundo conectada à tubulação da câmara de perfusão e com os eletrodos de registro extracelular e intracelular.....	40
Figura 4.2: Células do <i>cumulus oophorus</i> humanas	41
Figura 4.3. Representação de um registro de controle de uma célula com potencial de membrana de -47,7 mV.....	42
Figura 5.1: Representação de um registro de uma célula típica em repouso com potencial de membrana de -47,7 mV.....	46
Figura 5.2: Representação de um registro de uma célula típica com a aplicação do FSH Ovino (1 μ M).....	47
Figura 5.3: Efeito do FSH Ovino (1 μ M) sobre o potencial de membrana das células do <i>cumulus oophorus</i> humanas comparado ao potencial de membrana basal em repouso.....	47
Figura 5.4: Efeito do FSH Ovino (1 μ M) sobre a resistência da membrana ao fluxo de íons.....	48
Figura 5.5: Representação de um registro de uma célula típica com a aplicação da Folitropina Beta (1 μ M).....	49
Figura 5.6: Efeito da Folitropina Beta (1 μ M) sobre o potencial de membrana das células do <i>cumulus oophorus</i> humanas comparado ao potencial de membrana basal em repouso.....	49
Figura 5.7: Efeito da Folitropina Beta (1 μ M) sobre a resistência da membrana ao fluxo de íons.....	50
Figura 5.8: Efeito do FSH Ovino (1 μ M) e da Folitropina Beta (1 μ M) sobre o potencial de membrana das células do <i>cumulus oophorus</i> humanas comparado ao potencial de membrana basal em repouso.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1: Composição salina e concentrações presentes nas soluções estoque e final de Hank's.....	37
Tabela 5.1: Comparação do potencial de membrana médio em repouso entre pacientes com fator masculino de infertilidade e pacientes com Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP).....	52
Tabela 5.2: Comparação do potencial de membrana médio em repouso entre pacientes com fator masculino de infertilidade e pacientes com fator feminino de infertilidade (exceto SOP).....	53
Tabela 5.3: Comparação do potencial de membrana médio em repouso entre pacientes com Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) e pacientes com outros fatores femininos de infertilidade (exceto SOP).....	54
Tabela 5.4: Comparação do potencial de membrana médio em repouso entre pacientes com menor faixa etária (20-35 anos) e pacientes com maior faixa etária (36-50 anos).....	55
Tabela 5.5: Comparação entre o número de oócitos imaturos e maduros (MII) coletados de pacientes com fator masculino de infertilidade com os coletados de pacientes com Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP).....	56
Tabela 5.6: Comparação entre o número de oócitos imaturos e maduros (MII) coletados de pacientes com fator masculino de infertilidade com os coletados de pacientes com fator feminino de infertilidade (exceto SOP).....	57
Tabela 5.7: Comparação entre o número de oócitos fertilizados (2PN) e não-fertilizados de pacientes com fator masculino de infertilidade com os de pacientes com Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP).....	58
Tabela 5.8: Comparação entre o número de oócitos fertilizados (2PN) e não-fertilizados de pacientes com fator masculino de infertilidade com os de pacientes com fator feminino de infertilidade (exceto SOP).....	59

Tabela 5.9: Comparação entre o número de embriões com melhor viabilidade (Graus 1 e 2) e com menor viabilidade (Graus 3, 4 e 5) das pacientes com fator masculino de infertilidade com os de pacientes com Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP).....60

RESUMO

As células do *cumulus oophorus* são firmemente conectadas umas às outras e ao oócito e participam ativamente do amadurecimento oocitário. Essas células apresentam abundância de receptores para o FSH. Os carboidratos da molécula do FSH podem terminar em resíduos de ácido siálico, permitindo que ele exista em numerosas isoformas. As isoformas mais ácidas do FSH contêm mais resíduos de ácido siálico. Os níveis dessas isoformas variam na fase folicular do ciclo menstrual e possuem diferentes capacidades de estímulo ovariano, sendo as menos ácidas mais potentes e de curta meia-vida plasmática. **Objetivo:** padronizar a técnica de registro eletrofisiológico intracelular para as células do *cumulus oophorus* humanas e verificar a ação de uma isoforma menos ácida do FSH, a Folitropina Beta (Puregon®) sobre o potencial de membrana dessas células, comparando com a ação de um FSH com menor grau de pureza e mais ácido (FSH ovino). **Metodologia:** o potencial de membrana foi registrado utilizando células de *cumulus oophorus* de pacientes encaminhadas ao procedimento de injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI). As células do *cumulus* foram cultivadas em placas de cultura com meio HTF (Life Global® - Guilford, CT USA) acrescido de 10% de Soro Sintético (SSS- Life Global® - Guilford, CT USA) por 24 a 48 horas. Durante o experimento eletrofisiológico, a placa foi perfundida com o fluxo de 1 mL/min de meio de Hank's acrescido de Hepes com 10% de Soro Sintético (SSS- Life Global® - Guilford, CT USA) mantido a 37° C. O registro intracelular foi realizado com microeletrodos preenchidos com KCl 3 M com uma resistência de 15 a 25 MΩ e acoplados a um eletrômetro. A resistência da membrana ao fluxo de cargas foi avaliada com a aplicação de pulsos quadrados de corrente (0,5 nA, 0,5 Hz e 200 ms) através do eletrodo de registro. Os hormônios testados (FSH ovino e Folitropina Beta) foram aplicados topicamente na placa. Para a análise estatística foi utilizado o teste de Anova de duas vias (seguido do pós-teste de Bonferroni) ou o teste exato de Fischer. **Resultados:** Foi realizada a padronização da técnica de registro eletrofisiológico para as células do *cumulus* e o potencial de membrana médio em repouso obtido foi de -34,02 mV, com desvio-padrão de ± 6,46 e erro-padrão da média de ± 2,04. A resistência média das membranas ao fluxo de íons foi de 16,5 MΩ, com desvio-padrão de ± 4,03 e erro-padrão da média de ± 1,8. A aplicação do FSH Ovino (1 µM) causou uma lenta despolarização, estatisticamente significativa

180 segundos após a aplicação do hormônio ($P < 0,01$). A aplicação da Folitropina Beta (Puregon® 1 μM) causou uma lenta despolarização, estatisticamente significativa 120 e 180 segundos após a aplicação do hormônio ($P < 0,001$). O padrão de despolarização foi semelhante entre as duas isoformas, sendo o efeito da Folitropina Beta mais imediato que o do FSH Ovino aos 120 segundos.

Conclusões: A partir da padronização da técnica de registro eletrofisiológico intracelular para as células do *cumulus oophorus* humanas, registrou-se o potencial médio de membrana em repouso (-34,02 mV) e a resistência média da membrana ao fluxo de íons (16,5 M Ω). O FSH Ovino (1 μM) e a Folitropina Beta (Puregon®) (1 μM) possuem uma ação despolarizante sobre o potencial de membrana das células do *cumulus*. Para o FSH Ovino, essa despolarização foi significativa 180 segundos após a aplicação do hormônio e para a Folitropina Beta, a despolarização foi significativa já aos 120 segundos após a aplicação. Há uma semelhança no padrão de despolarização produzida pelo FSH Ovino e pela Folitropina Beta. Um melhor entendimento das diferenças no funcionamento das isoformas do FSH pode proporcionar o desenvolvimento de melhores protocolos de tratamento para as pacientes, com menos efeitos colaterais. Esse conhecimento também pode ser utilizado para o aprimoramento das técnicas de maturação *in vitro* dos oócitos, que podem poupar as pacientes dos efeitos colaterais e dos altos custos da estimulação exógena com gonadotrofinas.

ABSTRACT

The *cumulus oophorus* cells are firmly connected to each other and to the oocyte and they take an important part on the oocyte maturation. These cells present numerous FSH receptors. The carbohydrates present in the FSH molecule may end in sialic acid residues, allowing FSH to exist in various isoforms. The more acidic isoforms present more sialic acid residues in their carbohydrate moieties. These isoforms exhibit fluctuations in the follicular phase of the menstrual cycle and possess different capabilities of ovarian stimulation, with the least acidic isoform having higher potency and lower plasmatic half-life. **Objective:** The aim of this study was to standardize the intracellular electrophysiology register technique to the human *cumulus oophorus* cells and to investigate the membrane potential action of a less acidic FSH isoform (Puregon™), comparing with the membrane action using a less purified, more acidic FSH isoform (sheep FSH). **Methods:** The membrane potential was registered in *cumulus oophorus* cells from patients assigned to the intracytoplasmic sperm injection (ICSI) technique. The *cumulus* cells were cultured in plates with HTF medium for 24 to 48 hours. During the electrophysiological experiment, the plate was superfused with 1 mL/min of Hank's medium supplemented with HEPES, maintained at 37° C. The intracellular register was performed with microcapillaries filled with 3 M KCl with resistance ranging between 15 and 25 MΩ, and coupled to an electrometer. The membrane resistance to the ion flow was assessed by the application of square current pulses (0,5 nA, 0,5 Hz and 200 ms) through the register electrode. The tested hormones (sheep FSH and Beta Follitropin Puregon™) were applied topically onto the plate. Statistical analysis was performed using the ANOVA test for repeated measures (with Bonferroni post-test) or Fischer's exact test. **Results:** the standardization of the electrophysiological register technique for the *cumulus* cells was successfully achieved and the mean resting membrane potential obtained was $-34,02 \pm 2,04$ mV (SEM). The mean resistance of the membrane to the ion flow was $16,5 \pm 1,8$ MΩ (SEM). The sheep FSH application (1 μM) led to a slow depolarization, statistically significant 180 seconds after the hormone application ($P < 0,01$). Beta Follitropin administration (1 μM) led to a slow depolarization, statistically significant 120 and 180 seconds after the hormone application ($P < 0,001$). The depolarization pattern was similar between both isoforms, being that Beta Follitropin's effect was more immediate than sheep

FSH's. **Conclusion:** With the electrophysiological intracellular register technique standardization to the human *cumulus* cells, the mean resting membrane potential was registered (-34,02 mV) and the mean membrane resistance to the ion flow was obtained (16,5 MΩ). Sheep FSH (1 μM) and Beta Follitropin (Puregon™) (1 μM) prompted a depolarizing action in the membrane potential of *cumulus* cells. Sheep FSH depolarization was significant at 180 seconds after the hormone application and Beta Follitropin depolarization was significant at 120 seconds after its application. Both isohormones have similar depolarization patterns. A better understanding of the differences in the action of both FSH isoforms shall make it possible to develop better hormone induction protocols in fertility treatments, with less side effects for the patients. This knowledge will potentially also make it possible to improve the *in vitro* oocyte maturation techniques, sparing patients of the hormone treatment side effects and of the high financial costs of the exogenous gonadotrophins administration.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	4
LISTA DE ABREVIATURAS	6
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABELAS.....	10
RESUMO	12
ABSTRACT.....	14
SUMÁRIO	16
1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Oogênese.....	18
1.2 Eixo Hipotálamo-Hipófise-Ovário	19
1.3 O Oócito e o Crescimento Folicular	22
1.4 Células do <i>Cumulus Oophorus</i>	27
1.5 FSH	28
1.6 Eletrofisiologia das Células da Granulosa	32
2 OBJETIVOS.....	35
2.1 Objetivo Geral	35
2.2 Objetivos Específicos.....	35
3 HIPÓTESES	37
4 METODOLOGIA.....	38
4.1 Materiais.....	38
4.2 Métodos	41
5 RESULTADOS	47
5.1 Padronização da Técnica de Registro Eletrofisiológico para as Células Humanas do <i>Cumulus Oophorus</i>	47

5.2 Registro do Potencial de Membrana e da Resistência da Membrana das Células do <i>Cumulus Oophorus</i> humanas em Repouso	48
5.3 Ação Eletrofisiológica do FSH Ovino (1 μ M) sobre o Potencial de Membrana das Células do <i>Cumulus Oophorus</i> Humanas	48
5.4 Ação Eletrofisiológica da Folitropina Beta (Puregon [®]) (1 μ M) sobre o Potencial de Membrana das Células do <i>Cumulus Oophorus</i> Humanas	50
5.5 Comparação da Resposta Eletrofisiológica do FSH Ovino (1 μ M) e da Folitropina Beta (1 μ M) sobre o Potencial de Membrana das Células do <i>Cumulus Oophorus</i> Humanas	52
5.6 Comparação do Potencial de Membrana Médio em Repouso das Células do <i>Cumulus Oophorus</i> Humanas com a Causa da Infertilidade	53
5.7 Comparação do Potencial de Membrana Médio em Repouso das Células do <i>Cumulus Oophorus</i> Humanas com a Idade das Pacientes	56
5.8 Comparação do Número de Oócitos Maduros e Imaturos Coletados das Pacientes que Tiveram Avaliação Eletrofisiológica das Células do <i>Cumulus</i> com a Causa da Infertilidade	57
5.9 Comparação do Número de Oócitos Fertilizados (com 2 pró-núcleos; 2PN) e Não-fertilizados das Pacientes que Tiveram Avaliação Eletrofisiológica das Células do <i>Cumulus</i> com a Causa da Infertilidade	59
5.10 Comparação do Número de Embriões com Melhor Viabilidade (Graus 1 e 2) e com Menor Viabilidade (Graus 3, 4 e 5) das Pacientes que Tiveram Avaliação Eletrofisiológica das Células do <i>Cumulus</i> com a Causa da Infertilidade	61
6 DISCUSSÃO.....	63
7 CONCLUSÕES.....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
ANEXO I - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	80

1 INTRODUÇÃO

1.1 Oogênese

O ovário dos mamíferos é um órgão heterogêneo, podendo conter folículos em diferentes estágios de desenvolvimento e corpo lúteo, bem como um estroma constituído de matriz extracelular, fibroblastos e elementos vasculares. O ovário é, acima de tudo, responsável pelo desenvolvimento, maturação e liberação de oócitos maduros para a fecundação. Ele também é responsável por sintetizar e secretar hormônios que são essenciais para o desenvolvimento folicular, ciclo menstrual, manutenção do trato reprodutivo e seu funcionamento, desenvolvimento das características sexuais secundárias femininas e funções metabólicas. As funções do ovário são integradas no processo continuamente repetitivo do desenvolvimento folicular, ovulação, formação e regressão do corpo lúteo.

A oogênese em mamíferos é caracterizada por três principais estágios de desenvolvimento: a iniciação da meiose no feto, a formação dos folículos durante o período perinatal e o término da maturação do oócito após o início dos ciclos reprodutivos femininos (LAWSON; HAGE, 1994; SAITOU; BARTON; SURANI, 2002). As células germinativas primordiais (PGCs) já podem ser detectadas no tecido extra-embrionário e, após a diferenciação, migram da sua origem extra-gonadal para a gônada em desenvolvimento, ou crista genital, onde elas interagem com as células somáticas gonadais, que determinarão sua maturação sexo-específica nos gametas funcionais. Logo após a diferenciação, as PGCs positivas para fosfatase alcalina que podem ser detectadas no epiblasto, se agrupam na base do alantóide, no mesoderma extra-embrionário. Em seguida, elas migram novamente para o endoderma embrionário ao longo do intestino primitivo até as cristas genitais, onde povoam os primórdios gonadais. A meiose se inicia no ovário fetal humano entre a décima-primeira e a décima-segunda semanas de gestação (AUSTIN, C R; SHORT, 1972; revisado por NICHOLAS *et al.*, 2009).

As PGCs do ovário fetal começam a entrar em meiose assincronizadamente e então progridem através dos estágios de leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno da prófase I da meiose (NICHOLAS *et al.*, 2009). A prófase se completa até o estágio de diplóteno logo após o nascimento na maior parte das espécies e então a

célula cresce acentuadamente. Os oócitos em seguida entram em uma fase de “repouso” prolongada, que acaba pouco antes da ovulação com a retomada da meiose pré-ovulatória nos folículos de Graaf. Durante toda a infância vários folículos sofrem atresia e, aqueles que permanecem viáveis até a puberdade, vão sendo selecionados ao longo da vida reprodutiva para a retomada da meiose e a ovulação (AUSTIN, C R; SHORT, 1972).

Conforme o oócito conclui a meiose I, os cromossomos se condensam e metade deles permanece no oócito, enquanto a outra metade é separada em uma pequena quantidade de citoplasma chamada de primeiro corpúsculo polar. Após a segregação dos cromossomos, o oócito, é detido na metáfase II da meiose II até ser fertilizado, ou então, degenera. A fusão entre um espermatozóide e a membrana plasmática do oócito, na fertilização, ativa a retomada da meiose II, onde as cromátides irmãs se segregam entre o oócito e o segundo corpúsculo polar. Uma vez completada a segunda divisão meiótica, as cromátides irmãs, juntamente com os cromossomos do espermatozóide, formarão o zigoto. A meiose ocorre desse modo na maior parte das espécies de mamíferos, inclusive em humanos (AUSTIN, C R; SHORT, 1972).

