

Liliana Raquel Casais de Matos

Dismútases do anião Superóxido nas células do *cumulus oophorus* humanas

Mestrado em Medicina e Oncologia Molecular
Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Porto, 2008

Dissertação da candidatura ao grau de Mestre em Medicina e Oncologia Molecular apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.

Trabalho realizado sob a orientação do Professor Doutor Henrique de Almeida, desenvolvido no Serviço e Laboratório de Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.

Ao André e aos meus Pais

AGRADECIMENTOS

Muitos foram os que se cruzaram comigo durante a realização deste trabalho e a eles quero agradecer todo o apoio, tanto profissional como pessoal, com que me brindaram ao longo destes anos:

À Professora Doutora Deolinda Lima, directora do Instituto de Histologia e Embriologia, por me ter recebido tão bem.

Ao Professor Doutor Henrique de Almeida, pela motivação e orientação da presente dissertação, pelos importantes ensinamentos transmitidos, pela amizade e pela confiança que sempre depositou em mim.

À Unidade de Medicina da Reprodução do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital S. João/Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, fonte do material de estudo, em particular ao Professor Doutor João Luís Silva Carvalho, ao Mestre David Stevenson e à Dra. Florbela Gomes, pela imprescindível contribuição para a realização do presente trabalho.

À Sociedade Portuguesa de Ginecologia, pelo apoio financeiro concedido com vista à sua realização.

À Professora Doutora Delminda Neves, pelo carinho, amizade e apoio que sempre demonstrou.

À Professora Doutora Alexandra Gouveia e ao Professor Doutor Carlos Reguenga, pela amizade e pelas opiniões e sugestões sempre valiosas e pertinentes que tanto me ensinaram.

À Adriana, com quem partilhei diariamente alegrias e preocupações, pela sua constante disponibilidade, pelas palavras de ânimo, amizade e confiança que sempre me transmitiu.

A todo o pessoal do Instituto de Histologia e Embriologia que ainda não referi até aqui, pelo carinho com que desde sempre me acolheram e pela excelente convivência diária que me proporcionaram.

À minha família e amigos, pelo apoio e compreensão que demonstraram perante a minha menor disponibilidade.

Aos meus pais e irmãos, por sempre me terem encorajado, até nos momentos de maior desânimo, e nunca terem deixado de acreditar em mim.

Ao André, pelo apoio incondicional e pela disponibilidade constante para me ouvir e aconselhar.

Sem vocês não teria chegado até aqui, e não seria a pessoa que sou hoje...

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE GERAL	I
ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES	IV
LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
RESUMO.....	1
SUMMARY	3
INTRODUÇÃO	5
1. O ovário humano.....	6
1.1. Anatomia	6
1.2. Ciclo menstrual	7
1.3. Oogénese e composição da reserva ovárica.....	9
1.4. Desenvolvimento folicular	11
1.4.1. Aspectos morfológicos	11
1.4.2. Regulação do crescimento folicular	15
1.4.3. Crescimento e maturação ovocitária.....	21
1.5. <i>Cumulus Oophorus</i>	23
2. Procriação Medicamente Assistida.....	24
2.1. Infertilidade.....	24
2.2. Técnicas de Procriação Medicamente Assistida	25
2.3. Eficácia da aplicação das técnicas de PMA.....	27
3. Stress Oxidativo	29
3.1. Espécies Reactivas de Oxigénio	29
3.2. Antioxidantes	30
3.3. Influência na Reprodução	31
4. Objectivos	38
MATERIAL E MÉTODOS.....	39
1. Recolha e obtenção de células de cumulus oophorus.....	40
2. Cultura primária de células	40
2.1. <i>Imunocitoquímica para detecção de CuZnSOD e MnSOD</i>	41
3. Morfologia Ultra-estrutural	42
4. Estudos Bioquímicos	42
4.1. <i>Avaliação da viabilidade celular e contagem das células</i>	42
4.2. <i>Obtenção de homogeneizados</i>	43
4.3. <i>Quantificação da actividade da SOD</i>	43
5. Análise Molecular.....	44
5.1. <i>Preparação das amostras para SDS-PAGE</i>	44
5.2. <i>SDS-PAGE</i>	45
5.3. <i>Western blotting</i>	45
6. Análise Estatística	46

RESULTADOS.....	47
I. Número de células e viabilidade celular.....	48
II. Caracterização das culturas primárias de células de cumulus oophorus.....	48
III. Estudo ultra-estrutural	51
IV. Imunodeteção das enzimas CuZnSOD e MnSOD	52
V. Quantificação da actividade da SOD	53
VI. Detecção e quantificação da CuZnSOD e MnSOD	55
DISCUSSÃO	57
CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
COMUNICAÇÕES ASSOCIADAS AO PRESENTE TRABALHO	X

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: _____	6
Representação esquemática do ovário humano.	
Figura 2: _____	7
Ciclo menstrual. A - Variação da concentração das hormonas hipofisárias, FSH e LH; B - Variação da concentração das hormonas ováricas, estradiol e progesterona; C - Alterações associadas ao crescimento folicular; D - Alterações ao nível da proliferação e degeneração do endométrio.	
Figura 3: _____	9
Migração das células germinativas primordiais durante o desenvolvimento embrionário.	
Figura 4: _____	11
Composição da reserva ovárica. A- Folículos primordiais; B- Folículo em transição; C- Folículo primário pequeno.	
Figura 5: _____	12
Folículo primário grande.	
Figura 6: _____	13
A – Folículo secundário. B- Folículo pré-antral.	
Figura 7: _____	14
A – Folículo antral inicial: início da formação do antro. B- Folículo antral inicial: as células da granulosa que se encontram a envolver o ovócito designam-se <i>cumulus oophorus</i> .	
Figura 8: _____	14
A – Folículo antral pequeno com 0,5-0,9 mm. B- Folículo antral pequeno com 1-2 mm. C- Folículo maduro seleccionável com 2-5 mm.	
Figura 9: _____	16
Representação esquemática de potenciais interações envolvidas na transição de folículo primordial para folículo primário.	
Figura 10: _____	18
Cada célula responde a diferentes combinações de moléculas sinalizadoras de acordo com a sua posição relativa no folículo antral.	
Figura 11: _____	20
Desenvolvimento folicular: dependência de gonatotrofinas.	
Figura 12: _____	21
Desenvolvimento de ovócitos meioticamente competentes e maturação ovocitária.	