1.2 Eixo Hipotálamo-Hipófise-Ovário

O hipotálamo tem um papel central na regulação hormonal do sistema reprodutor. A sequência de eventos do ciclo menstrual é induzida pela ação de hormônios liberados pelo sistema hipotálamo-hipófise nos folículos ovarianos. O principal fator regulatório da função reprodutiva é o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), um decapeptídeo secretado pelo núcleo ventromedial do hipotálamo. O GnRH regula a síntese, o armazenamento e a mobilização das gonadotrofinas, bem como a sua liberação aguda. O mecanismo de ação do GnRH envolve a sua ligação a um receptor transmembrana nos gonadotrofos da adeno-hipófise, que leva a um aumento nos níveis de AMPc e à subsequente elevação da concentração do Ca^{2+} citoplasmático ou à ativação da proteína cinase C. Com uma meia-vida de 2-4 min, o GnRH alcança a adeno-hipófise muito rapidamente e induz a liberação do FSH e do LH. O FSH e o LH são liberados na corrente sanguínea de maneira coordenada no

intuito de promover o desenvolvimento dos folículos ovarianos, a ovulação e a manutenção do corpo lúteo (revisado por ARRAIS; DIB, 2006).

Uma vez que os folículos secundários passam a expressar receptores para o FSH, eles passam a estar sujeitos à regulação endócrina. Na presença do FSH, esses folículos começam a crescer ainda mais e se tornam folículos antrais. Sem o FSH, esses folículos entram em atresia. A teca, uma camada de células em torno do folículo, é formada no estágio de folículo pré-antral com duas camadas e, com a exposição a baixos níveis de LH, produz andrógenos. Os andrógenos são convertidos em estrógenos por uma enzima da superfamília do citocromo P450, CYP19 (aromatase) nas células da granulosa. O FSH induz a proliferação, produção de aromatase e aumenta o número dos seus receptores nas células da granulosa, levando assim a um microambiente com altas concentrações de estrogênio. Com o aumento nos níveis de estrogênio, o folículo antral segue se desenvolvendo. No estágio de folículo pré-antral, o folículo é um sistema de duas células (da granulosa e da teca) e duas gonadotrofinas (FSH e LH) (vide figura 1.1). Esses altos níveis de estrogênio fazem uma retroalimentação na adeno-hipófise e começam o processo de seleção de um folículo dominante. Os folículos que não estão no estágio apropriado e não são capazes de manter um microambiente rico em estrógeno sem a estimulação do FSH degeneram (revisado por HAWKINS; MATZUK, 2008).

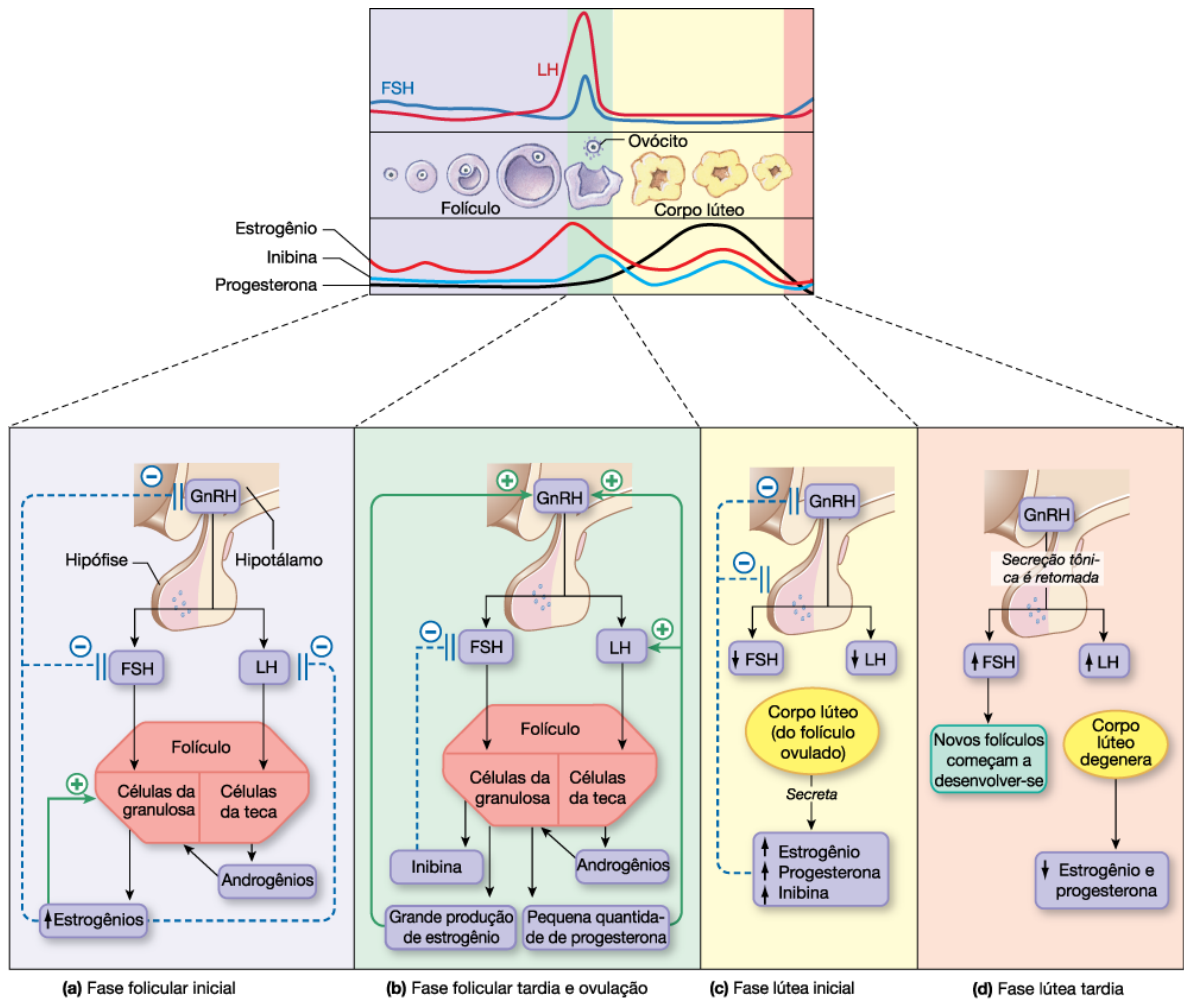


Figura 1.1: Controle hormonal do ciclo menstrual. Adaptado de Silverthorn (2010).

Apesar de a maioria dos folículos do conjunto em crescimento entrar em atresia, o folículo antral dominante alcança o estágio pré-ovulatório. O folículo que sobrevive a esse estágio é provavelmente mais responsivo (por ter uma expressão de receptores para o FSH relativamente maior) aos níveis de FSH sérico em diminuição, que ocorre através da retroalimentação negativa do estradiol e da inibição na adeno-hipófise (revisado por HAWKINS; MATZUK, 2008). Enquanto os níveis em crescimento do estradiol sérico suprimem a secreção de FSH pela hipófise, a produção aumentada de estradiol folicular aumenta a produção de LH pela hipófise, resultando no pico de LH. O folículo pré-ovulatório expressa receptores para LH em altas concentrações nas células da granulosa, que respondem ao pico de LH, o qual inicia uma cascata de eventos, levando à

retomada da meiose no oócito, expansão do *cumulus* e à ruptura do folículo (revisado por HAWKINS; MATZUK, 2008).

Durante a ovulação, o oócito é expulso do folículo com as células do *cumulus* circundando-o. As células foliculares restantes no ovário formam o corpo lúteo, que secreta progesterona. Durante a fase lútea, as células da granulosa-luteínicas também produzem inibina A, que atua como um hormônio supressor do FSH hipofisário, inibindo o crescimento de outros folículos (revisado por HAWKINS; MATZUK, 2008).

Se não houver fertilização e implantação do embrião, o corpo lúteo degenera e forma um tecido cicatricial. Quando os níveis de inibina e de progesterona caem com a regressão do corpo lúteo, é retomada a liberação do FSH, que não está mais sofrendo inibição. Na transição lútea-folicular, os níveis de FSH aumentam e um novo ciclo menstrual se inicia (revisado por HAWKINS; MATZUK, 2008).

Havendo fertilização e implantação, o corpo lúteo é mantido por estimulação da gonadotrofina coriônica humana (hCG) produzida pelo sincício-trofoblasto. O hCG também é um membro da família de hormônios glicoproteicos, junto com o FSH, o LH e o hormônio estimulador da tireoide (TSH), tendo a mesma cadeia α e se ligando aos mesmos receptores que o LH (revisado por HAWKINS; MATZUK, 2008).

1.3 O Oócito e o Crescimento Folicular

Antes da formação de um folículo ovariano, os oócitos estão presentes em agregados de células germinativas. A formação de folículos primordiais ocorre quando os oócitos são individualmente envoltos por células pavimentosas da granulosa (Figura 1.2). Esse é o primeiro estágio da foliculogênese e acontece durante a última metade do desenvolvimento fetal em humanos (AUSTIN, C R; SHORT, 1972). Um folículo primordial consiste em um oócito retido no estágio do diplóteno da meiose I circundado por várias células somáticas achatadas, as células

da granulosa. Acredita-se que o primeiro folículo primordial em fetos humanos seja formado em torno da 15^a–22^a semana de gestação e esse processo continua até logo após o nascimento (EDSON; NAGARAJA; MATZUK, 2009). De um pico de 6–7 milhões na 20^a semana de gestação, o número total de oócitos cai rapidamente para menos de 1 milhão ao nascimento, com aproximadamente 300.000 a 400.000 restantes por ovário no início da puberdade. Os oócitos que não estão envolvidos por células da granulosa nos folículos primordiais são perdidos, presumivelmente por apoptose (ADHIKARI; LIU, 2009). Nos mamíferos, a população de folículos primordiais serve como uma reserva ovariana de oócitos disponíveis durante a vida reprodutiva da fêmea (EDSON; NAGARAJA; MATZUK, 2009).

A foliculogênese pré-antral é caracterizada pelo crescimento do oócito, proliferação das células da granulosa e aquisição de uma camada adicional de células somáticas, a teca. A transição de folículo primordial para primário é marcada histologicamente por uma mudança morfológica nas células da granulosa de escamosas para cubóides. No crescimento folicular pré-antral uma coorte de folículos em desenvolvimento alcança o estágio de folículo secundário. Os folículos secundários contêm oócitos em estágios médios de crescimento circundados por duas ou mais camadas de células da granulosa. O crescimento dos folículos pré-antrais é dependente de fatores regulatórios autócrinos e parácrinos, mas parece ser independente de gonadotrofinas. Durante a foliculogênese pré-antral, a comunicação complexa bi-direcional entre o oócito e as células somáticas do folículo se torna mais aparente (AUSTIN, C R; SHORT, 1972). No estágio de folículo secundário, o oócito aumenta de tamanho e a zona pelúcida (camada glicoproteica que circunda o oócito) é formada por uma colaboração entre o oócito e as células da granulosa. As células da granulosa, que se tornaram cubóides, são o sítio da síntese dos componentes da matriz, incluindo a lâmina basal (BAKER; SPEARS, 1999).

O hormônio Anti-Mülleriano (AMH), que começa a ser detectado no ovário fetal com 36 semanas de gestação e tem sua máxima expressão nas células da granulosa de folículos pré-antrais e de pequenos folículos antrais (até 6 mm de diâmetro), tem um importante papel na regulação do número de folículos que crescem a partir do pool primordial. Além disso, o AMH também pode regular a seleção do folículo dominante da coorte de folículos sensíveis ao FSH

(BROEKMANS *et al.*, 2008). Isso se deve ao fato de ele ser expresso em folículos que foram recrutados do pool de folículos primordiais e que não foram selecionados para a dominância e de não ser expresso antes nem depois dessas etapas regulatórias. O AMH exerce um efeito inibitório sobre a sensibilidade dos folículos ao FSH. Acredita-se que, dependendo do seu estágio de desenvolvimento, cada folículo requer uma certa concentração de FSH para continuar o seu crescimento. Uma vez que o AMH afeta a sensibilidade ao FSH dos folículos, ele pode ter um papel na determinação dos folículos que serão selecionados ou removidos por atresia (FRANTZ *et al.*, 2006; VISSER; THEMEN, 2005).

Conforme o folículo segue o seu crescimento, ele adquire uma cavidade antral preenchida de fluido. A formação antral inicia quando a população de células da granulosa está em torno de 2.000 células em humanos. Nessa fase, múltiplos espaços pequenos preenchidos por fluido eventualmente coalescem para formar uma única cavidade antral, que separa duas populações de células da granulosa funcionalmente distintas. As recém formadas células murais da granulosa circundam a parede do folículo e são essenciais para a esteroidogênese e para a ovulação, enquanto as células da granulosa do *cumulus* circundam o oócito, promovendo seu crescimento e desenvolvimento (as células do pedúnculo podem possuir características de ambas) (HELLER; CAHILL; SCHULTZ, 1981). Esses dois tipos de células parecem ser definidos por gradientes opostos de FSH dentro e fora do folículo e fatores secretados pelo oócito dentro do folículo.

A transição de folículo pré-antral para antral marca uma mudança de uma regulação principalmente intra-ovariana da foliculogênese para extra-ovariana, conforme o eixo hipotálamo-hipófise-gônada (HHG) começa a funcionar (BAKER; SPEARS, 1999). Neste estágio, a regulação deixa de ser feita pelo AMH e passa a ser feita pelo FSH. O folículo maduro também tem muitas células da teca associadas. A ricamente vascularizada teca interna, a camada mais intimamente associada com a superfície convexa da lâmina basal, é prontamente identificável, pois suas células contêm proeminentes gotas de lipídeos. Além disso, há uma marcada mudança na composição da matriz extracelular na interface entre a teca interna e a externa (vide figura 1.2) (O`SHEA, 1971).

A sinalização das gonadotrofinas FSH e LH da adeno-hipófise para receptores nas células da granulosa e da teca estimula o crescimento dos folículos secundários e antrais e induz a expressão de enzimas esteroidogênicas. As enzimas esteroidogênicas expressas nas células da teca convertem o colesterol em andrógeno e este é então utilizado pelas células da granulosa, que expressam aromatase, para produzir estrógeno. Os oócitos alcançam a maturidade durante o estágio de folículo antral e o tempo do início do crescimento de folículo primário até a ovulação é aproximadamente 85 dias em humanos (AUSTIN, C R; SHORT, 1972).

A competência para o desenvolvimento do oócito é progressivamente adquirida após uma série coordenada de mudanças estruturais e funcionais no gameta e nas células do *cumulus* circundantes. No entanto, somente nos últimos dias de desenvolvimento folicular é que os oócitos adquirem a capacidade para passar pela progressão meiótica para a metáfase II (AUSTIN, C R; SHORT, 1972). A redistribuição dos grânulos corticais e mudanças no número de mitocôndrias, na sua atividade e distribuição ocorrem durante os estágios terminais da maturação oocitária *in vivo*. A maturação do oócito é ativada pelo pico pré-ovulatório das gonadotrofinas e, particularmente, pelos altos níveis de LH. As vias intracelulares ativadas pelo LH nas células foliculares resultam em uma mudança na produção de esteroides pelas células da granulosa de um ambiente predominantemente estrogênico para progestogênico e uma diminuição do AMP cíclico (AMPc) no oócito, que é induzida, ao menos em parte, pela perda de contato juncional entre as células do *cumulus* e o oócito. A produção de ácido hialurônico pelas células do *cumulus* ocorre em resposta ao pico de LH e leva à mucificação e expansão do *cumulus*. A perda de contato juncional entre o oócito e as células somáticas, por sua vez, ativa a retomada da meiose nos oócitos maduros (PICTON *et al.*, 2008). O oócito humano maduro em metáfase II (MII) tem aproximadamente 120 μ m de diâmetro (SERAFICA; GOTO; TROUNSON, 2005).

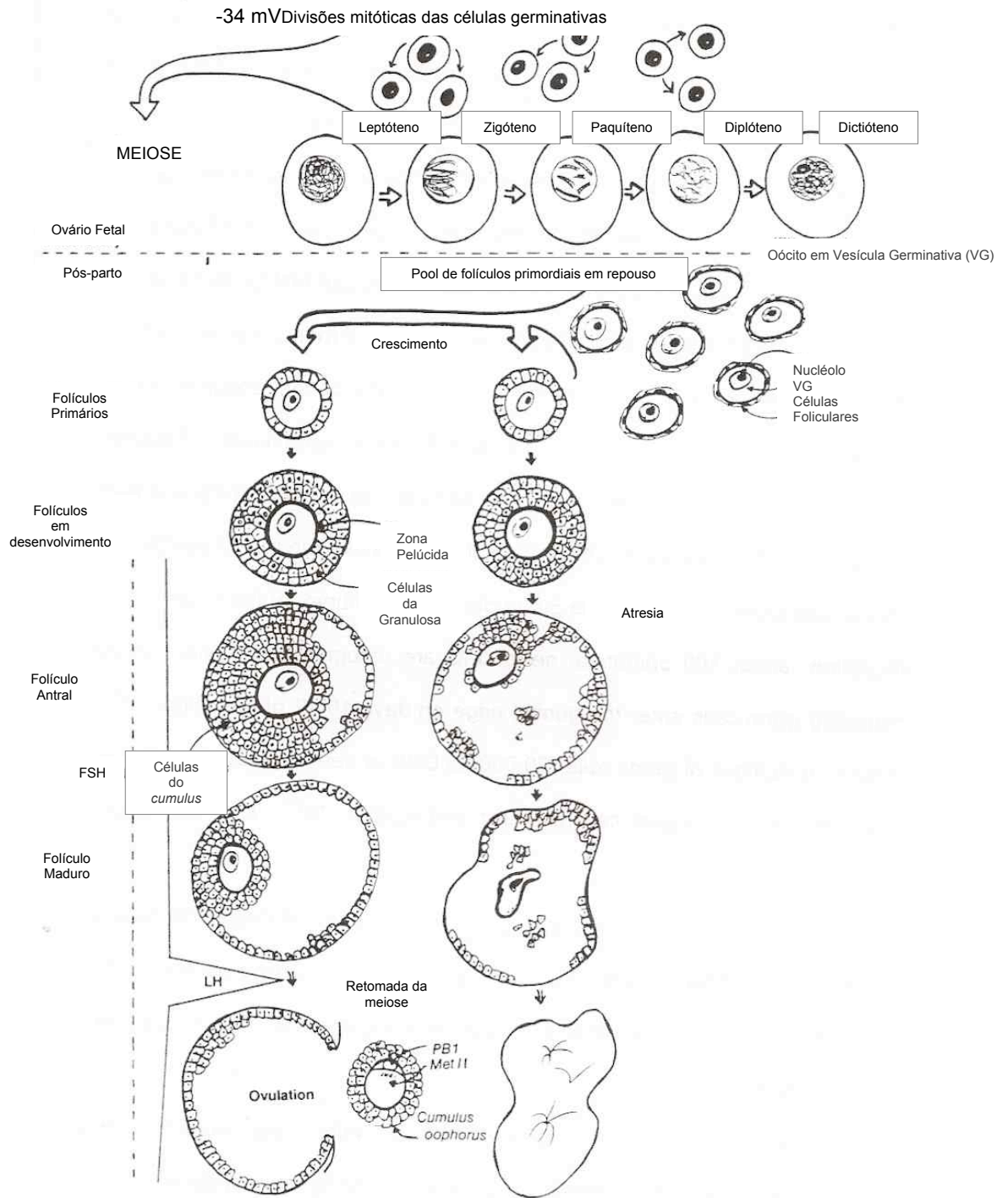


Figura 1.2: Diagrama da Oogênese e da Foliculogênese

Fonte: Bos-Mikich (1994)

1.4 Células do *Cumulus Oophorus*

O oócito pré-ovulatório é circundado por várias camadas celulares, conhecidas como as células do *cumulus* da granulosa, que são firmemente conectadas umas às outras e ao oócito (AUSTIN, C R; SHORT, 1972). As células do *cumulus* possuem processos citoplasmáticos trans-zonais (TZP), que penetram através da zona pelúcida e alcançam o oolema. As junções comunicantes (*gap junctions*) nas extremidades desses TZP (e entre as células do *cumulus*) permitem a transferência de moléculas de baixo peso molecular entre o oócito e as células do *cumulus* e também entre elas mesmas (SUTTON; GILCHRIST; THOMPSON, 2003).

Os metabólitos da glicose, os aminoácidos e os nucleotídeos são todos capazes de passar entre os oócitos e as células do *cumulus*. Além disso, as junções comunicantes participam na regulação meiótica do oócito, permitindo a passagem de pequenas moléculas regulatórias como o AMPc e as purinas (SUTTON; GILCHRIST; THOMPSON, 2003). Portanto, um entendimento dos fatores nutricionais, metabólicos ou hormonais que conferem ao oócito competência para se desenvolver, necessariamente, deve implicar numa análise do complexo *cumulus oophorus* (COC) como um todo.

Os oócitos dependem das células do *cumulus* para o metabolismo da glicose e para o fornecimento de piruvato para a produção de energia (BIGGERS; WHITTINGHAM; DONAHUE, 1967). As células do *cumulus* possuem um perfil de responsividade aos hormônios com uma expressão gênica diferente das células localizadas nas camadas murais da granulosa. Nos folículos pré-ovulatórios, as células murais e as do *cumulus* apresentam abundantes receptores de superfície para o FSH, mas a massa do *cumulus* e as células da granulosa mais próximas ao antro possuem maior resposta proliferativa ao FSH durante o crescimento folicular (ROBKER; RICHARDS, 1998). As células do *cumulus* são as mais diretamente expostas a fatores mitogênicos secretados pelo oócito. Os fatores secretados pelo oócito (OSF), pertencentes à superfamília Tgf- β , estabelecem um gradiente morfogenético que produz as características das células do *cumulus*, incluindo proliferação celular intensificada e a inibição da expressão dos receptores para LH

(LH-R) e para a progesterona (PR), bem da biossíntese de progesterona (GILCHRIST; RITTER; ARMSTRONG, 2004). Após o pico ovulatório de LH, as células do *cumulus* respondem com um padrão único de indução gênica que leva à produção e à estabilização de uma matriz extracelular que envolve o COC. Esse processo, conhecido como expansão do *cumulus*, ou mucificação, é dependente de uma cascata específica de sinais intracelulares e da expressão de genes da matriz extracelular no COC e tem um papel chave na ovulação e no subsequente sucesso da fertilização (RUSSELL; ROBKER, 2007).

As células do *cumulus* respondem rapidamente e mudam drasticamente após o pico de gonadotrofinas. A indução gênica nas células do *cumulus* em resposta ao pico de gonadotrofinas é potencialmente mediada pelo alto nível de FSH que acompanha o pico de LH. Nas mulheres, como em outras espécies de mamíferos, os níveis de FSH aumentam no meio do ciclo com uma cinética de tempo semelhante à do LH (RUSSELL; ROBKER, 2007).

Levando em conta o apresentado até aqui, existem evidências de que a interação coordenada entre as células do *cumulus* e o oócito durante o crescimento e a maturação é um ponto importante na preparação de oócitos viáveis e competentes para a fertilização e o subsequente desenvolvimento embrionário.

1.5 FSH

O FSH é essencial para a reprodução feminina e é um dos principais hormônios que afetam a função ovariana. Nas fêmeas, o FSH tem somente um alvo conhecido: as células da granulosa do folículo, nas quais a gonadotrofina inicia e medeia múltiplas funções, que, coletivamente, servem para a maturação oocitária e, conseqüentemente, para o sucesso reprodutivo. O FSH é requerido para o crescimento e desenvolvimento folicular de oócitos além de atuar em outros aspectos importantes que irão assegurar o sucesso reprodutivo. Essas ações complementares do FSH incluem a estimulação da esteroidogênese, resultando em expressão da aromatase e produção de estrógeno, a proliferação das células da

granulosa e a indução do aumento dos receptores para o hormônio luteinizante (LH-R) e para os seus próprios receptores (FSH-R) (ANDERSEN, 2002).

O FSH consiste em duas subunidades polipeptídicas diferentes conectadas não-covalentemente. A sequência proteica da subunidade α é comum a todos os hormônios glicoprotéicos da hipófise (FSH, LH e hormônio estimulante da tireóide, TSH) e à gonadotrofina coriônica humana (hCG), enquanto a subunidade β confere a cada hormônio a sua especificidade biológica. A subunidade α do FSH humano contém 92 aminoácidos com cadeias laterais de carboidratos ligadas por asparagina nas posições 52 e 78, enquanto a subunidade β contém 111 aminoácidos com carboidratos N-ligados nos resíduos de asparagina 7 e 24 (D'ANTONIO *et al.*, 1999). Separadamente, as duas cadeias não têm efeito e precisam ser associadas em uma estrutura dimérica para exibir atividade biológica. Em particular, a expressão da subunidade β está sujeita a numerosos processos regulatórios, que incluem mecanismos de *feedback* dos esteróides foliculares (estradiol e testosterona) e dos hormônios peptídicos foliculares, como a inibina e a ativina. Nos gonadotrofos da adeno-hipófise, cada subunidade β se combina com uma subunidade α , formando ligações covalentes na subunidade, mas não entre as subunidades. Antes de ser liberado na circulação, o FSH é glicosilado, devido à ligação de estruturas oligossacarídicas em dois sítios de glicosilação N-ligados presentes em cada subunidade. As estruturas oligossacarídicas ligadas ao esqueleto peptídico do FSH são altamente variáveis devido ao processamento pós-tradução do dímero no complexo de Golgi, gerando uma variedade de estruturas di-, tri- e até tetramericadas (ANDERSEN, 2002).

Os oligossacarídeos adicionados pós-tradução têm um papel-chave na determinação de várias propriedades funcionais do hormônio, incluindo o arranjo das unidades α e β , a triagem intracelular e a depuração metabólica. Além disso, essas estruturas também são importantes para determinar a afinidade de ligação ao receptor e a capacidade do hormônio de ativar o seu receptor e, eficientemente, gerar a sinalização intracelular. A composição e a estrutura da cadeia de carboidratos adicionados à molécula do FSH são muito variáveis (ULLOA-AGUIRRE *et al.*, 2003).

Cada ramificação de carboidratos pode ou não terminar em um resíduo de ácido siálico carregado negativamente, permitindo que o FSH exista em numerosas isoformas, com diferentes pontos isoelétricos (pI). Portanto, as isoformas mais ácidas contêm um número maior de resíduos de ácido siálico, refletindo um padrão mais complexo de ramificação, enquanto as isoformas menos ácidas têm menos resíduos de ácido siálico, frequentemente refletindo uma ausência de ramificações nas moléculas de carboidratos. As isoformas podem ser separadas de acordo com a sua carga elétrica; a maioria delas tem um ponto isoelétrico entre 4,5-5,0, variando entre 3,5-7,0 (ANDERSEN, 2002).

O conteúdo dos resíduos de ácido siálico afeta o metabolismo hepático do FSH. A taxa de depuração das isoformas do FSH com um alto número de resíduos de ácido siálico (isoformas mais ácidas) é menor quando comparada com as isoformas menos ácidas, com um menor conteúdo de resíduos de ácido siálico. Consequentemente, a meia-vida plasmática das isoformas menos ácidas é consideravelmente menor que aquela das mais ácidas (ANDERSEN *et al.*, 2001).

Na circulação, a composição de isoformas do FSH exhibe flutuações características na fase folicular, com uma mistura de isoformas mais ácidas prevalecendo na fase folicular inicial e mudando gradualmente para uma mistura de isoformas menos ácidas conforme a ovulação se aproxima. A concentração de estradiol circulante parece atuar como o principal regulador da mistura de isoformas liberadas da hipófise. O estradiol regula para baixo a expressão na adeno-hipófise de algumas glicosil-transferases, incluindo o mRNA da α -2,3-sialil-transferase, que codifica uma enzima responsável pela incorporação de resíduos de ácido siálico na molécula de FSH e, portanto, estimula a secreção de isoformas menos ácidas. Além disso, várias condições endocrinológicas caracterizadas por altas concentrações de estradiol são relacionadas com a liberação de isoformas menos ácidas. Em contraste, condições caracterizadas por baixas concentrações circulantes de estradiol são associadas com a presença de isoformas mais ácidas de FSH (ex: na urina de mulheres pós-menopáusicas) (ANDERSEN, 2002).

No soro de crianças pré-puberais, em pacientes hipogonadais e em mulheres durante a fase folicular, isoformas mais ácidas, altamente sialiladas, com meias-

vidas longas *in vivo* e baixa potência biológica *in vitro* são predominantes. Em contraste, durante a puberdade, na terapia com hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e no pico de gonadotrofinas na metade do ciclo em mulheres, são encontradas as isoformas com menos resíduos de ácido siálico (menos ácidas), com baixas meias-vidas *in vivo* e alta atividade biológica *in vitro*. Baseado nas considerações acima, pode-se assumir que as isoformas mais ácidas estimulam o processo de maturação folicular de uma forma mais duradoura, porém, menos intensa, enquanto as isoformas menos ácidas parecem propiciar um estímulo curto, mas potente, necessário para a indução da puberdade ou da ovulação (D'ANTONIO *et al.*, 1999).

O efeito biológico das isoformas de FSH menos ácidas liberadas no período peri-ovulatório é, portanto, estimulado por uma atividade biológica presumivelmente aumentada, mas contraposto por uma depuração relativamente rápida (ANDERSEN *et al.*, 2001).

Os folículos em crescimento parecem expressar FSH-R em todos os tipos de células da granulosa, incluindo as células murais e as células do *cumulus* de folículos pré-ovulatórios. Isso contrasta com o padrão de expressão de LH-R das células da granulosa, que somente ocorre em folículos pré-ovulatórios e é confinada às células murais da granulosa, enquanto as células do *cumulus* não os têm ou os expressam em muito pequenas concentrações. Conseqüentemente, na última parte da fase folicular, a função das células do *cumulus* regulada por gonadotrofinas parece ser feita principalmente pela ação do FSH (ANDERSEN, 2002).

Alguns estudos *in vitro* demonstraram que a adição de FSH ao meio de cultura promove a manutenção da viabilidade e do crescimento dos folículos pré-antrais em caprinos, bem como a formação do antro em diferentes espécies (caprinos: THOMAS *et al.*, 2005; EPPIG, 2001; murinos: MCGEE *et al.*, 1997; humanos: WRIGHT *et al.*, 1999; bovinos: GUTIERREZ *et al.*, 2000). No entanto, o efeito do FSH na cultura folicular *in vitro* depende de diferenças entre alguns fatores, como espécie, grau de pureza das preparações comerciais de FSH e diferentes sistemas de cultura *in vitro*. Além disso, foi proposto que não só a quantidade, mas também a

qualidade e a fonte do FSH, em termos de isoformas e pureza, têm um importante papel na fase folicular inicial (MAGALHÃES *et al.*, 2009).

1.6 Eletrofisiologia das Células da Granulosa

Poucos estudos têm sido realizados analisando a eletrofisiologia das células da granulosa. Recentemente foi identificada nessas células uma corrente de K^+ sensível a Ca^{2+} (TRAUT *et al.*, 2009). Também foi identificada a presença de canais de Cl^- funcionais sensíveis ao volume que são ativados pela gonadotrofina coriônica humana (hCG) e são críticos para as mudanças no potencial de membrana, para o influxo de Ca^{2+} e para a produção de progesterona (OLIVERO *et al.*, 2008). No estudo de Bulling *et al.* (2000), foi identificado um canal de Na^+ ativado por voltagem em células da granulosa luteinizadas, com expressão sob controle inibitório do hCG.

Outro estudo identificou dois tipos de correntes iônicas através de canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes em células da granulosa humanas. As características biofísicas e farmacológicas dessas correntes indicam que elas ocorrem através de canais de Ca^{2+} do tipo T (ativados por baixas voltagens – “low voltage activated”, LVA) e do tipo L (ativados por altas voltagens – “high voltage activated”, HVA) (PLATANO *et al.*, 2005). Além disso, também foi identificada uma corrente de Ca^{2+} através de canais de Ca^{2+} tipo L em células de *cumulus oophorus* ovinas (BONI *et al.*, 2008). Ainda, no trabalho de Flores *et al.* (1998), houve um aumento na concentração de Ca^{2+} em células individuais da granulosa de suínos coletadas de um mesmo folículo de Graaf induzido pelo LH. O percentual de células que responderam ao LH aumentou com a maturação folicular, indicando uma potencial importância do mecanismo de sinalização da fosfolipase-C e do aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular nos estágios mais avançados da diferenciação celular. Outro estudo, com células humanas de corpos lúteos demonstrou a presença de canais de potássio sensíveis ao ATP (K^+_{ATP}) na geração de potenciais de membrana (KUNZ; RICHTER; MAYERHOFER, 2006). Já o trabalho de Flores *et al.* (1990), relaciona a ação do FSH com o aumento de Ca^{2+} intracelular em células da granulosa de suínos.