Figura 13: _____	23
<i>Cumulus oophorus</i> .	
Tabela 1: _____	24
Principais causas de infertilidade.	
Figura 14: _____	26
Fertilização <i>in vitro</i> : Ovócito rodeado por células de <i>cumulus oophorus</i> é colocado em contacto com os espermatozóides para que ocorra a fertilização.	
Figura 15: _____	26
Injecção Intracitoplasmática de um espermatozóide (ICSI)	
Figura 16: _____	27
Variação da percentagem de transferências que resultam em nados vivos com a idade da mulher.	
Figura 17: _____	28
Taxas de sucesso das técnicas de PMA ao longo dos anos.	
Figura 18: _____	31
Reacções simplificadas do modo de acção da SOD, catálase e peroxidase na neutralização de ROS.	
Figura 19: _____	32
Papel do stress oxidativo na reprodução.	
Figura 20: _____	48
Variação no número de células (A) e na viabilidade celular (B) das diferentes colheitas de <i>cumulus oophorus</i> .	
Figura 21: _____	49
Aspecto morfológico das células do <i>cumulus oophorus</i> em cultura ao longo do tempo. Ao fim de 2 dias em cultura as células encontram-se já totalmente aderentes à superfície da placa. Aos 4 dias as células estabeleceram já contactos entre elas que lhes permite crescer e proliferar.	
Figura 22: _____	50
Células em cultura submetidas à coloração Hematoxilina-Eosina. No terceiro dia as células encontram-se totalmente aderentes às lamelas exibindo longos prolongamentos citoplasmáticos. Aos 5 começam a aparecer algumas figuras mitóticas. A proliferação continua até se atingir um estado de confluência por volta dos 15 dias.	

Figura 23: _____ **50**

Células em cultura coradas com Sudão III/IV. Com 3 dias todas as células possuem gotas lipídicas, o que já não se verifica aos 15 dias.

Figura 24: _____ **51**

Ultra-estrutura das células do *cumulus oophorus*. N: Núcleo; Nu: Nucléolo; L: Gota Lipídica; M: Mitocôndria; RER: Retículo Endoplasmático Rugoso; REL: Retículo Endoplasmático Liso; Seta: Membrana Citoplasmática; Elipse: Junção de hiato.

Figura 25: _____ **52**

Imunodeteção da MnSOD e CuZnSOD em células de *cumulus oophorus*. Ao longo de toda a cultura, todas as células apresentam marcação para as enzimas MnSOD e CuZnSOD.

Figura 26: _____ **53**

Representação gráfica dos valores da actividade da SOD total nas colheitas de *cumulus oophorus* em função da causa de infertilidade. (A), e respectiva tabela de valores com indicação do número de colheitas (n) para cada factor de infertilidade (B). Valores apresentados como Média $\pm$ Erro padrão. * $p < 0,05$ quando comparado com o factor masculino.

Figura 27: _____ **54**

Representação gráfica dos valores da actividade da SOD total nas células de *cumulus oophorus* em função idade das pacientes (A) e respectiva tabela de valores com indicação do número de colheitas utilizadas (n) para cada grupo de idades (B).

Figura 28: _____ **55**

Variação da quantidade das isoformas intracelulares da SOD de acordo com a causa de infertilidade das pacientes. (A) Isoforma mitocondrial MnSOD; (B) Isoforma citoplasmática CuZnSOD.

Figura 29: _____ **56**

Variação da quantidade das isoformas intracelulares da SOD de acordo com a idade das pacientes. (A) Isoforma mitocondrial MnSOD; (B) Isoforma citoplasmática CuZnSOD.

LISTA DE ABREVIATURAS

8OHdG: 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina
ABC: complexo estreptavidina-peroxidase
AH: Ácido Hialurónico
AMH: Hormona anti-Mülleriana
ARNm: Ácido Ribonucleico mensageiro
BCS: *Bathocuproinedisulfonic acid*
BMP: *Bone Morphogenetic Protein*
cAMP: Adenosina Monofosfato cíclica
CAT: Capacidade Antioxidante Total
CCO: células do *cumulus oophorus*
c-Kit: receptor cínase de tirosina para o ligando Kit
COC: complexo ovócito-*cumulus*
CuZnSOD: Dismútase do Superóxido-Cobre/Zinco
DOC: Desoxicolato
DTT: Ditioneitol
EDTA: Ácido Etilenodiaminotetracético
E-SOD: Dismútase do Superóxido Extracelular
FIV: Fertilização *In Vitro*
FSH: Hormona estimuladora dos folículos
FSHR: Receptor da Hormona Estimuladora dos folículos
GDF: Factor de Crescimento e Diferenciação
GnRH : Hormona libertadora de gonadotrofinas
H₂O₂: Peróxido de Hidrogénio
HBSS: *Hanks Balanced Salt Solution*
hCG: Gonadotrofina Coriónica humana
ICSI: Injecção Intracitoplasmática de Espermatozóides
LH: Hormona luteinizante
LK: Ligando Kit
MnSOD: Dismútase do Superóxido-Manganês
NBT: *NitroBlue Tetrazolium*
O₂^{•-}: anião Superóxido
O₂: Oxigénio molecular
OH[•]: radical Hidroxilo
PMA: Procriação Medicamente Assistida
PMSF: *Phenylmethylsulfonyl fluoride*
ROS: Espécies Reactivas de Oxigénio
SDS-PAGE: Electroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SOD: Dismútase do anião Superóxido
TBS: Tampão de Tris salino
TCA: ácido tricloroacético
TGF-β: *Transforming growth factor β*

RESUMO

As técnicas de Procriação Medicamente Assistida (PMA), enquanto meios terapêuticos da infertilidade, possuem uma eficácia ainda aquém do desejável, por limitações técnicas, e associadas à qualidade de gâmetas e embriões. Dada a impossibilidade de analisar o ovócito sem o inutilizar, a avaliação do seu meio envolvente poderá auxiliar na previsão da sua qualidade. Admite-se que as células do *cumulus oophorus* (CCO), pela sua relação íntima e persistente com o ovócito, influenciam a sua qualidade e capacidade de fertilizar. Uma das acções exercidas será proteger o ovócito contra danos causados pelas espécies reactivas de oxigénio.