Nenhum desses trabalhos, porém, com exceção de Flores *et al.* (1990), relaciona a ação do FSH com alterações de corrente iônica nas células da granulosa e também não há ainda estudos analisando essa interação em células do *cumulus oophorus* humanas. Estudos eletrofisiológicos da ação do FSH em sua célula-alvo em machos, as células de Sertoli, estão bem mais adiantados. Demonstrou-se uma ação rápida do FSH sobre o potencial de membrana das células de Sertoli de ratos imaturos, com 10 a 12 dias. Essa ação se caracteriza por uma rápida fase de hiperpolarização relacionada com os canais K^+_{ATP} seguida por uma despolarização relacionada aos canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L (L-VDCC). Esses estudos sugerem que a via de ação do FSH nas células de Sertoli envolve a ativação por uma proteína G_i da fosfatidil-inositol-3 cinase γ (PI3K γ) através de suas subunidades $\beta\gamma$, que estimula uma corrente (entrada) de Ca^{2+} através dos L-VDCC, despolarizando a membrana e ativando o sistema A para o transporte de aminoácidos neutros (LOSS; JACOBUS; WASSERMANN, 2007; JACOBUS; LOSS; WASSERMANN, 2010).

Baseados nesses estudos anteriores, o objetivo deste trabalho foi padronizar a técnica de registro eletrofisiológico para as células do *cumulus oophorus* humanas de forma a detectar possíveis modificações induzidas pelo FSH ovino e pelo FSH altamente purificado, Folitropina Beta (Puregon®), no potencial de membrana dessas células.

Estudos com as isoformas do FSH demonstraram que o desenvolvimento folicular normal e a formação de oócitos saudáveis dependem de um equilíbrio da distribuição das isoformas em momentos específicos da maturação folicular (ANDERSEN, 2002; D'ANTONIO *et al.*, 1999; NAYUDU *et al.*, 2002; ULLOA-AGUIRRE *et al.*, 2003). Além disso, apesar das preparações de FSH derivadas da urina de mulheres pós-menopáusicas terem sido utilizadas com sucesso por muitos anos nos tratamentos de infertilidade, as isoformas de hFSH recombinante têm tido melhores resultados e maior segurança para a utilização (ANDERSEN; WESTERGAARD; WELY, 2004; HUGUES, 2001). Portanto, um melhor entendimento das diferenças no funcionamento das isoformas do FSH pode proporcionar o desenvolvimento de melhores tratamentos para as pacientes, com menos efeitos colaterais. Outra importante aplicação desses conhecimentos é para o

aprimoramento das técnicas de maturação *in vitro* dos oócitos, que podem poupar as pacientes dos efeitos colaterais e dos altos custos da estimulação exógena com gonadotrofinas. Isso será possível através de mais estudos sobre as ações desses iso-hormônios em suas células-alvo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Padronizar a técnica de registro eletrofisiológico intracelular para as células de *cumulus oophorus* humanas e verificar a ação de uma isoforma menos ácida do FSH (Folitropina Beta) sobre o potencial de membrana dessas células, comparando com a ação de um FSH com menor grau de pureza e mais ácido (FSH ovino) rotineiramente utilizado no Laboratório de Endocrinologia Experimental do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) - UFRGS.

2.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer uma metodologia que permita:
 - Verificar qual o meio de perfusão ideal para a realização da técnica de registro eletrofisiológico e qual a placa a ser utilizada com as células do *cumulus oophorus* humanas.
 - Padronizar o modo de transporte das células entre o laboratório de Reprodução Assistida Humana e o Laboratório de Endocrinologia Experimental (UFRGS).
 - Verificar qual a resistência do eletrodo necessária para a realização da técnica.
- Determinar o potencial de membrana e a resistência da membrana ao fluxo de íons em repouso para as células do *cumulus* .
- Avaliar a resposta eletrofisiológica das células do *cumulus oophorus* humanas ao FSH ovino (Sigma[®]), com menor grau de pureza.

- Avaliar a resposta eletrofisiológica a uma isoforma menos ácida do FSH rotineiramente utilizada para estimulação ovariana nas técnicas de reprodução humana assistida, Puregon® (Folítropina Beta) e comparar essa resposta com aquela observada com o uso do FSH ovino.
- Verificar se algumas características das pacientes como idade, causa da infertilidade e características oocitárias e embrionárias estão associadas com os resultados encontrados na eletrofisiologia.

3 HIPÓTESES

H_0 – A Folitropina Beta (isoforma menos ácida) tem a mesma ação no potencial de membrana das células do *cumulus oophorus* que o FSH ovino (mistura de isoformas).

H_1 - A Folitropina Beta (isoforma menos ácida) tem uma ação mais rápida e mais potente no potencial de membrana das células do *cumulus oophorus* que a ação do FSH ovino (mistura de isoformas).

4 METODOLOGIA

4.1 Materiais

4.1.1 Células Humanas do *Cumulus Oophorus*

Foram utilizadas células humanas de *cumulus oophorus* provenientes do Centro de Pesquisa e Reprodução Humana Nilo Frantz e do Centro de Fertilidade e Reprodução Assistida Pro Ser, ambos situados na cidade de Porto Alegre – RS e conveniados com esta Universidade. As células foram obtidas de pacientes que foram encaminhadas para o procedimento de Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI). Todas as pacientes participantes do estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido em anexo (Anexo 1), aprovado pelo Comitê de Ética desta Universidade (processo número 20173), antes do início dos procedimentos. Após a coleta dos oócitos, entre o 10^o e o 14^o dia do ciclo menstrual, os complexos *cumulus*-oócitos foram desnudados a partir da exposição por 30 segundos à hialuronidase (80UI/mL Irvine[®] - Santa Ana, CA USA) para retirar as células mais externas. O restante das células foi retirado mecanicamente, através de consecutivas pipetagens com pipeta *pasteur* estirada em fogo, em meio HTF-Hepes (Irvine[®] - Santa Ana, CA USA) acrescido de 10% de Soro Sintético (SSS- Life Global[®] - Guilford, CT USA). As células do *cumulus* isoladas, na concentração de 1 a 8 milhões/mL, foram então transferidas a placas de cultura com poço central (60x15mm Falcon[®] - San Jose, California USA) e cultivadas em meio HTF (Life Global[®] - Guilford, CT USA) acrescido de 10% de Soro Sintético (SSS- Life Global[®] - Guilford, CT USA) por 24 a 48 horas. Após esse período de cultivo, as placas contendo as células foram transportadas para o laboratório de eletrofisiologia, em 30 minutos, no meio HTF-Hepes em caixa térmica forrada com bolsas térmicas de gel Mercur[®] (Santa Cruz do Sul – RS, Brasil) aquecidas a 37^o C. No laboratório de eletrofisiologia, as células foram mantidas em estufa a 37^o C por aproximadamente duas horas durante o preparo da solução de perfusão e dos eletrodos. Foram utilizadas células de 46 pacientes. As pacientes tiveram uma média de 12,37 oócitos coletados com desvio-padrão de 6,21.

4.1.2 Solução Tampão Hank's

Foi utilizada a solução tampão Hank's como meio de perfusão em todos os experimentos, preparada imediatamente antes da realização dos experimentos. Todos os reagentes eram de pureza "pró-análise" (P.A.) da E. Merck (Darmstadt, Alemanha). O preparo da solução foi realizado a partir de soluções-estoque conforme tabela 4.1.

Tabela 4.1: Composição e concentrações presentes nas soluções estoque e solução Hank's.

	Concentração das Soluções Estoque	Concentração Final da Solução Hank's
	mM	mM
NaCl Cloreto de Sódio	145	0,0029
KCl Cloreto de Potássio	34,3	4,6
NaHCO₃ Bicarbonato de Sódio	100	5
MgCl₂ Cloreto de Magnésio	32	1,6
CaCl₂ · 2H₂O Cloreto de Cálcio	32	1,6
C₆H₁₂O₆ Glicose	110	5,5
Hepes	-	10

Para o preparo da solução Hank's, foram adicionados volumes iguais de cada solução estoque, acrescentando-se por último o cloreto de cálcio e a glicose, nesta ordem. O HEPES era pesado separadamente e não foi mantido em solução estoque para evitar a proliferação de microorganismos. A solução era então completada até seu volume final com água destilada, para obter as concentrações finais descritas na tabela 3.1. O pH era medido com um pHmetro e ajustado com a adição, se necessário, de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N até atingir um pH de 7,4. A solução assim obtida era mantida em banho maria a 37° C e era bombeada para a placa através de uma bomba peristáltica (*Rainin Instrument Co. Inc. – Dynamax, modelo RP-1*).

4.1.3 Hormônios testados

a) FSH ovino (Sigma® - St. Louis, MO USA): 50 UI por frasco. Utilizou-se uma concentração final de 1 µM nos experimentos.

b) Puregon® (Merck/Schering-Plough - North Wales, PA USA) (Folitropina Beta): Foi utilizada a apresentação comercial injetável, ampola contendo 625 UI/ mL em solução de cloreto de sódio. Utilizou-se uma concentração final de 1 µM nos experimentos.

4.2 Métodos

4.2.1 Técnica Eletrofisiológica de Registro Intracelular

4.2.1.1 *Preparação das Células do Cumulus Oophorus Humanas*

Após serem transportadas ao laboratório de eletrofisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde – UFRGS e permanecerem em estufa a 37° C por aproximadamente 2 horas, as células do *cumulus oophorus* humanas foram posicionadas em um microscópio invertido (*Nikon- Inverted Microscope Diaphot – TMD*) e conectadas à tubulação de uma bomba de perfusão, conforme figura 4.1. A placa contendo as células foi perfundida com o fluxo de 1 mL/min de meio Hank's acrescido de Hepes mantido a 37° C em banho maria (DeLeo® & Cia Ltda. - Porto Alegre, RS Brasil).

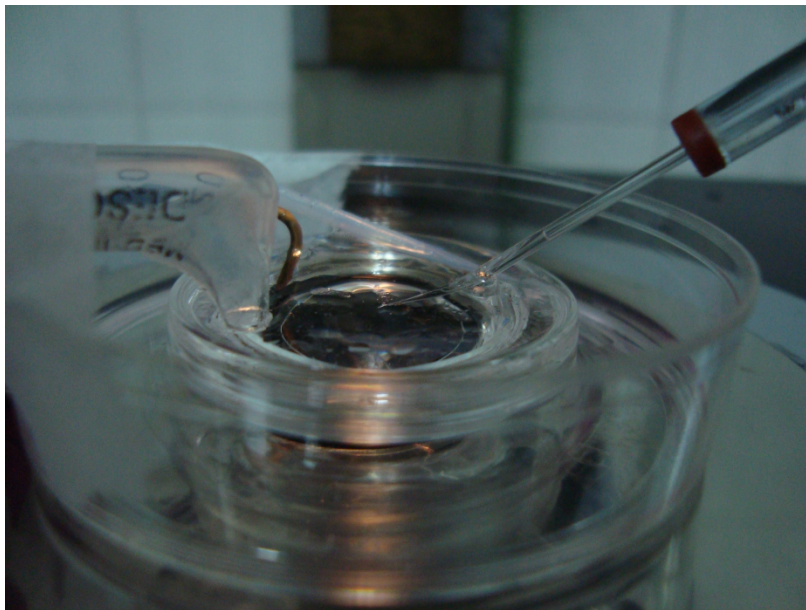


Figura 4.1: Placa com células aderidas ao fundo conectada à tubulação da câmara de perfusão e com os eletrodos de registro extracelular e intracelular.

4.2.1.2 Registro Intracelular

O potencial de membrana das células do *cumulus* foi registrado com microeletrodos preenchidos com KCl 3 M com uma resistência de 15 a 25 M Ω (vide figura 4.2). O microeletrodo foi conectado a um amplificador intracelular (Intra 767, WPI Inc UK) e o sinal era monitorado por um osciloscópio (Tektronix, 2 Channel Digital Oscilloscope TDS 210). Os traçados gerados pelo osciloscópio foram adquiridos e armazenados em um computador através de um programa de interface (Wavestar Lite Version 1.0.10). Para avaliar a resistência da membrana ao fluxo de cargas, foram aplicados pulsos quadrados de corrente (0,5 nA, 0,5 Hz e 200 ms) através do eletrodo de registro por um estimulador de pulso de corrente (S48K Astromed, Grass instruments). Os hormônios testados (FSH ovino e Folitropina Beta) foram aplicados topicamente (com micropipeta automática) ao meio de perfusão contido na placa, após a estabilização do potencial de repouso da célula por pelo menos 2 minutos. A variação do potencial da membrana e da resistência da

membrana foi registrada com o FSH ovino e a Folitropina Beta. O FSH ovino foi aplicado em 4 células de diferentes pacientes e a Folitropina Beta foi aplicada em 5 células de diferentes pacientes.

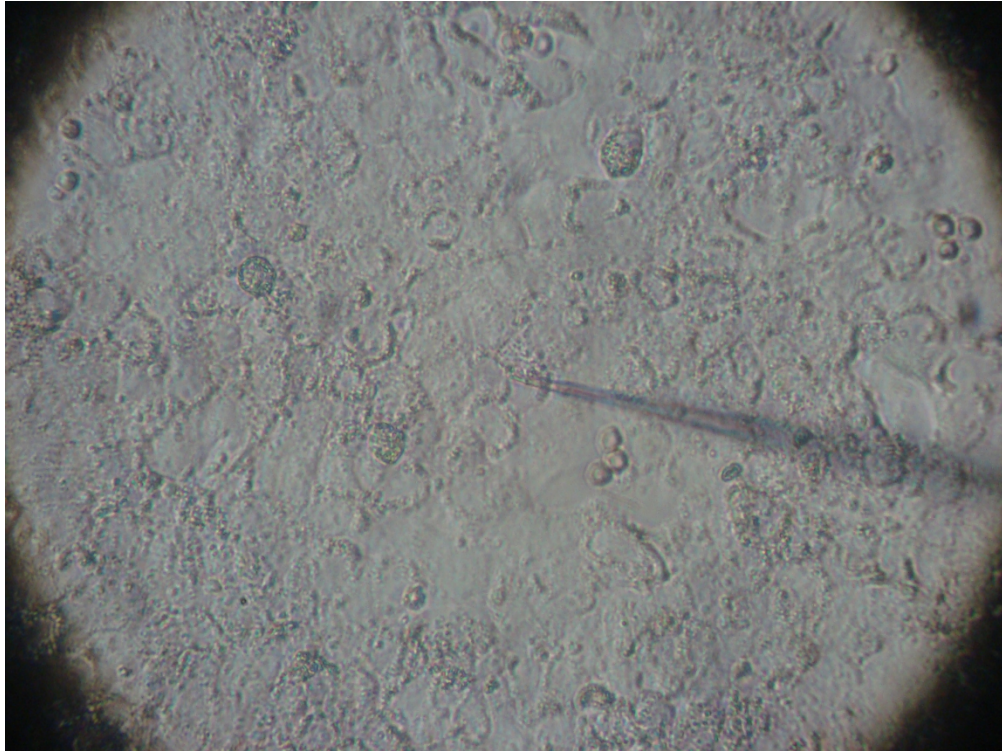


Figura 4.2: Células do *cumulus oophorus* humanas aderidas ao fundo de uma placa de poço central, vistas ao microscópio invertido em aumento de 100x com microeletrodo sendo inserido na membrana de uma célula.

4.2.1.3 Cálculo da Resistência da Membrana

A resistência da membrana foi calculada utilizando-se a lei de Ohm como segue abaixo:

I = corrente (A- ampére)

V = voltagem (V- volts)

R= resistência (Ω - ohms)

LEI DE OHM:

$$I=V/R \Rightarrow R=V/I$$

Resistência da membrana = Voltagem registrada no osciloscópio / pulso de corrente aplicado.

A voltagem registrada no osciloscópio está relacionada ao valor de resistência correspondente ao traçado vertical, obtido no registro do potencial de membrana da célula em decorrência do pulso de corrente aplicado (vide figura 4.3). O pulso de corrente aplicado foi de 0,5nA.



Figura 4.3. Representação de um registro de controle de uma célula do *cumulus oophorus* com potencial de membrana de -36,29 mV. Os traços verticais correspondem à resistência da membrana pela aplicação de pulsos de 0,5nA.

4.2.1.4 Banco de Dados das Pacientes

Para a realização da análise dos dados das pacientes que tiveram as células do *cumulus oophorus* avaliadas na eletrofisiologia, foi elaborado um banco de dados com o código do ciclo de estimulação ovariana da paciente; idade; causa da

infertilidade; número de oócitos obtidos em meiose II (MII) que foram submetidos à injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI); número de oócitos fertilizados (com 2 pró-núcleos; 2PN); número de embriões em graus de 1 a 5, sendo os de maior viabilidade os de grau 1 e 2 e os de menor viabilidade os de grau 3 a 5 e potencial médio de membrana das células do *cumulus* em repouso.

4.2.2 Análise Estatística

Para os experimentos de registro intracelular, os tratamentos foram repetidos pelo menos 4 vezes. O cálculo amostral foi realizado com software Winpepi versão 9 utilizando poder amostral de 80% e um intervalo de confiança de 95%. Para a análise estatística foi utilizado o teste de Anova para medidas repetidas, seguido do pós-teste de Bonferroni e o teste T de Student para a comparação entre dois grupos. Para a análise dos dados das pacientes e verificação de correlação com o potencial de membrana em repouso foi utilizado o teste exato de Fischer. Os cálculos foram feitos utilizando o programa InStat, versão 3.01, 32 bit para Windows® (Graphpad Software, San Diego, Califórnia, USA). Os testes específicos utilizados em cada experimento estão citados nos resultados. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4.2.3 Biossegurança

Durante a execução dos experimentos, os pesquisadores envolvidos utilizaram luvas de procedimento e jalecos como forma de proteção individual.

O descarte de resíduos não-tóxicos, como soluções salinas que não foram utilizadas, foi feito em esgoto comum. Os resíduos químicos dos experimentos foram acondicionados em frascos identificados e encaminhados para o Centro de Gestão e

Tratamento de Resíduos Químicos da UFRGS para o correto procedimento de descarte. Todo material biológico e restos celulares foram separados em sacos brancos e recolhidos por empresa especializada.

4.2.4 Considerações Éticas

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS (CEP/UFRGS) sob o número 20173, aprovado em 07/04/2011.

5 RESULTADOS

5.1 Padronização da Técnica de Registro Eletrofisiológico para as Células Humanas do *Cumulus Oophorus*

Inicialmente, foi feita uma padronização das placas de cultura para a melhor adaptação à bomba peristáltica e aos eletrodos. A placa que melhor se adequou foi a com poço central (60x15mm Falcon® - San Jose, California USA). Em seguida, padronizou-se o meio HTF (Life Global® - Guilford, CT USA) para o cultivo nos laboratórios de reprodução humana assistida humana. O melhor tempo de cultura para garantir a aderência das células ao fundo da placa foi entre 24 e 48 horas.

O passo seguinte foi a padronização do transporte das células até o laboratório de endocrinologia experimental (LABENEX – UFRGS). Para isto, optou-se pela utilização de um meio HTF acrescido de HEPES da Irvine® (Santa Ana, CA USA) nas placas e por caixa térmica forrada com bolsas térmicas de gel Mercur® aquecidas a 37° C para garantir a manutenção da temperatura e evitar ao máximo a movimentação das placas dentro da caixa. Esse transporte foi realizado em 30 minutos. Ao chegar ao LABENEX, optou-se pela manutenção das células em estufa a 37° C durante o preparo das soluções, preservando assim, as suas condições ideais de temperatura.

Outro passo da padronização foi a escolha do meio Hank's com HEPES para a perfusão das placas durante a realização da avaliação da eletrofisiologia das células. Esse meio foi sempre preparado imediatamente antes da realização dos experimentos para evitar a proliferação de microorganismos e foi mantido em “banho maria” a 37° C, onde era conectado à tubulação da bomba peristáltica. O fluxo considerado ideal para a perfusão foi de 1 mL/min.

Além disso, padronizou-se a resistência dos eletrodos feitos com capilares de borossilicato e a considerada ideal foi entre 15 e 25 MΩ. Por fim, foi determinada a concentração dos hormônios a serem aplicados topicamente na placa com pipeta automática para 1 μM, tanto do FSH ovino quanto da Folitropina Beta, baseado em estudos anteriores do LABENEX (Loss; Jacobus; Wassermann, 2007; Jacobus; Loss; Wassermann, 2010).

5.2 Registro do Potencial de Membrana e da Resistência da Membrana das Células do *Cumulus Oophorus* humanas em Repouso

Foi registrado o potencial de membrana em repouso de 10 células de diferentes pacientes. O potencial médio obtido foi de $-34,02$ mV, com desvio-padrão de $\pm 6,46$ e erro-padrão da média de $\pm 2,04$. A resistência média das membranas ao fluxo de íons foi de $16,5$ M Ω , com desvio-padrão de $\pm 4,03$ e erro-padrão da média de $\pm 1,8$ (vide figura 5.1).

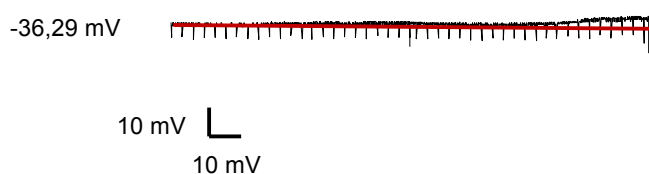


Figura 5.1: Representação de um registro de uma célula do *cumulus oophorus* típica em repouso com potencial de membrana de $-36,29$ mV. Os traços verticais correspondem à resistência da membrana pela aplicação de pulsos de $0,5$ nA.

5.3 Ação Eletrofisiológica do FSH Ovino ($1 \mu\text{M}$) sobre o Potencial de Membrana das Células do *Cumulus Oophorus* Humanas

A aplicação do FSH ovino ($1 \mu\text{M}$) após a estabilização do potencial de membrana das células por pelo menos 2 minutos causou uma lenta despolarização, que foi estatisticamente significativa 180 segundos após a aplicação do hormônio (vide figuras 5.2 e 5.3). Observou-se um ligeiro aumento na resistência da membrana ao fluxo de cargas após a aplicação do hormônio, porém esse aumento não foi significativo nos tempos avaliados (60, 120 e 180 s) (vide figura 5.4). Esses resultados foram obtidos com o registro de 4 células de diferentes pacientes.

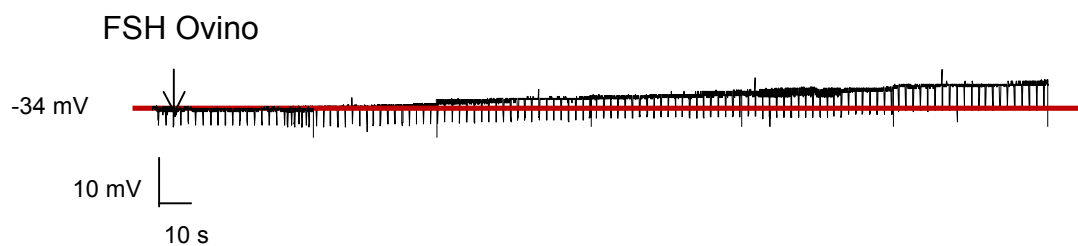


Figura 5.2: Representação de um registro de uma célula do *cumulus oophorus* típica com a aplicação do FSH Ovino ($1 \mu\text{M}$). A seta indica o momento da aplicação do hormônio, a linha horizontal indica o potencial basal no momento da aplicação (-34 mV) e os traços verticais correspondem à resistência da membrana pela aplicação de pulsos de $0,5 \text{ nA}$.

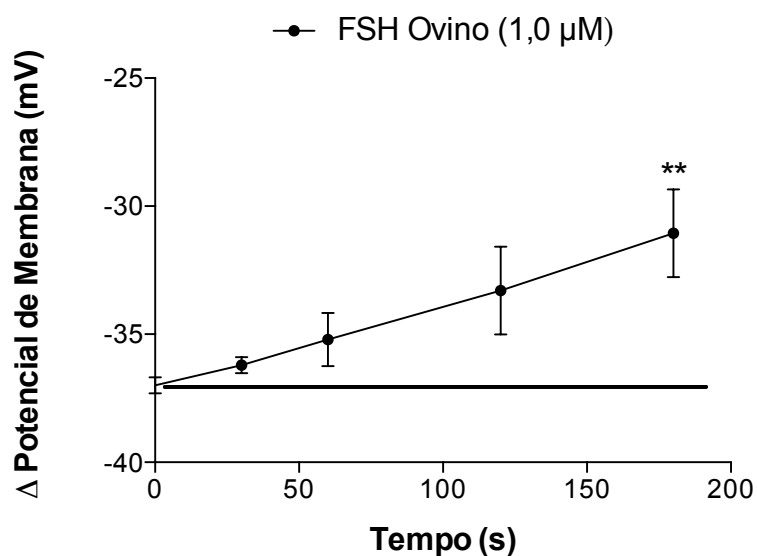


Figura 5.3: Efeito do FSH Ovino ($1 \mu\text{M}$) sobre o potencial de membrana das células do *cumulus oophorus* humanas comparado ao potencial de membrana basal em repouso. (ANOVA de medidas repetidas, ** $p < 0,01$; $n = 4$).

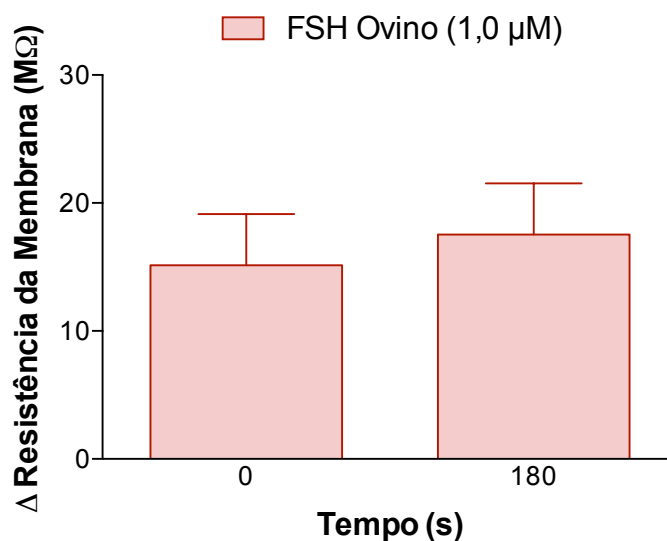


Figura 5.4: Efeito do FSH ovino (1 μM) sobre a resistência da membrana ao fluxo de íons. Não houve diferença significativa na resistência da membrana até 180 segundos após a aplicação do hormônio. $n = 4$.

5.4 Ação Eletrofisiológica da Folitropina Beta (Puregon[®]) (1 μM) sobre o Potencial de Membrana das Células do *Cumulus Oophorus* Humanas

A aplicação da Folitropina Beta (1 μM) após a estabilização do potencial de membrana das células por pelo menos 2 minutos causou uma lenta despolarização, que foi estatisticamente significativa 120 e 180 segundos após a aplicação do hormônio (vide figuras 5.5 e 5.6). Não foi observada diferença significativa na resistência da membrana ao fluxo de cargas antes e após a aplicação do hormônio nos tempos avaliados (vide figura 5.7). Esses resultados foram obtidos com o registro de 5 células de diferentes pacientes.



Figura 5.5: Representação de um registro de uma célula do *cumulus oophorus* típica com a aplicação da Folitropina Beta ($1 \mu\text{M}$). A seta indica o momento da aplicação do hormônio, a linha horizontal indica o potencial basal no momento da aplicação ($-35,9 \text{ mV}$) e os traços verticais correspondem à resistência da membrana pela aplicação de pulsos de $0,5 \text{ nA}$.

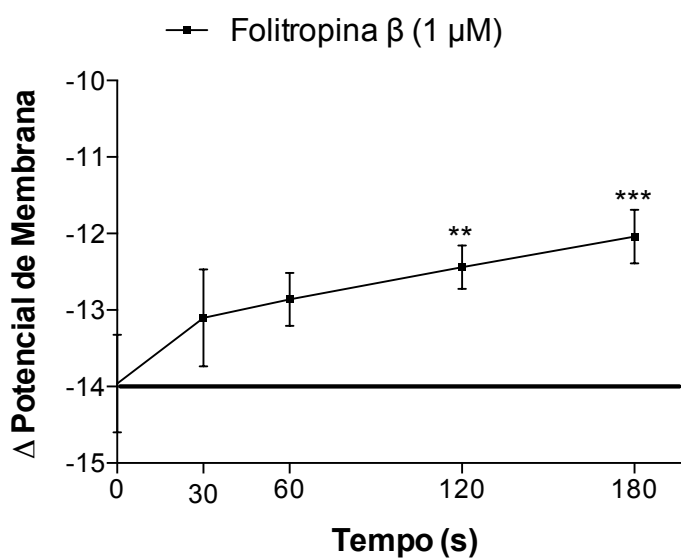


Figura 5.6: Efeito da Folitropina Beta ($1 \mu\text{M}$) sobre o potencial de membrana das células do *cumulus oophorus* humanas comparado ao potencial de membrana basal em repouso. (ANOVA para medidas repetidas, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$; $n = 5$).

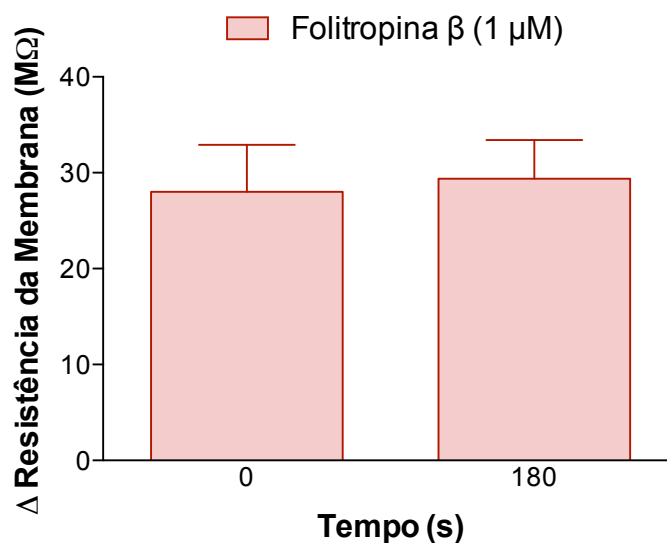


Figura 5.7: Efeito da Folitropina Beta ($1 \mu\text{M}$) sobre a resistência da membrana ao fluxo de íons. Não houve diferença significativa na resistência da membrana até 180 segundos após a aplicação do hormônio. $N = 5$.

5.5 Comparação da Resposta Eletrofisiológica do FSH Ovino ($1 \mu\text{M}$) e da Folitropina Beta ($1 \mu\text{M}$) sobre o Potencial de Membrana das Células do *Cumulus Oophorus* Humanas

O FSH Ovino ($1 \mu\text{M}$) e a Folitropina Beta ($1 \mu\text{M}$) aplicados nas células de *cumulus oophorus* humanas alteram o potencial de membrana das células causando despolarização lenta que foi significativa após a aplicação dos hormônios. O padrão de despolarização foi semelhante entre eles, sendo que a Folitropina Beta teve uma resposta mais imediata que o FSH Ovino. Porém, essa diferença não foi estatisticamente significativa aos 120 ($P=0,2029$), nem aos 180 segundos ($P=0,0641$) após a aplicação do hormônio (Teste T de Student não-pareado). A figura 5.8 mostra o gráfico com a comparação entre as respostas obtidas com cada hormônio isoladamente.

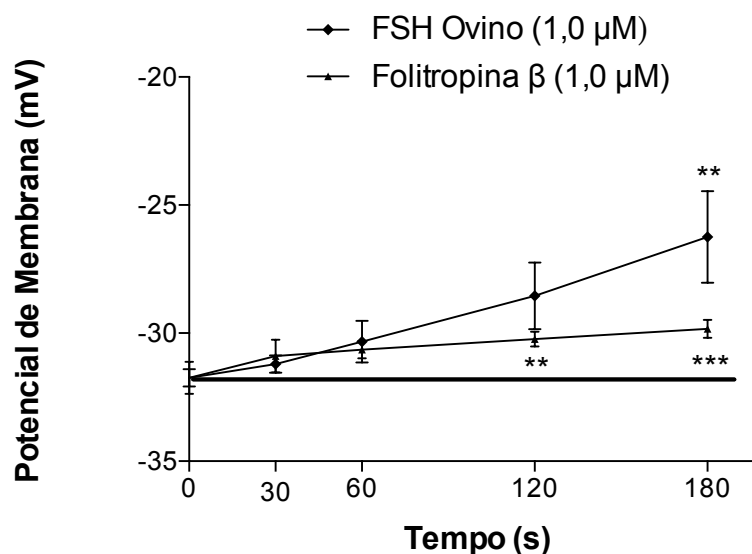


Figura 5.8: Efeito do FSH Ovino (1 µM) e da Folitropina Beta (1 µM) sobre o potencial de membrana das células do *cumulus oophorus* humanas comparado ao potencial de membrana basal (ANOVA para medidas repetidas, ** P<0,01 e *** P<0,001). Não foi observada diferença significativa quando foi comparada a Folitropina Beta com o FSH Ovino aos 120 (P=0,2029) e aos 180 s (P=0,0641).

5.6 Comparação do Potencial de Membrana Médio em Repouso das Células do *Cumulus Oophorus* Humanas com a Causa da Infertilidade

Quando foi comparado o potencial de membrana médio observado nas células das pacientes com Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) com aquele das pacientes cuja infertilidade era de causa masculina, ou seja, o motivo do tratamento de infertilidade era uma causa masculina, nota-se uma tendência a um potencial de membrana basal mais negativo nas pacientes com SOP que nas com causa masculina. Porém, essa diferença não foi estatisticamente significativa (vide tabela 5.1).