O stress oxidativo está envolvido em processos fisiológicos e patológicos da reprodução, mas é incerto o mecanismo que medeia a sua intervenção, bem como o papel que exercem os diferentes intervenientes (oxidantes e antioxidantes). Um destes é a enzima Dismutase do anião Superóxido, em particular as suas isoformas intracelulares, o que leva a formular a hipótese de ela contribuir para o efeito protector do ovócito exercido pelas CCO no ser humano; nesse âmbito, poderá vir a tornar-se um factor preditivo do sucesso da PMA. Para verificar a hipótese, começou-se por otimizar as condições de cultura dessas células e estudaram-se a actividade e expressão da enzima em diferentes situações clínicas de infertilidade.

As CCO humanas utilizadas foram obtidas durante os procedimentos de PMA realizados por indicação clínica. Células provenientes de pacientes diferentes foram colocadas em cultura e posteriormente processadas para detecção por imunocitoquímica das isoformas CuZnSOD e MnSOD. A actividade da SOD foi quantificada nas diferentes colheitas e relacionada com os factores de infertilidade e idade das respectivas pacientes e os teores de CuZnSOD e MnSOD foram quantificados, por *Western blotting* em homogeneizados de CCO.

Em cultura, as CCO aderem, formam extensões citoplasmáticas e depois proliferam, mantendo-se activas por um período de tempo até 15 dias. Tanto a CuZnSOD como a MnSOD foram detectadas em todas as células em cultura. A actividade da SOD, nas CCO, diminui com o envelhecimento reprodutivo. Além disso, está aumentada em pacientes com endometriose ou disfunção ovulatória, e diminuída em pacientes com infertilidade de causa tubária quando comparada com a actividade das CCO recolhidas de mulheres controlo (infertilidade de causa masculina).

A cultura de CCO mostra que é possível utilizá-las para melhor conhecer mecanismos moduladores da reprodução humana. As alterações encontradas na actividade e teor das isoformas da SOD, indicam que o stress oxidativo é um interveniente importante na reprodução humana e na sua patologia. Os seus moduladores devem por isso ser considerados marcadores potenciais de predição de sucesso em PMA.

SUMMARY

Assisted Reproductive Techniques (ART) as therapeutic tools for infertility have an effectiveness far behind the desirable. Apart from the obvious technical limitations, ART success also depends on the quality of gametes and embryos. Once it's impossible to analyze the oocyte and maintain its use for fertilization, the study of its surrounding environment may help to predict oocyte quality. Based on experimental data, and their persistent and intimate relationship with the oocyte, it is likely that *cumulus oophorus* cells (COC) influence oocyte quality and fertilization potential. One of their possible effects is the protection of the oocyte against damage caused by reactive oxygen species.

Oxidative stress is involved both in physiologic and pathologic processes of reproduction. However, the mechanism behind its intervention and the role of the different intervenients (oxidants and antioxidants) are still unknown. One of these is Superoxide Dismutase, particularly its intracellular isoforms, which lead to hypothesize that SOD contributes to the protective effect on the oocyte, exerted by human COC; being so, it could be used as a predictive factor for ART success. To confirm the hypothesis, COC culture conditions were optimized and SOD activity and intracellular content were assessed for different clinical entities of infertility.

Human COC were obtained during ART procedures decided by the clinical diagnosis. Cells from different patients were cultured and processed for CuZnSOD and MnSOD detection by immunocytochemistry. SOD activity was quantified for the individual samples of COC and analyzed based on the factor for infertility and on the age of the corresponding patients, and CuZnSOD and MnSOD contents were quantified by *Western blotting* in COC homogenates.

In culture, COC adhered, forming cytoplasmic processes, before they started proliferating, and remained active for a period of time till 15 days. Both CuZnSOD and MnSOD were detected in all the cultured cells. SOD activity, measurable in COC, decreased with reproductive ageing. Besides, it increased in patients with endometriosis or ovulatory dysfunction, and was reduced in patients with tubal infertility compared with control patients (male factor infertility).

Cumulus oophorus culture shows that they can be used to a better understanding of the mechanisms that modulate human reproduction. SOD activity and intracellular content variations found herein, indicate that oxidative stress is an important intervenient in human reproduction and its pathology. Its modulators may be considered as potential predictors for ART success.

INTRODUÇÃO

1. O ovário humano¹

1.1. Anatomia

Os ovários da mulher, são órgãos em forma de amêndoa que se localizam na cavidade abdominal, um de cada lado do útero, e desempenham duas funções essenciais: libertação de um gameta feminino, um óvulo, em cada ciclo menstrual (função gametogénica) e produção de hormonas, esteróides na sua maioria (função endócrina).

Histologicamente, num corte longitudinal, é possível identificar no ovário duas zonas distintas: uma zona externa, o córtex, e uma zona interna, a medula. O córtex encontra-se revestido pelo epitélio germinativo, e imediatamente abaixo dele possui uma camada de tecido conjuntivo fibroso, a túnica albugínea, e uma zona mais interna que contém os folículos (Figura 1). Estes constituem unidades funcionais do ovário e são estruturalmente compostos por um ovócito rodeado por uma ou mais camadas de células somáticas. Os folículos que não se encontram em crescimento, ou quiescentes, estão distribuídos numa zona relativamente avascular no córtex, abaixo da túnica albugínea, enquanto que os folículos em crescimento, os atresícos e os corpos lúteos em involução se encontram distribuídos na zona do córtex mais próxima da medula, que é densamente vascularizada. A medula é constituída por tecido conjuntivo de densidade variável e contém células do estroma, vasos sanguíneos, linfáticos e tecido embrionário residual como o *rete ovarii*.

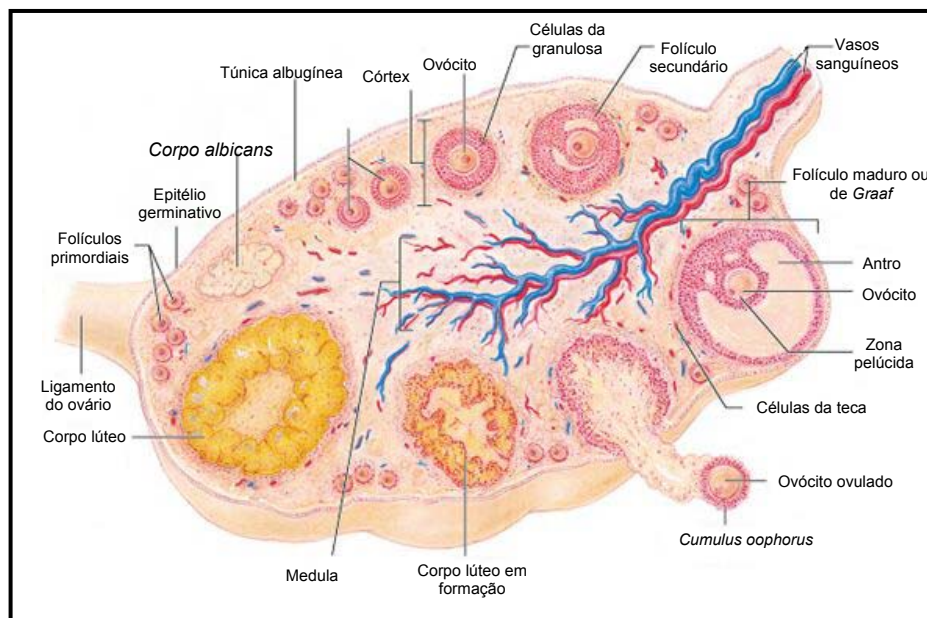


Figura 1: Representação esquemática do ovário humano.

Adaptado de Chariho Middle School Library Media Center 2007 , Reproduction

¹ As descrições teóricas que se encontram neste capítulo são baseadas nos livros de texto da autoria de Leung e Adashi (2004) e Strauss e Barbieri (2004), encontrando-se todas as outras citações devidamente referenciadas.

1.2. Ciclo menstrual

Na mulher, a função reprodutiva normal envolve a repetição cíclica de processos como o desenvolvimento folicular, ovulação e preparação do endométrio para a implantação. Cada um destes ciclos designa-se ciclo menstrual (Figura 2). Este padrão de ciclos ovulatórios regulares é conseguido pela integração de sinais estimulatórios e inibitórios provenientes do hipotálamo, hipófise anterior e ovário.

O hipotálamo é responsável pela secreção pulsátil de hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH) para o sistema vascular que o liga à hipófise. Nesta, a GnRH regula a síntese e a subsequente secreção da hormona estimuladora dos folículos (FSH) e da hormona luteinizante (LH) para a corrente sanguínea. A FSH e a LH estimulam o desenvolvimento folicular, a ovulação e a formação do corpo lúteo assim como a secreção coordenada de estradiol, progesterona, inibina A e inibina B.

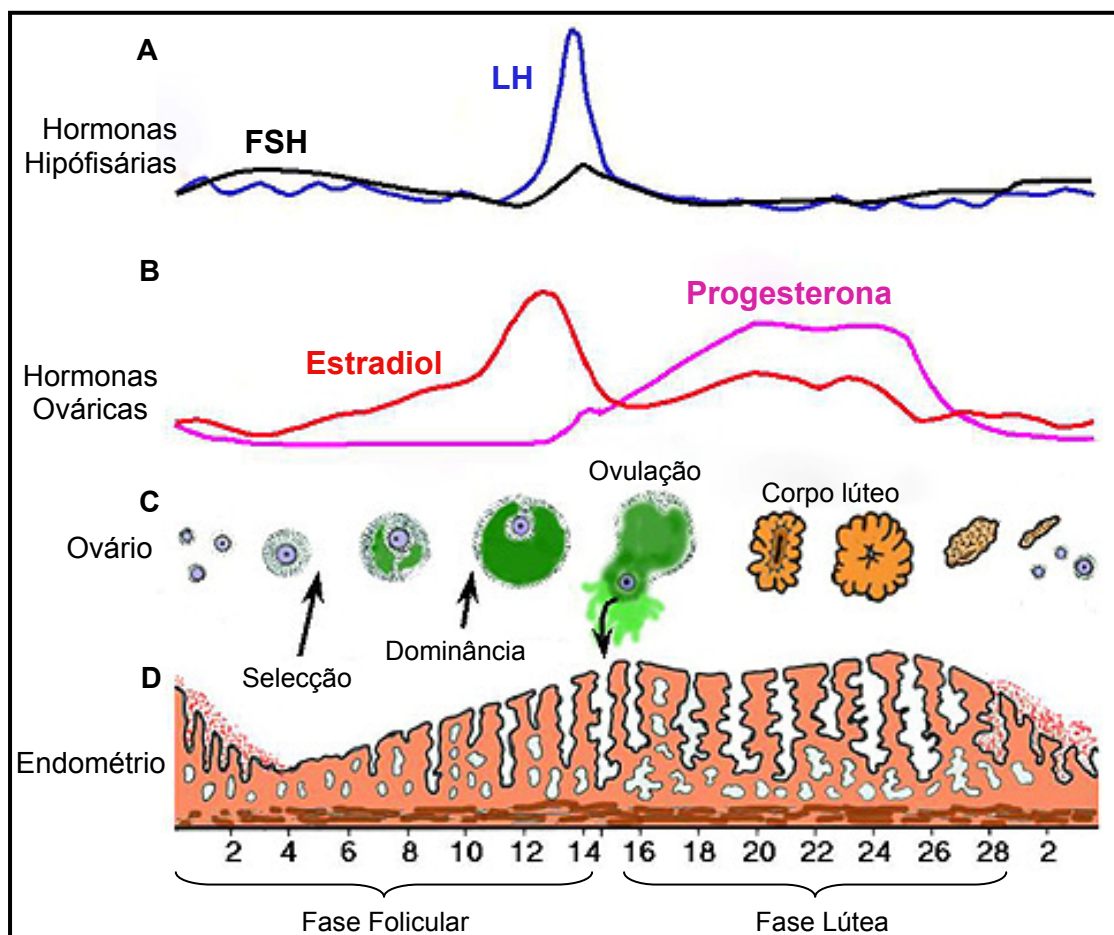


Figura 2: Ciclo menstrual. A - Variação da concentração das hormonas hipofisárias, FSH e LH; B - Variação da concentração das hormonas ovárias, estradiol e progesterona; C - Alterações associadas ao crescimento folicular; D - Alterações ao nível da proliferação e degeneração do endométrio.