Tabela 5.1: Comparação do potencial de membrana médio em repouso entre pacientes com fator masculino de infertilidade e pacientes com Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP). Não houve diferença significativa no potencial de membrana basal entre os grupos (Teste exato de Fischer $P=0,2063$; razão de chances=12,000; Intervalo de Confiança de 95%: 0,5137 a 280,31).

Potencial de Membrana Médio (mV)	Fator Masculino	SOP	Total
-6,0 até -16,0	4 (44%)	1 (11%)	5 (56%)
-16,1 até -60,0	1 (11%)	3 (33%)	4 (44%)
Total	5 (56%)	4 (44%)	9 (100%)

Na comparação do potencial de membrana médio observado nas células das pacientes com outras causas femininas de infertilidade, que não a Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) com aquele das pacientes cuja infertilidade era de causa masculina, nota-se uma tendência a um potencial de membrana basal mais negativo nas pacientes com outras causas de infertilidade feminina (exceto SOP) que nas com causa masculina. Porém, essa diferença não foi estatisticamente significativa (vide tabela 5.2).

Tabela 5.2: Comparação do potencial de membrana médio em repouso entre pacientes com fator masculino de infertilidade e pacientes com fator feminino de infertilidade (exceto SOP). Não houve diferença significativa no potencial de membrana basal entre os grupos (Teste exato de Fischer $P=0,5238$; razão de chances= 6.000; Intervalo de Confiança de 95%: 0,3542 a 101,64).

Potencial de Membrana Médio (mV)	Fator Masculino	Fator Feminino (exceto SOP)	Total
-6,0 até -16,0	4 (40%)	2 (20%)	6 (60%)
-16,1 até -60,0	1 (10%)	3 (30%)	4 (40%)
Total	5 (50%)	5 (50%)	10 (100%)

Quanto à comparação do potencial de membrana médio das células das pacientes com SOP com aquele das células de pacientes com outras causas femininas de infertilidade (que não a SOP), não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Estes dados estão expostos na tabela 5.3, abaixo.

Tabela 5.3: Comparação do potencial de membrana médio em repouso entre pacientes com Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) e pacientes com outros fatores femininos de infertilidade (exceto SOP). Não houve diferença significativa no potencial de membrana basal entre os grupos (Teste exato de Fischer $P=1,0000$; razão de chances=2,000; Intervalo de Confiança de 95%: 0,1116 a 35,83).

Potencial de Membrana Médio (mV)	Não SOP	SOP	Total
-6,0 até -16,0	2 (22%)	1 (11%)	3 (33%)
-16,1 até -60,0	3 (33%)	3 (33%)	6 (67%)
Total	5 (56%)	4 (44%)	9 (100%)

5.7 Comparação do Potencial de Membrana Médio em Repouso das Células do *Cumulus Oophorus* Humanas com a Idade das Pacientes

Quando foi comparado o potencial de membrana médio observado nas células das pacientes com menor faixa etária (20 a 35 anos) com aquele das pacientes com maior faixa etária (36-50 anos), nota-se uma tendência a um potencial de membrana basal mais negativo nas pacientes com faixa etária mais alta que nas com faixa etária mais baixa. Porém, essa diferença não foi estatisticamente significativa, conforme observado na tabela 5.4 abaixo.

Tabela 5.4: Comparação do potencial de membrana médio em repouso entre pacientes com menor faixa etária (20-35 anos) e pacientes com maior faixa etária (36-50 anos). Não houve diferença significativa no potencial de membrana basal entre os grupos (Teste exato de Fischer $P= 0,5921$; razão de chances= 3,333; Intervalo de Confiança de 95%: 0,3617 a 30,718).

Potencial de Membrana Médio (mV)	20-35 Anos	36-50 Anos	Total
-6,0 até -16,0	5 (36%)	2 (14%)	7 (50%)
-16,1 até -60,0	3 (21%)	4 (29%)	7 (50%)
Total	8 (57%)	6 (43%)	14 100%

5.8 Comparação do Número de Oócitos Maduros e Imaturos Coletados das Pacientes que Tiveram Avaliação Eletrofisiológica das Células do *Cumulus* com a Causa da Infertilidade

Quando foi comparado o número de oócitos maduros e imaturos coletados das pacientes com Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) com aquele das pacientes cuja infertilidade era de causa masculina, não foi observada diferença estatisticamente significativa (vide tabela 5.5).

Tabela 5.5: Comparação entre o número de oócitos imaturos e maduros (MII) coletados de pacientes com fator masculino de infertilidade com os coletados de pacientes com Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP). Não houve diferença significativa no número de oócitos maduros coletados entre os grupos (Teste exato de Fischer $P= 0,0941$; razão de chances=1,792; Intervalo de Confiança de 95%: 0,9110 a 3.525).

Potencial de Membrana Médio (mV)	Fator Masculino	SOP	Total
Imaturos	32 (20%)	20 (13%)	52 (33%)
Metáfase II (MII)	50 (32%)	56 (35%)	106 (67%)
Total	82 (52%)	76 (48%)	158 (100%)

Quando foi comparado o número de oócitos maduros e imaturos coletados das pacientes com outras causas de infertilidade feminina (que não a SOP) com aquele das pacientes cuja infertilidade era de causa masculina, não foi observada diferença estatisticamente significativa (vide tabela 5.6).

Tabela 5.6: Comparação entre o número de oócitos imaturos e maduros (MII) coletados de pacientes com fator masculino de infertilidade com os coletados de pacientes com fator feminino de infertilidade (exceto SOP). Não houve diferença significativa no número de oócitos maduros coletados entre os grupos (Teste exato de Fischer $P= 0,1018$; razão de chances= 2,133; Intervalo de Confiança de 95%: 0,8962 a 5,078).

Potencial de Membrana Médio (mV)	Fator Masculino	Fator Feminino (exceto SOP)	Total
Imaturos	32 (26%)	9 (7%)	41 (34%)
Metáfase II (MII)	50 (41%)	30 (25%)	80 (66%)
Total	82 (68%)	39 (32%)	121 (100%)

5.9 Comparação do Número de Oócitos Fertilizados (com 2 pró-núcleos; 2PN) e Não-fertilizados das Pacientes que Tiveram Avaliação Eletrofisiológica das Células do *Cumulus* com a Causa da Infertilidade

Quando foi comparado o número de oócitos fertilizados (2PN) e não-fertilizados das pacientes com Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) com aquele das pacientes cuja infertilidade era de causa masculina, não foi observada diferença estatisticamente significativa. Vide tabela 5.7, abaixo.

Tabela 5.7: Comparação entre o número de oócitos fertilizados (2PN) e não-fertilizados de pacientes com fator masculino de infertilidade com os de pacientes com Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP). Não houve diferença significativa no número de oócitos fertilizados e não-fertilizados entre os grupos (Teste exato de Fischer $P= 0,6914$; razão de chances= $0,6250$; Intervalo de Confiança de 95%: $0,1075$ a $3,634$).

Potencial de Membrana Médio (mV)	Fator Masculino	SOP	Total
Não-fertilizado	2 (3%)	4 (5%)	6 (8%)
Fertilizado (2PN)	32 (41%)	40 (51%)	72 (92%)
Total	34 (44%)	44 (56%)	78 (100%)

Quando foi comparado o número de oócitos fertilizados (2PN) e não-fertilizados das pacientes com outras causas de infertilidade feminina (que não a SOP) com aquele das pacientes cuja infertilidade era de causa masculina, não foi observada diferença estatisticamente significativa. Vide tabela 5.8, abaixo.

Tabela 5.8: Comparação entre o número de oócitos fertilizados (2PN) e não-fertilizados de pacientes com fator masculino de infertilidade com os de pacientes com fator feminino de infertilidade (exceto SOP). Não houve diferença significativa no número de oócitos fertilizados e não-fertilizados entre os grupos (Teste exato de Fischer $P= 1,0000$; razão de chances= 1,375; Intervalo de Confiança de 95%: 0,1173 a 16,121).

Potencial de Membrana Médio (mV)	Fator Masculino	Fator Feminino (exceto SOP)	Total
Não-fertilizado	2 (4%)	1 (2%)	3 (5%)
Fertilizado (2PN)	32 (56%)	22 (39%)	54 (95%)
Total	34 (60%)	23 (40%)	57 (100%)

5.10 Comparação do Número de Embriões com Melhor Viabilidade (Graus 1 e 2) e com Menor Viabilidade (Graus 3, 4 e 5) das Pacientes que Tiveram Avaliação Eletrofisiológica das Células do *Cumulus* com a Causa da Infertilidade

Quanto à comparação do número de embriões com melhor viabilidade (Graus 1 e 2) e com menor viabilidade (Graus 3, 4 e 5) das pacientes a Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) com aquele das pacientes cuja infertilidade era de causa masculina, não foi observada diferença estatisticamente significativa. Dados apresentados na tabela 5.9.

Tabela 5.9: Comparação entre o número de embriões com melhor viabilidade (Graus 1 e 2) e com menor viabilidade (Graus 3, 4 e 5) das pacientes com fator masculino de infertilidade com os de pacientes com Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP). Não houve diferença significativa no número de embriões com melhor viabilidade e com menor viabilidade entre os grupos (Teste exato de Fischer $P= 0,4866$; razão de chances= 1,491; Intervalo de Confiança de 95%: 0,5969 a 3,725).

Potencial de Membrana Médio (mV)	Fator Masculino	SOP	Total
Graus 1 e 2	17 (22%)	15 (20%)	32 (42%)
Graus 3, 4 e 5	19 (25%)	25 (33%)	44 (58%)
Total	36 (47%)	40 (53%)	76 (100%)

6 DISCUSSÃO

O objetivo desse estudo foi padronizar a técnica de registro eletrofisiológico intracelular para as células de *cumulus oophorus* humanas e verificar a ação de uma isoforma menos ácida do FSH (Puregon®) sobre o potencial de membrana dessas células, comparando com a ação de um FSH com menor grau de pureza (FSH ovino). Nesses experimentos foi feita a padronização do meio de perfusão e da placa a ser utilizada com as células do *cumulus oophorus* humanas. Também foi padronizado o modo de transporte das células entre os laboratórios de reprodução humana assistida e o Laboratório de Endocrinologia Experimental (LABENEX), na UFRGS. Foi também verificada a resistência do eletrodo necessária para a realização da técnica. Além disso, foi determinado o potencial de membrana e a resistência da membrana ao fluxo de íons em repouso para as células do *cumulus*, sendo avaliada a resposta eletrofisiológica das células do *cumulus oophorus* humanas ao FSH ovino em comparação à resposta eletrofisiológica à Folitropina Beta (Puregon®). Por fim, foi feita a verificação da associação de algumas características das pacientes como idade, causa da infertilidade e características oocitárias e embrionárias com os resultados encontrados na eletrofisiologia.

A padronização da técnica foi feita com base em estudos anteriores do LABENEX – UFRGS realizados em células de Sertoli de ratos (LOSS; JACOBUS; WASSERMANN, 2007; JACOBUS; LOSS; WASSERMANN, 2010). Porém, foi necessária a adaptação da técnica para as células do *cumulus oophorus* humanas. No estudo de Gilula, Epstein e Beers (1978), com Complexos *cumulus*-oócito de ratas - único estudo com a técnica de registro eletrofisiológico intracelular em células do *cumulus* até então - foram utilizadas placas de cultura tratadas com poli-L-lisina. No nosso estudo, fazendo uma cultura por 24 a 48 horas das células do *cumulus* humanas, não foi necessário utilizar nenhum reagente nas placas, pois as células estavam aderidas ao plástico. Ainda no mesmo estudo supra citado, os registros eletrofisiológicos foram realizados em temperatura ambiente. Porém, para as células do *cumulus* humanas, houve uma maior sobrevivência com a perfusão do meio de Hank's aquecido a 37° C. Outro aspecto em que o nosso estudo, com células humanas, diferiu do anterior, foi na resistência dos microeletrodos. No presente estudo, foram utilizados eletrodos feitos com capilares de borossilicato e a

resistência dos eletrodos mais efetiva foi de 15 a 25 M Ω . Já no estudo de Gilula, Epstein e Beers (1978), os autores utilizaram eletrodos com resistências entre 50 e 70 M Ω .

Quanto ao registro do potencial de membrana e da resistência da membrana das células do *cumulus oophorus* humanas em repouso, foi obtido um potencial médio de -34,02 mV, com desvio-padrão de $\pm 6,46$ e erro-padrão da média de $\pm 2,04$. Esse valor de potencial em repouso diferiu do encontrado nas células do complexo *cumulus* – oócito de ratas no estudo de Gilula, Epstein e Beers (1978), que foi de -50 a -60 mV no início da inserção do eletrodo e vindo a declinar após reposicionamento dos microeletrodos nas células do *cumulus*. O potencial médio em repouso obtido pelos autores para os oócitos foi de $-39 \pm 3,1$ mV. Porém, deve-se levar em consideração que esses experimentos foram realizados em espécies diferentes e em nosso estudo foram utilizadas somente as células do *cumulus*, enquanto que no estudo anterior (GILULA; EPSTEIN; BEERS, 1978) foram utilizados complexos *cumulus* – oócito, sendo observado um acoplamento iônico entre os dois tipos celulares. Além disso, os experimentos de Gilula, Epstein e Beers (1978) foram feitos em temperatura ambiente, o que pode tornar o potencial médio mais negativo. A resistência média das membranas ao fluxo de íons encontrada no nosso estudo foi de 16,5 M Ω , com desvio-padrão de $\pm 4,03$ e erro-padrão da média de $\pm 1,8$. Este é um dado inédito a nosso conhecer, visto que não foi encontrado na literatura nenhum outro registro de resistência da membrana das células do *cumulus* para comparação.

A despolarização observada com ambas as isoformas do FSH pode ter sido ocasionada pela ação deste hormônio sobre a condutividade iônica da membrana. Um estudo anterior (TRAUT *et al.*, 2009) demonstrou a expressão de várias classes de canais de K⁺ sensíveis a Ca²⁺ em células humanas da granulosa. Esses canais estão envolvidos com a produção de hormônios sexuais estimulada pelas gonadotrofinas. Acredita-se que esse grupo de canais participa da mediação entre os sistemas de sinalização endócrina (hCG, LH) e a sinalização local ovariana (TRAUT *et al.*, 2009). Outro estudo (KUNZ; ROGGORS; MAYERHOFER, 2007) detectou a expressão do RNA mensageiro de um canal de potássio dependente de voltagem (KCNQ1) em células humanas da granulosa em cultura. Também foi

observada a expressão proteica dos canais KCNQ1 nos folículos antrais. Com a utilização de um bloqueador do canal (XE991) houve uma diminuição da produção de esteroides estimulada pelas gonadotrofinas e aumentou a proliferação celular. Além disso, em outro estudo de Kunz, Richter e Mayerhofer (2006) foi demonstrada a presença de canais de K^+ sensíveis ao ATP (K^+_{ATP}) em células humanas da granulosa. Nesse trabalho, também ficou demonstrado que estes canais não são somente funcionais, mas estão envolvidos em uma função crucial das células da granulosa luteinizadas, a produção de progesterona.

Um dos canais que também podem estar envolvidos com a despolarização da membrana celular das células do *cumulus* são os canais de Ca^{2+} . No estudo de Platano *et al.* (2005), foi indicada a presença de canais de cálcio dependentes de voltagem (VDCC) dos tipos L (de longa duração) e T (transitórios), cuja condução iônica pode ser reduzida pela ativação de receptores colinérgicos em células humanas da granulosa. Outro estudo (AGOSTON *et al.*, 2004) detectou evidências moleculares e funcionais da presença de dois canais de Ca^{2+} ativados por voltagem (tipos T $Ca_v3.2$ e L $Ca_v1.2$) em células humanas da granulosa luteinizadas. Nesse estudo, o estímulo com hCG aumentou acentuadamente o percentual de células em cultura que apresentaram correntes de Ca^{2+} e a densidade da corrente dos canais de Cálcio do tipo T, que foram os predominantes. Esses resultados indicam um papel do hCG na regulação da expressão dos canais de Ca^{2+} em células humanas da granulosa e eles também observaram um possível papel dos canais do tipo T $Ca_v3.2$ na produção de esteroides por essas células. Complementando esses achados, em um estudo anterior de Flores *et al.* (1998), utilizando células da granulosa de suínos isoladas de um mesmo folículo, foi demonstrado que os receptores de LH dessas células estão ligados à fosfolipase C (PLC). Os autores inferiram que o LH induz um aumento bifásico na concentração de Ca^{2+} causando uma mobilização imediata do Ca^{2+} intracelular seguida por um aumento no influxo de Ca^{2+} extracelular. Além disso, em um estudo anterior do LABENEX (JACOBUS; LOSS; WASSERMANN, 2010) utilizando células de Sertoli de ratos com 10 a 12 dias de idade, os efeitos rápidos de membrana do FSH associados ao cálcio foram bloqueados pela toxina Pertussis, pelo Wortmannin e pelo Verapamil, sugerindo que a ação rápida do FSH ocorre pela proteína Gi, a qual ativa a fosfatidil inositol-3-cinase gama ($PI3K\gamma$) através das suas subunidades $\beta\gamma$ por um mecanismo ainda

desconhecido, ao mesmo tempo que estimula a entrada de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ extracelular através do canal de Ca^{2+} do tipo L, que despolariza a membrana e ativa o sistema A de transporte de aminoácidos neutros. Ainda são necessários estudos complementares para melhor compreendermos quais canais estão envolvidos na despolarização observada após a aplicação tanto do FSH Ovino, quanto da Folitropina Beta nas células do *cumulus* humanas.