Adaptado de <http://www.wisc.edu>

Um componente essencial deste sistema é o efeito modulador dos esteróides ováricos e inibinas na secreção das gonadotrofinas, quer pela acção directa na hipófise, quer indirectamente por alterações na amplitude e frequência de secreção de GnRH. A inibição da secreção de FSH por “feedback” negativo é crucial para o desenvolvimento de um único folículo maduro, característico dos ciclos reprodutivos da mulher. Adicionalmente à regulação por “feedback” negativo, o ciclo menstrual é também regulado por “feedback” positivo, na medida em que o estradiol produzido vai induzir o aparecimento do pico de LH, que é essencial para a ovulação.

A duração do ciclo menstrual é habitualmente de 28 dias, podendo variar, na maioria dos casos, entre 25 a 35 dias. Na maior parte da vida reprodutiva da mulher, a duração do ciclo é pouco variável, embora imediatamente após a menarca e antes da menopausa ocorram variações que se devem essencialmente a variações da duração da fase folicular, uma vez que a duração da fase lútea é, normalmente, constante.

A fase folicular do ciclo menstrual inicia-se no primeiro dia da menstruação, compreende o período do recrutamento de folículos, selecção do folículo dominante e proliferação do endométrio, e termina no dia em que surge o pico de LH. Durante esta fase o folículo dominante aumenta cerca de 2 mm por dia até ao dia da ovulação, enquanto aumentam os níveis de estradiol plasmático. Como resposta ao aumento exponencial de estradiol no fim da fase folicular, os níveis de LH sobem cerca de dez vezes por um período de dois a três dias enquanto os de FSH o fazem cerca de quatro vezes. Este aumento de gonadotrofinas a meio do ciclo é determinante para a maturação final do folículo dominante e a ruptura folicular, que ocorre normalmente cerca de 36h após esse pico. A terminação do pico de gonadotrofinas encontra-se associada com a diminuição dramática na amplitude e frequência dos pulsos de GnRH gerados pelo hipotálamo. Esta diminuição é devida, pelo menos em parte, ao efeito da progesterona, cujos níveis entretanto aumentam.

A fase lútea, que se segue à ovulação, é caracterizada pela formação do corpo lúteo, pelas modificações celulares na camada granulosa, pela secreção de progesterona e pelo conjunto de alterações coordenadas no endométrio, preparatórias da implantação. A diminuição da amplitude e frequência dos pulsos de GnRH que se observa no final da fase folicular continua-se ao longo da fase lútea aparentemente pela acção concertada do aumento dos níveis de progesterona durante esta fase e da presença de estradiol. A secreção concomitante de estradiol e progesterona é responsável pelas alterações proliferativas e secretoras que ocorrem ao nível do endométrio, preparando-o para a implantação no caso da ocorrência de uma gravidez. Na fase lútea verifica-se também o aumento da amplitude dos pulsos de LH e a inibição da secreção de FSH pelo estradiol e possivelmente pela inibina A.

No caso de não ocorrer fertilização do óvulo, o corpo lúteo degenera e os níveis de estradiol e inibina A diminuem, assim como os de progesterona. Tal permite aliviar a frenagem de FSH, que aumenta na circulação, e leva ao recrutamento de um novo grupo de folículos ainda antes da ocorrência da descamação do endométrio. Inicia-se assim um novo ciclo menstrual.

1.3. Oogénese e composição da reserva ovárica

No ser humano, a partir da terceira semana pós-fertilização é possível identificar na endoderme do saco vitelino as células germinativas primordiais, de grandes dimensões e citoplasma claro, com poucos organelos, comparativamente com as restantes células da endoderme. No início da quarta semana essas células começam a proliferar e a migrar do epitélio do saco vitelino para a porção posterior do tubo digestivo. Aí, atravessam o mesentério dorsal e alcançam por fim as cristas genitais por volta das seis semanas (Figura 3). Estas células são nesta fase designadas oogónias.

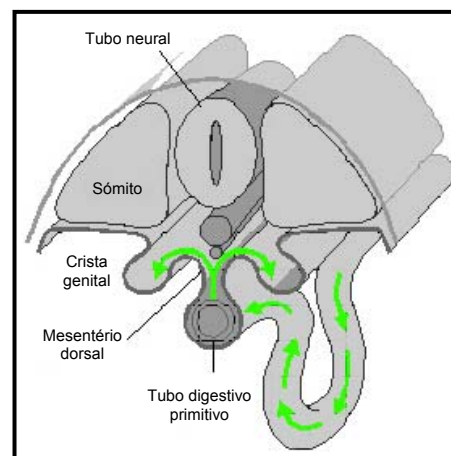


Figura 3: Migração das células germinativas primordiais durante o desenvolvimento embrionário.

Adaptado de Memorial University, Canada, Biology Department

Entre a sexta e a sétima semanas, as oogónias multiplicam-se por mitose alcançando cerca de 600 000 células pela oitava semana após a fecundação. Entre a oitava e décima terceira semana, algumas oogónias entram na profase da primeira divisão meiótica, o que marca a sua conversão em ovócitos primários. A meiose confere protecção temporária contra a atresia das oogónias, permitindo assim que estas células germinativas sejam envolvidas por células foliculares pavimentosas de modo a formarem folículos primordiais. Em consequência dos processos de mitose, meiose e atresia, o número de células germinativas atinge um máximo de seis a sete

milhões por volta das vinte semanas. Cerca da vigésima quarta semana, quase todas as células germinativas, agora designadas ovócitos primários, passaram pelas primeiras subfases da profase da primeira divisão meiótica e encontram-se paradas na subfase de diplóteno, usualmente designada por dictióteno.

As oogónias que atingem o sétimo mês de gestação sem entrarem em meiose sofrem apoptose, e já não são detectáveis na altura do nascimento.

Os ovócitos primários são então envolvidos por uma camada de células foliculares, ou pré-granulosa, pavimentosas, e constituem os folículos primordiais. Apesar de alguns destes folículos começarem a crescer quase imediatamente, a maior parte deles permanece num estado quiescente até degenerarem ou entrarem na fase de crescimento folicular.

Após o nascimento, o grupo de folículos em estado quiescente constitui a chamada reserva ovária. Esta inclui os folículos primordiais, folículos em transição e os folículos primários pequenos. Estima-se que na altura do nascimento, o número de células germinativas que constitui a reserva ovária da mulher é de 1 a 2 milhões de células.

Na mulher, tal como nos restantes mamíferos, o tamanho da reserva ovária diminui drasticamente com a idade. Os folículos deixam de pertencer ao grupo de folículos quiescentes de um modo contínuo, ou pela sua entrada na fase de crescimento ou pela sua eliminação por apoptose. Tendo em conta o número de folículos em crescimento nos ovários ao longo da vida, admite-se que cerca de 85% da reserva ovária é eliminada por apoptose, principalmente durante a infância e início da vida adulta. No início da puberdade estima-se que existam apenas cerca de 300.000 células germinativas nos folículos que constituem a reserva ovária, e destes folículos apenas 400 a 500 chegarão a ovular durante o tempo de vida reprodutivo da mulher.

O processo responsável pela diminuição do número de folículos que constituem a reserva ovária é a atresia folicular, um evento mediado pela apoptose. Nos folículos com diâmetro inferior a 1 mm, a primeira célula a sofrer apoptose é o ovócito, levando a que estes folículos passem a exibir um contorno irregular. Por outro lado, nos folículos com diâmetro superior a 1 mm, o ovócito persiste por mais tempo, sendo as células da granulosa as primeiras a entrar em apoptose, seguidas pelas células da teca. A apoptose tanto pode ser desencadeada por via extrínseca, que envolve a activação de receptores de morte, ou por via intrínseca, ou mitocondrial. Independentemente da via que é activada, dá-se a activação de caspases iniciadoras (caspases 8 e 9) que por sua vez vão activar as caspases efectoras (caspases 3, 6 e 7). As caspases efectoras activadas irão clivar múltiplos alvos celulares como por

exemplo proteínas citoplasmáticas do citoesqueleto e proteínas nucleares, levando à morte celular. Na maioria dos casos, a escolha entre a sobrevivência ou morte por apoptose depende da razão entre factores anti-apoptóticos e pró-apoptóticos. Estudos em ratinhos demonstram que, entre estes factores, as proteínas Bcl-2 (carácter anti-apoptótico) e Bax (carácter pró-apoptótico) estão envolvidas na regulação da apoptose em folículos quiescentes, não se sabendo porém quais os sinais que iniciam a cascata apoptótica que leva à atresia folicular.

1.4. Desenvolvimento folicular

1.4.1. Aspectos morfológicos

Estruturalmente, os folículos ovários apresentam forma esférica ou ovóide e são constituídos por um número variável de camadas de células somáticas concêntricas à volta de um único gâmeta feminino redondo, o ovócito.

A reserva ovária é constituída por folículos primordiais, que consistem num ovócito primário rodeado por uma única camada de células pavimentosas, folículos em transição, nos quais o ovócito se encontra rodeado por uma camada de células foliculares pavimentosas misturadas com algumas células da granulosa de forma cúbica, e os folículos primários pequenos, onde o ovócito se encontra rodeado por uma única camada de células da granulosa cúbicas (Figura 4). Estes folículos encontram-se em estado quiescente e possuem um ovócito primário, que se encontra parado em dictióteno, na primeira divisão meiótica.

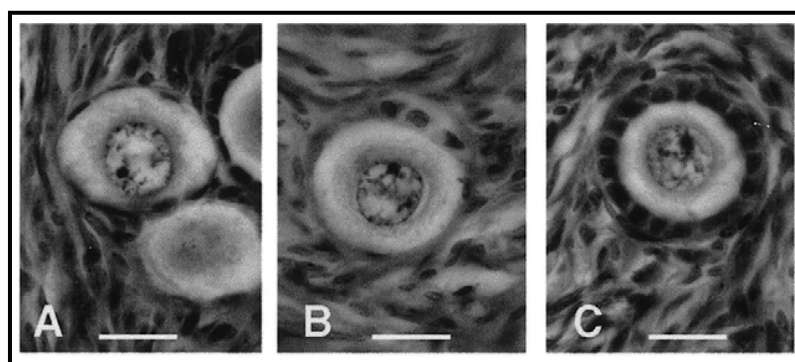


Figura 4: Composição da reserva ovária. A- Folículos primordiais; B- Folículo em transição; C- Folículo primário pequeno. Barra = 18 μ m. Adaptado de *Leung e Adashi, 2004*

Quando os folículos são recrutados para iniciar a fase de crescimento, aumentam de tamanho como resultado da proliferação das células da granulosa e do aumento do tamanho do ovócito. São então designados folículos primários grandes e

possuem uma única camada de células da granulosa, de forma cúbica, a rodear um ovócito primário agora de dimensões maiores (Figura 5). À medida que o ovócito aumenta de tamanho, são detectadas alterações nos seus organelos: expansão do complexo de Golgi e do retículo endoplasmático; enriquecimento do retículo endoplasmático em ribossomas; aumento da quantidade de ribossomas livres e do número de mitocôndrias. É pouco depois da iniciação do crescimento folicular, ainda como folículo primário, que se inicia a síntese da zona pelúcida, uma camada de glicoproteínas que envolve directamente o ovócito e o acompanha aquando da ovulação e mesmo depois. A sua presença e composição são cruciais para o processo de adesão e penetração do espermatozóide.