Observou-se um ligeiro aumento na resistência da membrana ao fluxo de cargas após a aplicação do FSH Ovino, mas não houve diferença significativa nos tempos avaliados. Já com a aplicação da Folitropina Beta, não houve diferença significativa na resistência da membrana ao fluxo de cargas antes e após a aplicação do hormônio em nenhum dos tempos avaliados. A diferença na resistência da membrana indica uma mudança na permeabilidade da célula aos íons (ATWATER; RIBALET; ROJAS, 1978). Quando há um aumento na resistência da membrana sugere-se um fechamento de canais, reduzindo, assim, a corrente de íons positivos. Já uma diminuição nessa resistência indica uma abertura de canais que gera um aumento de corrente positiva. Mais estudos são necessários para que possamos avaliar a dinâmica dos canais da membrana das células do *cumulus* mediante a aplicação desses hormônios.

Quando foi feita uma comparação entre a despolarização causada pela aplicação do FSH Ovino e aquela causada pela aplicação da Folitropina Beta, observou-se que o padrão de despolarização foi semelhante entre eles, sendo que o padrão de resposta da Folitropina Beta na mesma dosagem foi mais imediato que o do FSH Ovino. A diferença na despolarização das duas isoformas não foi estatisticamente significativa aos 180 segundos ($P=0,0965$). O FSH Ovino é uma mistura de isoformas mais ácidas e menos ácidas do FSH e tem um menor grau de pureza. Já o Puregon[®] é o FSH humano (folitropina β) recombinante produzido em uma linhagem de células de ovários de hamsters chineses transfectada com dois plasmídeos contendo os genes das cadeias α e β do FSH humano e marcadores de seleção. Com essa forma de obtenção, o Puregon[®] contém uma mistura de isoformas com uma proporção duas vezes menor de isoformas mais ácidas e uma proporção duas vezes maior de isoformas menos ácidas que o FSH obtido da urina de mulheres pós-menopáusicas (Metrodin[®]), menos purificado, que era utilizado

anteriormente em maior escala nos tratamentos de reprodução assistida (“Puregon, INN-Follitropin beta - WC500045613.pdf,” [S.d.]). Um trabalho que utilizou a técnica de Western Blot para analisar as isoformas de FSH humano (hFSH) (WALTON *et al.*, 2001) revelou a presença de duas isoformas de FSH β que diferiram em tamanho. Nesse trabalho foi encontrada uma isoforma de FSH β de baixo peso molecular que estava associada a todas as frações de isoformas do FSH. Também foi encontrada uma isoforma de FSH β com alto peso molecular, que estava associada às frações mais ácidas e foi mais abundante nas misturas com menor ponto isoelétrico. Além disso, a caracterização das isoformas de FSH β por espectrometria de massa revelou uma isoforma não glicosilada (WALTON *et al.*, 2001).

Um estudo anterior com folículos ovarianos de ratos e de camundongos (BARRIOS-DE-TOMASI *et al.*, 2002) mostrou que as diferentes isoformas de FSH humano que ocorrem naturalmente podem exercer efeitos diferentes e até mesmo opostos nas células-alvo. Nesse trabalho foi observado que as isoformas menos ácidas e com menor tempo de meia-vida plasmática podem exercer significantes efeitos *in vivo* quando fatores fisiológicos são monitorados. As isoformas menos ácidas (pH 6,6-4,6) foram capazes de induzir uma maior liberação de AMP cíclico, uma maior produção de estrógeno e maior atividade da enzima ativadora de plasminogênio (tPA) tecido-específica e da enzima citocromo P450 aromatase nas células da granulosa de ratos, que as isoformas mais ácidas (pH>7,10). Em contraste, as isoformas mais ácidas induziram uma maior expressão do RNA mensageiro da α -inibina que as isoformas menos ácidas (com menos ácido siálico). Nesse mesmo estudo, nos complexos *cumulus*-oócitos isolados de camundongos, a adição das isoformas menos ácidas induziu a continuação da meiose mais eficientemente que as isoformas mais ácidas, enquanto as isoformas mais ácidas atuaram como fortes antagonistas de vários efeitos mediados pelo FSH. Quanto aos efeitos *in vivo*, foi testada a proliferação das células da granulosa de folículos em ratas imaturas sexualmente e as isoformas menos ácidas foram tanto quanto ou até mais eficientes que as mais ácidas na manutenção da proliferação dessas células quando administradas imediatamente após a hipofisectomia (BARRIOS-DE-TOMASI *et al.*, 2002).

Por outro lado, um estudo anterior que procurou avaliar os efeitos de três isoformas de hFSH no desenvolvimento de folículos ovarianos de ratos *in vitro* (VITT *et al.*, 1998), demonstrou haver uma maior formação de folículos antrais com uma concentração de 1,5 ng/mL da isoforma menos ácida, enquanto as isoformas intermediárias e mais ácidas induziram um crescimento semelhante somente em maiores concentrações (7,5 ng/mL e 50 ng/mL, respectivamente). As isoformas menos ácidas do FSH induziram um crescimento pré-antral mais rápido, enquanto as isoformas mais ácidas estimularam a secreção de 17β -estradiol mais tarde durante o período de cultura e a formação do antro em uma menor proporção de folículos que as demais isoformas. Outros estudos (ZAMBRANO *et al.*, 1999; TIMOSSO *et al.*, 2000; CREUS *et al.*, 2001) também observaram uma maior atividade das isoformas menos ácidas do FSH quando comparadas com as mais ácidas em outros aspectos da ação hormonal. Novos estudos com a eletrofisiologia do FSH nas células do *cumulus oóphorus* humanas, utilizando mais isoformas do FSH e avaliando um número maior de células devem esclarecer melhor as diferenças de ação entre as isoformas do hormônio folículo estimulante.

Quando comparou-se o potencial de membrana médio observado nas células das pacientes com Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) e nas células das pacientes com outras causas femininas de infertilidade, que não SOP com aquele das pacientes cuja infertilidade conjugal era de causa masculina, nota-se um maior percentual de células com potencial de membrana basal mais negativo nas pacientes com SOP e naquelas com outras causas femininas de infertilidade que nos casais cuja causa de infertilidade é um fator masculino. Porém, essa diferença não foi estatisticamente significativa. Também quando foi comparado o potencial de membrana médio observado nas células das pacientes com menor faixa etária (20 a 35 anos) com aquele das pacientes com maior faixa etária (36 a 50 anos), nota-se um maior percentual de células com potencial de membrana basal mais negativo nas pacientes com faixa etária mais alta que nas com faixa etária mais baixa. Porém, essa diferença também não foi estatisticamente significativa. Estes resultados nos impulsionam a continuar nesta área de pesquisa, aumentando o número amostral de pacientes para confirmar ou descartar uma possível relação entre os demais dados das pacientes e as medidas de potenciais de membrana.

Um trabalho que trata das evidências da expressão de várias conexinas nos folículos em desenvolvimento em camundongos (KIDDER; MHAWI, 2002) mostrou que muitas conexinas são expressas nos complexos oócito-granulosa e que essa expressão depende da espécie em questão. Nesse trabalho, também foi observado que as conexinas expressas pelos oócitos são diferentes daquelas expressas pelas células da granulosa podendo, assim, ter diferentes propriedades. Outra pesquisa, que avaliou a habilidade do FSH em afetar a formação e a internalização das junções comunicantes nas células da granulosa de ratos hipofisectomizados (BURGHARDT; MATHESON, 1982), concluiu que o FSH e o LH podem ter efeitos antagônicos nas junções comunicantes das membranas das células da granulosa. Nesse estudo, foi proposto que durante o crescimento folicular inicial, o FSH estimula o aumento nas junções comunicantes da superfície celular, enquanto a renovação dessas junções está mais favorecida durante os estágios mais tardios do crescimento folicular. Aparentemente, os efeitos induzidos pelo LH nas membranas juncionais ocorrem nos estágios mais tardios do crescimento folicular e se sobrepõem aos do FSH. As junções intercelulares são essenciais para a maturação folicular e, através delas, podem passar íons entre as células. As pacientes com maior faixa etária e aquelas com problemas ovarianos geralmente têm um aumento na produção de FSH na tentativa de melhorar a foliculogênese através de um maior estímulo ovariano (AIRES, 2012). Pode se sugerir que a diferença na concentração sanguínea do FSH e também na quantidade de junções intercelulares esteja influenciando o potencial de membrana basal. No entanto, são necessários estudos com um maior número de pacientes para melhor avaliar as diferenças entre as células dessas mulheres e verificar se a tendência de diferença no potencial de membrana basal é significativa e fisiológica.

Os demais parâmetros embriológicos como o número de oócitos maduros e imaturos coletados das pacientes com Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) e das pacientes com outras causas de infertilidade feminina (que não a SOP) com aquele das pacientes cuja infertilidade era de causa masculina, não foi observada diferença estatisticamente significativa. Do mesmo modo, na comparação do número de oócitos fertilizados (2PN) e não-fertilizados e do número de embriões com melhor viabilidade (Graus 1 e 2) e com menor viabilidade (Graus 3, 4 e 5) das pacientes com a Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) e daquelas com outras causas de

infertilidade feminina (que não a SOP), comparando com os números das pacientes cuja infertilidade era de causa masculina, não foi observada diferença estatisticamente significativa. Apesar de ser postulado que as pacientes com SOP têm maiores taxas de aborto espontâneo causadas por menor número de oócitos maduros e por uma menor qualidade dos embriões, no estudo de LUDWIG *et al.* (1999), observou-se que o número de oócitos em metáfase II não foi diferente em relação ao grupo controle e o número de oócitos que fertilizaram normalmente foi maior nas pacientes com SOP devido a um maior número de oócitos puncionados. Além disso, nesse mesmo estudo, também foi transferido um maior número de embriões por ciclo nas pacientes com SOP e esses embriões tiveram um maior escore cumulativo. Porém, a taxa de aborto foi menor no grupo controle. Os autores levantaram a hipótese de que as pacientes com SOP possam ter fatores independentes da morfologia oocitária e que somente a maturidade citoplasmática, e não a nuclear, pode estar influenciando a capacidade reprodutiva destas pacientes. Podemos sugerir que não tenha sido encontrada diferença entre os parâmetros das pacientes com SOP e as com causa masculina no nosso estudo por motivos semelhantes aos do estudo citado anteriormente (LUDWIG *et al.*, 1999).

Em relação às pacientes com outras causas de infertilidade feminina (exceto SOP), um estudo utilizou imagens com fluorescência para avaliar os oócitos que não fertilizaram normalmente após a fertilização *in vitro* (GLISSANT *et al.*, 2003) demonstrou que a maior parte dos oócitos estava em metáfase II, mas eram cromossomicamente anormais em 50% dos casos. A incidência de anomalias cromossômicas e nos fusos metafásicos estava diretamente relacionada com a idade materna e a migração dos grânulos corticais pareceu estar associada à maturação nuclear no momento da fertilização.

Esses dados demonstram como, apesar de os oócitos parecerem normais morfológicamente, outros fatores podem estar associados a anormalidades nos gametas dessas pacientes. Em um estudo prospectivo que utilizou um escore para classificar os embriões em seis padrões, de 0 a 5 (WITTEMER *et al.*, 2000), foi analisado o desenvolvimento posterior para cada categoria. Como resultado, os embriões que receberam classificação zero (0) geraram significativamente mais embriões de boa qualidade com maior potencial de implantação que os embriões

originados dos outros padrões de classificação. Porém, nesse estudo não foram encontradas relações entre os parâmetros clínicos (idade feminina, causa de infertilidade) e a distribuição dos padrões de embriões. Em outro estudo, que comparou os resultados da fertilização *in vitro* em casais com causa masculina e com infertilidade de causa tubária (TOURNAYE *et al.*, 1992), nos casos de infertilidade masculina, mais oócitos foram recuperados, porém menos oócitos fertilizaram. Além disso, apesar da taxa de clivagem ser menor nesses casais, não houve diferença na qualidade embrionária. Nos casos de infertilidade masculina foram feitas menos transferências e o número médio de embriões transferidos foi menor. Esses dados mostram que, apesar de não ser observada diferença estatisticamente significativa no número de embriões com melhor qualidade, outros parâmetros interferem no prognóstico do casal, dependendo da causa da infertilidade. Esta e outras observações aqui levantadas mostram que mais estudos necessitam ser realizados avaliando a morfologia das células do *cumulus oophorus* humanas e comparando as diferentes morfologias.

7 CONCLUSÕES

No presente estudo foi realizada a padronização da técnica de registro eletrofisiológico intracelular para as células de *Cumulus Oóphorus* humanas. Registrou-se também o potencial médio de membrana em repouso (-34,02 mV) e a resistência média da membrana ao fluxo de íons (16,5 MΩ). A partir desses dados, tornou-se possível a avaliação eletrofisiológica da ação dos hormônios sobre as células do *cumulus oóphorus* humanas.

Foi observado que o FSH Ovino (1 μM) e a Folitropina beta (1 μM) possuem uma ação despolarizante sobre o potencial de membrana das células do *cumulus*. Porém, a folitropina beta causou uma despolarização significativa já aos 120 segundos após a sua aplicação, enquanto o FSH ovino provocou uma despolarização significativa somente 180 segundos após a sua aplicação, indicando que a folitropina beta teve uma ação mais imediata, permitindo-nos aceitar a hipótese 1 nesse ponto. Porém, não houve diferença estatisticamente significativa entre a ação das duas isoformas testadas, tanto 120 quanto 180 segundos após a aplicação do hormônio. São necessários novos estudos para avaliar em maior profundidade e também quanto à via de sinalização intracelular, se há alguma diferença na ação das isoformas mais ácidas e menos ácidas do FSH. Verificou-se também um ligeiro aumento na resistência da membrana após a aplicação do FSH Ovino, que pode estar indicando o fechamento de canais iônicos, porém mais estudos são necessários para avaliar a dinâmica dos canais da membrana das células do *cumulus* após a aplicação desses hormônios.

Na comparação do potencial de membrana médio observado nas células das pacientes com SOP e das pacientes com outras formas de infertilidade de causa feminina com aquele das pacientes com infertilidade de causa masculina, foi observada uma tendência a um potencial de membrana basal mais negativo nas pacientes com SOP e com outras causas de infertilidade feminina que naquelas com infertilidade de causa masculina. Porém, essa diferença não foi significativa. Do mesmo modo, quando foi comparado o potencial médio em repouso das pacientes com menor faixa etária (20 a 35 anos) com o das pacientes com maior faixa etária

(36 a 50 anos), estas tiveram uma tendência a um potencial de membrana mais negativo que aquelas, que não foi diferente estatisticamente. Novos estudos são necessários para verificar se essa tendência de um potencial de membrana mais negativo em pacientes com causa feminina de infertilidade e com idade mais avançada se confirmará e será significativa.

A padronização da técnica de registro eletrofisiológico intracelular para as células de *cumulus oophorus* humanas e a aplicação do FSH Ovino e da folitropina beta nessas células nos permitiram observar as características eletrofisiológicas desse tipo celular em repouso e em resposta às isoformas do FSH. Também obtivemos dados indicativos de uma possível associação entre a eletrofisiologia das células do *cumulus oophorus* humanas e a idade, bem como à causa de infertilidade. Esses resultados abriram os horizontes para novos estudos avaliando maiores detalhes da ação hormonal nessas células e poderão trazer importantes aplicações clínicas para a utilização dos protocolos de estimulação ovariana nas técnicas de reprodução assistida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADHIKARI, D.; LIU, K. Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. **Endocrine reviews**, v. 30, n. 5, p. 438-64, ago. 2009.

AGOSTON, A.; *et al.* Two types of calcium channels in human ovarian endocrine cells: involvement in steroidogenesis. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 89, n. 9, p. 4503-12, set. 2004.

AIRES, M. DE M. **Fisiologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan Ltda., 2012. p. 1120-1138

ANDERSEN, C. Y. *et al.* Effect of different FSH isoforms on cyclic-AMP production by mouse cumulus-oocyte-complexes: a time course study. **Molecular human reproduction**, v. 7, n. 2, p. 129-35, fev. 2001.

ANDERSEN, C. Y. Effect of FSH and its different isoforms on maturation of oocytes from pre-ovulatory follicles. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 5, n. 3, p. 232-239, jan. 2002.