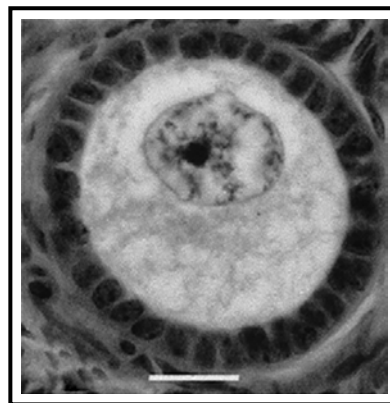


Figura 5: Folículo primário grande. Barra = 20 μm . Adaptado de *Leung e Adashi, 2004*

Desde a fase de folículo primordial que o conjunto das células da granulosa de cada folículo se encontra envolvido por uma membrana basal que as separa das células do estroma e dos restantes elementos celulares do ovário. Por proliferação das células da granulosa, que progressivamente originam duas ou mais camadas de células, os folículos primários grandes passam a designar-se folículos secundários (Figura 6A). Enquanto que os folículos em crescimento mais pequenos não possuem qualquer vascularização, os folículos secundários passam a ser irrigados por uma ou duas arteríolas que terminam numa rede anastomótica imediatamente externa à membrana basal. Este facto é fisiologicamente importante dado que a partir deste ponto o folículo fica directamente exposto a factores que circulam na corrente sanguínea. Do lado externo da membrana basal, algumas células do estroma ovárico que lhe estão próximas começam a organizar-se numa disposição paralela entre elas, constituindo a camada da teca. À medida que o folículo cresce, essa camada estratifica ainda mais e diferencia-se em duas zonas. A mais externa, a teca externa, possui células muito semelhantes às do estroma ovárico e é rica em fibras de colagénio desempenhando a função de suporte. Na mais interna, a teca interna, as

células do tipo fibroblasto assumem a morfologia típica de células secretoras de esteróides. O aparecimento destas duas zonas na camada da teca acontece apenas quando o folículo possui 3 a 6 camadas de células da granulosa, e é nessa ocasião que os folículos passam a ser designados folículos pré-antrais (Figura 6B).

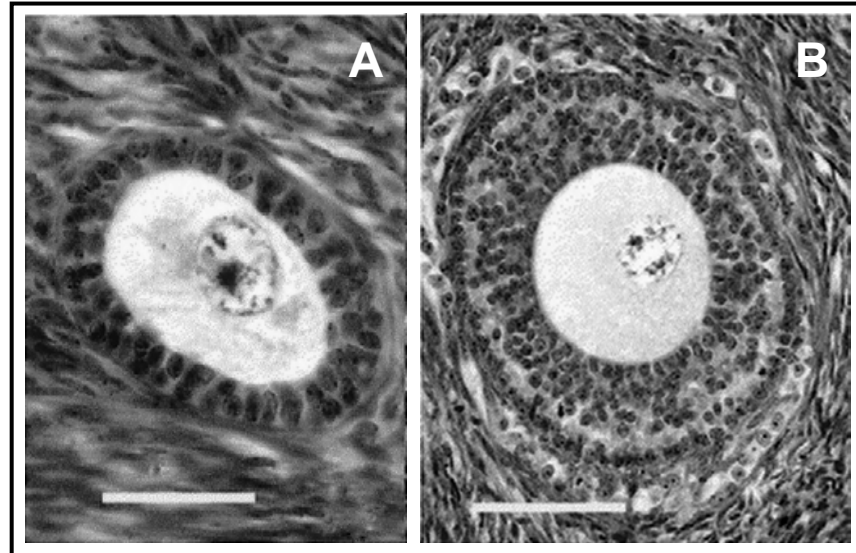


Figura 6: **A** – Folículo secundário. Barra = 40 μm . **B**- Folículo pré-antral. Barra = 75 μm .

Adaptado de Leung e Adashi, 2004

O aparecimento de pequenas cavidades cheias de fluido folicular entre as células da granulosa marcam o aparecimento do antro e nesta fase estamos perante um folículo antral inicial (Figura 7A e 7B). As células da granulosa que se mantêm a envolver o ovócito designam-se *cumulus oophorus*. Estas células estabelecem junções de hiato com o ovócito através de prolongamentos citoplasmáticos que atravessam a zona pelúcida e contactam com a membrana citoplasmática ovocitária. As junções de hiato permitem a comunicação directa do citoplasma de células adjacentes, possibilitando a troca de iões e pequenas moléculas entre estas. Estudos realizados em ratinhos deficientes em conexina-37, a proteína transmembranar expressa no ovócito que se une à conexina-43 das células da granulosa, demonstraram que estas junções desempenham um papel crítico na fase final da maturação folicular (Simon *et al.*, 1997).

Nos primatas, tal como na maioria dos mamíferos, pouco depois da formação da cavidade antral, as células da granulosa que assentam na membrana basal perdem a sua forma cúbica e assumem morfologia prismática, enquanto que as restantes células da granulosa permanecem cúbicas. Os folículos antrais iniciais apresentam um diâmetro compreendido entre 180 e 250 μm .

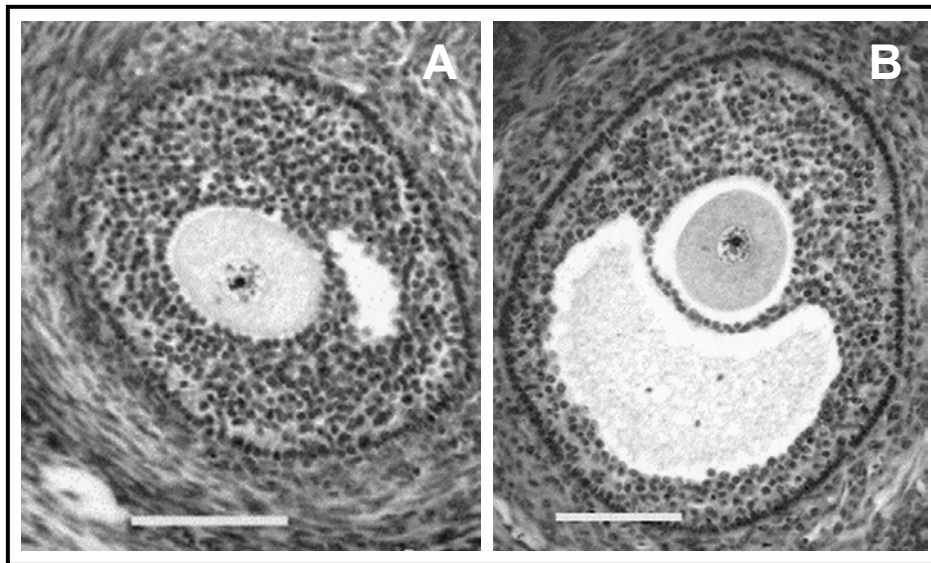


Figura 7: **A** – Folículo antral inicial: início da formação do antro. Barra = 100 μm . **B**- Folículo antral inicial: as células da granulosa que se encontram a envolver o ovócito designam-se *cumulus oophorus*. Barra = 90 μm .