ANDERSEN, C. Y.; WESTERGAARD, L. G.; WELY, M. VAN. FSH isoform composition of commercial gonadotrophin preparations: a neglected aspect? **Reproductive BioMedicine Online**, v. 9, n. 2, p. 231-236, jan. 2004.

ARRAIS, R. F.; DIB, S. A. The hypothalamus-pituitary-ovary axis and type 1 diabetes mellitus: a mini review. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 21, n. 2, p. 327-37, fev. 2006.

ATWATER, B. Y. I.; RIBALET, B.; ROJAS, E. Cyclic changes in potential and resistance of the Beta Cell Membrane Induced by Glucose in Islets of Langerhans from Mouse. **Journal of Physiology**, v. 278, p. 117-139, 1978.

AUSTIN, C R; SHORT, R. V. **Reproduction in mammals: 1 Germ cells and fertilization**. Second ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1972. p. 1 - 62

BAKER, S. J.; SPEARS, N. The role of intra-ovarian interactions in the regulation of follicle dominance. **Human reproduction update**, v. 5, n. 2, p. 153-65, 1999.

BARRIOS-DE-TOMASI, J. *et al.* Assessment of the in vitro and in vivo biological activities of the human follicle-stimulating isohormones. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 186, n. 2, p. 189-98, 25 jan. 2002.

BIGGERS, J. D.; WHITTINGHAM, D. G.; DONAHUE, R. P. The Pattern of Energy Metabolism in the Mouse Oocyte and Zygote. **Zoology**, v. 58, p. 560-567, 1967.

BONI, R. *et al.* Juvenile and adult immature and in vitro matured ovine oocytes evaluated in relation to membrane electrical properties, calcium stores, IP3 sensitivity

and apoptosis occurrence in cumulus cells. **Molecular reproduction and development**, v. 75, n. 12, p. 1752-60, dez. 2008.

BOS-MIKICH, A. **Cryopreservation and parthenogenetic activation of mammalian oocytes**. [S.l.] University of London, 1994.

BROEKMANS, F. J. *et al.* Anti-Mullerian hormone and ovarian dysfunction. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 19, n. September, p. 340-347, 2008.

BULLING, A *et al.* Identification of an ovarian voltage-activated Na⁺-channel type: hints to involvement in luteolysis. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 14, n. 7, p. 1064-74, jul. 2000.

BURGHARDT, R. C.; MATHESON, R. L. Gap Junction Amplification in Rat Ovarian Granulosa. **Developmental Biology**, v. 94, p. 206-215, 1982.

CREUS, S. *et al.* Human FSH isoforms: carbohydrate complexity as determinant of in-vitro bioactivity. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 174, n. 1-2, p. 41-9, 28 mar. 2001.

D'ANTONIO, M. *et al.* Biological characterization of recombinant human follicle stimulating hormone isoforms. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 14, n. 5, p. 1160-7, maio. 1999.

EDSON, M. A; NAGARAJA, A. K.; MATZUK, M. M. The mammalian ovary from genesis to revelation. **Endocrine reviews**, v. 30, n. 6, p. 624-712, out. 2009.

EPPIG, J. J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 122, p. 829-838, 2001.

FLORES, J. A *et al.* Luteinizing hormone (LH) stimulates both intracellular calcium ion ([Ca²⁺]_i) mobilization and transmembrane cation influx in single ovarian (granulosa) cells: recruitment as a cellular mechanism of LH-[Ca²⁺]_i dose response. **Endocrinology**, v. 139, n. 8, p. 3606-12, ago. 1998.

FLORES, J. A.; VELDHUIS, J. D.; LEONG, D. A. Follicle-Stimulating Hormone Evokes an Increase in Intracellular Free Calcium Ion Concentrations in Single Ovarian (Granulosa) Cells. **Endocrinology**, v. 127, n. 6, p. 3172-3179, 1 dez. 1990.

FRANTZ, N. *et al.* Hormônio Anti-Mulleriano: sua Relevância Fisiológica e Clínica. **Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida**, v. 10, p. 25-28, 2006.

GILCHRIST, R. B.; RITTER, L. J.; ARMSTRONG, D. T. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Animal reproduction science**, v. 82-83, p. 431-46, jul. 2004.

GILULA, N. B.; EPSTEIN, M. L.; BEERS, W. H. Cell-to-cell communication and ovulation. A study of the cumulus-oocyte complex. **The Journal of cell biology**, v. 78, n. 1, p. 58-75, jul. 1978.

GLISSANT, Â. *et al.* Multiparameter analysis of human oocytes at metaphase II stage after IVF failure in non-male infertility. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 18, n. 7, p. 1494-1503, 2003.

GUTIERREZ, C. G. *et al.* Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro. **Biology of reproduction**, v. 62, n. 5, p. 1322-8, maio. 2000.

HAWKINS, S. M.; MATZUK, M. M. Menstrual Cycle : Basic Biology. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1135, p. 10-8, 2008.

HELLER, D. T.; CAHILL, D. M.; SCHULTZ, R. M. Biochemical Studies of Mammalian Oogenesis : Metabolic Cooperativity between Granulosa Cells and Growing Mouse Oocytes. **Developmental Biology**, v. 84, p. 455-464, 1981.

HUGUES, J.-N. Recombinant human follicle-stimulating hormone: a scientific step to clinical improvement. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 2, n. 1, p. 54-64, jan. 2001.

JACOBUS, A. P.; LOSS, E. S.; WASSERMANN, G. F. Pertussis toxin nullifies the depolarization of the membrane potential and the stimulation of the rapid phase of Ca entry through L-type calcium channels that are produced by follicle stimulating hormone in 10- to 12-day-old rat Sertoli cells. **Frontiers in physiology**, v. 1, n. October, p. 138, jan. 2010.

KIDDER, G. M.; MHAWI, A. A. Review Gap junctions and ovarian folliculogenesis. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 123, p. 613-620, 2002.

KUNZ, L.; RICHTER, J. S.; MAYERHOFER, A. The adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channel in endocrine cells of the human ovary: role in membrane potential generation and steroidogenesis. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 91, n. 5, p. 1950-5, maio. 2006.

KUNZ, L.; ROGGORS, C.; MAYERHOFER, A. Ovarian acetylcholine and ovarian KCNQ channels: insights into cellular regulatory systems of steroidogenic granulosa cells. **Life sciences**, v. 80, n. 24-25, p. 2195-8, 30 maio. 2007.

LAWSON, K. A.; HAGE, W. J. Clonal analysis of the origin of primordial germ cells in the mouse. **Ciba Foundation symposium**, v. 182, p. 68-84; discussion 84-91, jan. 1994.

LOSS, E. S.; JACOBUS, A. P.; WASSERMANN, G. F. Diverse FSH and testosterone signaling pathways in the Sertoli cell. **Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme**, v. 39, n. 11, p. 806-12, 9 nov. 2007.

LUDWIG, M. *et al.* Oocyte quality and treatment outcome in intracytoplasmic sperm injection cycles of polycystic ovarian syndrome patients. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 14, n. 2, p. 354-358, 1999.

MAGALHÃES, D. M. *et al.* Impact of pituitary FSH purification on in vitro early folliculogenesis in goats. **Biocell : official journal of the Sociedades Latinoamericanas de Microscopia Electronica ... et. al**, v. 33, n. 2, p. 91-7, ago. 2009.

MCGEE, E. *et al.* Preantral ovarian follicles in serum-free culture: suppression of apoptosis after activation of the cyclic guanosine 3',5'-monophosphate pathway and stimulation of growth and differentiation by follicle-stimulating hormone. **Endocrinology**, v. 138, n. 6, p. 2417-24, jun. 1997.

NAYUDU, P. L. *et al.* Intact follicle culture: what it can tell us about the roles of FSH glycoforms during follicle development. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 5, n. 3, p. 240-253, jan. 2002.

NICHOLAS, C. R. *et al.* Instructing an embryonic stem cell-derived oocyte fate: lessons from endogenous oogenesis. **Endocrine reviews**, v. 30, n. 3, p. 264-83, maio. 2009.

O`SHEA, J. D. SMOOTH MUSCLE-LIKE CELLS IN THE THECA EXTERNA OF OVARIAN FOLLICLES IN THE SHEEP. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 24, p. 283-285, 1971.

OLIVERO, P. *et al.* Activation of Cl⁻ channels by human chorionic gonadotropin in luteinized granulosa cells of the human ovary modulates progesterone biosynthesis. **Endocrinology**, v. 149, n. 9, p. 4680-7, set. 2008.

PEREZ, G. I. *et al.* Identification of Potassium-Dependent and -Independent Components of the Apoptotic Machinery in Mouse Ovarian Germ Cells and Granulosa Cells 1. **Biology of reproduction**, v. 63, p. 1358-1369, 2000.

PICTON, H. M. *et al.* The in vitro growth and maturation of follicles. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 136, n. 6, p. 703-15, dez. 2008.

PLATANO, D. *et al.* L- and T-type voltage-gated Ca²⁺ channels in human granulosa cells: functional characterization and cholinergic regulation. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 90, n. 4, p. 2192-7, abr. 2005.

Puregon, INN-Follitropin beta - WC500045613.pdf. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000086/WC500045613.pdf>. Acesso em: 17 mar. 2013.

ROBKER, R. L.; RICHARDS, J. S. Hormone-induced proliferation and differentiation of granulosa cells: a coordinated balance of the cell cycle regulators cyclin D2 and p27Kip1. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 12, n. 7, p. 924-40, jul. 1998.

RUSSELL, D. L.; ROBKER, R. L. Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex. **Human reproduction update**, v. 13, n. 3, p. 289-312, 2007.

SAITOU, M.; BARTON, S. C.; SURANI, M. A. A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. **Nature**, v. 418, n. 6895, p. 293-300, 18 jul. 2002.

SERAFICA, M. D.; GOTO, T.; TROUNSON, A. O. Transcripts from a human primordial follicle cDNA library. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 20, n. 8, p. 2074-91, ago. 2005.

SILVERTHORN, D. U. **Human physiology: an integrated approach**. quinta edi ed. Porto Alegre: ARTMED, 2010. p. 844-851

SUTTON; GILCHRIST; THOMPSON. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. **Human Reproduction Update**, v. 9, n. 1, p. 35-48, 1 jan. 2003.

THOMAS, F. H. *et al.* Follicle-stimulating hormone regulates oocyte growth by modulation of expression of oocyte and granulosa cell factors. **Endocrinology**, v. 146, n. 2, p. 941-9, fev. 2005.

TIMOSSI, C. M. *et al.* Differential effects of the charge variants of human follicle-stimulating hormone. **The Journal of endocrinology**, v. 165, n. 2, p. 193-205, maio. 2000.

TOURNAYE, H. *et al.* Comparison of in-vitro fertilization in male and tubal infertility: a 3 year survey. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 7, n. 2, p. 218-222, 1 fev. 1992.

TRAUT, M. H. *et al.* Identification and characterization of Ca²⁺-activated K⁺ channels in granulosa cells of the human ovary. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 7, n. 28, jan. 2009.

ULLOA-AGUIRRE, A. *et al.* Impact of carbohydrate heterogeneity in function of follicle-stimulating hormone: studies derived from in vitro and in vivo models. **Biology of reproduction**, v. 69, n. 2, p. 379-89, ago. 2003.

VISSER, J. A.; THEMMEN, A. P. N. Anti-Mullerian hormone and folliculogenesis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 234, p. 81-86, 2005.

VITT, U. A *et al.* Isoforms of human recombinant follicle-stimulating hormone: comparison of effects on murine follicle development in vitro. **Biology of reproduction**, v. 59, n. 4, p. 854-61, out. 1998.

WALTON, W. J. *et al.* Characterization of human FSH isoforms reveals a nonglycosylated beta-subunit in addition to the conventional glycosylated beta-subunit. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 86, n. 8, p. 3675-85, ago. 2001.

WITTEMER, C. *et al.* Zygote evaluation : an efficient tool for embryo selection. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 15, n. 12, p. 2591-2597, 2000.

WRIGHT, C. S. *et al.* Effects of follicle-stimulating hormone and serum substitution on the in-vitro growth of human ovarian follicles. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 14, n. 6, p. 1555-62, jun. 1999.

ZAMBRANO, E. *et al.* Receptor binding activity and in vitro biological activity of the human FSH charge isoforms as disclosed by heterologous and homologous assay systems: implications for the structure-function relationship of the FSH variants. **Endocrine**, v. 10, n. 2, p. 113-21, abr. 1999.

ANEXO I - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

CONSENTIMENTO PARA USO DE CÉLULAS ACESSÓRIAS AO ÓVULO DE PACIENTES QUE REALIZARÃO O PROCEDIMENTO DE FERTILIZAÇÃO *IN VITRO*.

A - PROPOSTA DO PROGRAMA:

Vocês estão sendo convidados a participar do projeto de pesquisa intitulado “Ação de diferentes isoformas do FSH sobre o potencial de membrana das células da granulosa do *cumulus oophorus* humano”.

B - OBJETIVOS DO PROGRAMA:

Este projeto visa avaliar o efeito de diferentes formas comerciais do hormônio folículo estimulante (FSH) nas células acessórias (células do *cumulus*) dos óvulos, uma vez que a sua importância na fisiologia ovariana é conhecida. Este estudo permitirá ampliar o conhecimento da biologia do amadurecimento do óvulo e da interação entre os diferentes tipos de hormônio com as células acessórias.

As células que serão utilizadas neste estudo envolvem os oócitos (óvulos) e têm um papel fundamental para a completa maturação oocitária. Atualmente, existe um conhecimento limitado sobre os mecanismos pelos quais as células foliculares

contribuem para a maturação do óvulo. Este trabalho tem por objetivo entender melhor o funcionamento das células foliculares em resposta ao hormônio FSH.

Durante o procedimento de Fertilização *in vitro* (FIV), estas células são descartadas após um processo conhecido como “desnudação” dos oócitos. **Desta forma, caso você aceite participar do projeto, é importante ressaltar que somente as células acessórias ao óvulo, que seriam descartadas, serão utilizadas.** O procedimento de FIV ocorrerá normalmente independente da participação no estudo. Cabe mencionar que estudos semelhantes já foram realizados em outros centros mundiais, sem apresentar qualquer prejuízo ao tratamento das pacientes.

C – RISCOS DA PARTICIPAÇÃO NO PROGRAMA:

Sua participação no programa não lhe trará qualquer risco ao tratamento de infertilidade. Você receberá o mesmo tratamento para seu problema de infertilidade, caso você decida participar ou não do estudo.

Para proteger a sua privacidade, sua identidade não será revelada após o término do estudo e análise dos resultados. A sua identidade permanecerá confidencial nos registros do Centro de Fertilidade e Reprodução Humana- Progest e não será revelada em qualquer publicação dos dados que seja realizada.

Este estudo foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Fone: (51) 3308.4085), para devida aprovação.

D – CUSTOS:

Não haverá, para as pacientes participantes, nenhum custo adicional ao seu tratamento de infertilidade. Caso você decida não participar do programa, não haverá qualquer prejuízo no atendimento que lhe será dispensado no Centro Fertilidade e Reprodução Assistida- Progest. A decisão de não participar do programa não irá afetar o tratamento que você irá receber. Você tem a liberdade

para retirar o consentimento de participação a qualquer momento, sem qualquer prejuízo para o seu atendimento.

E – TERMO DE PARTICIPAÇÃO:

Todo e qualquer assunto considerado de importância para você e seu cônjuge poderão vir a ser esclarecidos pessoalmente, com um dos membros do grupo de pesquisa a qualquer momento que desejar.

F – ALTERNATIVAS PARA PARTICIPAÇÃO:

Você poderá decidir não participar do projeto não aceitando doar as células acessórias de seus óvulos. Caso você decida não participar do estudo, seu tratamento de infertilidade seguirá o mesmo método das participantes da pesquisa e os resultados alcançados não serão considerados para o presente trabalho de pesquisa.

Declaro que li as informações anteriormente descritas a respeito do projeto de pesquisa “Ação de diferentes isoformas do FSH sobre o potencial de membrana das células da granulosa do *cumulus oophorus* humano” e tive a oportunidade de esclarecer todas as minhas dúvidas.

Aceito participar do trabalho proposto, com o objetivo de pesquisa.

_____ / /
Assinatura da paciente.

_____ _/ _/ _
Assinatura do aplicador do consentimento

_____ _/ _/ _
Testemunha

AFIRMAÇÃO DO INVESTIGADOR RESPONSÁVEL: Foi oferecida à paciente participante a oportunidade de esclarecer suas dúvidas a respeito dos riscos que podem se associar à participação no programa. Todas as respostas foram devidamente respondidas.

_____ _/ _/ _
Assinatura do pesquisador responsável

Telefone de contato do pesquisador responsável: Profa. Dra. Adriana Bos-Mikich: 3308-3631.

NOTA: Dar uma cópia deste formulário para o casal participante da pesquisa ou representante.