Adaptado de Leung e Adashi, 2004

A acumulação de fluido folicular na cavidade antral juntamente com a proliferação das células da granulosa e das células da teca interna levam à progressão do folículo antral inicial para folículo antral pequeno (Figura 8A e 8B) e por fim para folículo maduro seleccionável (Figura 8C).

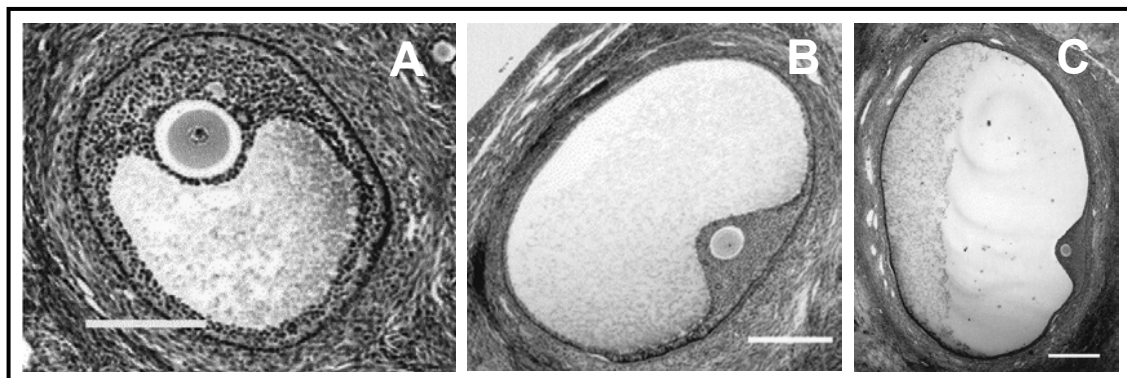


Figura 8: **A** – Folículo antral pequeno com 0,5-0,9 mm. Barra = 160 μm . **B**- Folículo antral pequeno com 1-2 mm. Barra = 300 μm **C**- Folículo maduro seleccionável com 2-5 mm. Barra = 530 μm .

Adaptado de Leung e Adashi, 2004

O número de ovulações por cada ciclo é variável e depende da espécie de mamífero, sendo assim necessário ocorrer um processo de selecção pelo qual o grupo de folículos que se encontra em crescimento seja reduzido para um número menor de folículos habilitados a ovular. No caso da mulher, em cada ciclo menstrual é

seleccionado apenas um folículo, designado folículo dominante, e é esse que vai ovular.

Na fase folicular inicial, não existem diferenças morfológicas evidentes entre o folículo seleccionado e os restantes folículos saudáveis do grupo. No entanto, o folículo dominante continua o seu crescimento e distingue-se dos restantes pelo tamanho e elevada actividade mitótica das suas células da granulosa. Durante essa última fase de crescimento as células da granulosa sofrem alterações morfológicas evidentes: o seu volume individual aumenta, e cerca de 30% da membrana citoplasmática é ocupada por junções de hiato. Os folículos não seleccionados acabam por desaparecer por atresia.

1.4.2. Regulação do crescimento folicular

O mecanismo fino que regula a entrada dos folículos na fase de crescimento é por enquanto desconhecido. No entanto, para que haja progressão dos folículos pelas fases sucessivas de desenvolvimento folicular, é necessário que exista comunicação bidireccional entre o ovócito e as células da granulosa e entre estas e as células da teca. Muitas das moléculas sinalizadoras extracelulares envolvidas nesta comunicação pertencem à superfamília do TGF- β – *Transforming growth factor β* . Para além destas moléculas existem ainda outras que desempenham funções cruciais na regulação do crescimento folicular, como por exemplo o sistema *c-Kit* /ligando Kit, as gonadotrofinas e hormonas esteróides.

A superfamília do TGF- β divide-se em várias subfamílias como por exemplo a subfamília do TGF- β , composta pelos TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3, a subfamília das BMP (*Bone Morphogenetic Protein*), a subfamília GDF (Factor de Crescimento e Diferenciação), a subfamília Activina/Inibina, que inclui as activinas A, AB e B, e as inibinas A e B, e ainda membros adicionais como é o caso da AMH (Hormona Anti Mülleriana). A maioria dos membros da superfamília TGF- β exerce a sua acção nas células alvo pela ligação a receptores cínases de Serina/Treonina existentes na membrana citoplasmática, que podem ser do tipo I ou II.

Recrutamento folicular

Diversos estudos em várias espécies de mamíferos comprovam o envolvimento de determinados membros da superfamília do TGF- β no recrutamento e transição de folículos primordiais para folículos primários (Figura 9). A expressão de BMP-4 e BMP-

7 pelas células da teca ou pelas células do estroma do ovário promove a transição entre a fase de folículo primordial para folículo primário. O GDF-9, BMP-15 e BMP-6 são selectivamente expressos pelos ovócitos de folículos em fases iniciais. Adicionalmente, os receptores tipo I e II através dos quais cada um destes factores pode actuar são expressos pelas células pré-granulosa e granulosa dos folículos iniciais correspondentes, tornando estas células alvos potenciais para a sinalização parácrina. O GDF-9 e/ou o BMP-15 (uma vez que existe grande variabilidade entre espécies) demonstraram ser essenciais para a progressão para além da fase de folículo primário uma vez que vão exercer uma acção parácrina nas células somáticas circundantes. Adicionalmente, a AMH inibe a iniciação do crescimento de folículos primordiais. Este factor é expresso pelas células da granulosa de folículos primários em crescimento, estando ausente nos folículos primordiais, o que sugere que os folículos em crescimento vão exercer uma influência inibitória nos folículos primordiais quiescentes (*Knight P.G. e Glister C., 2006*).

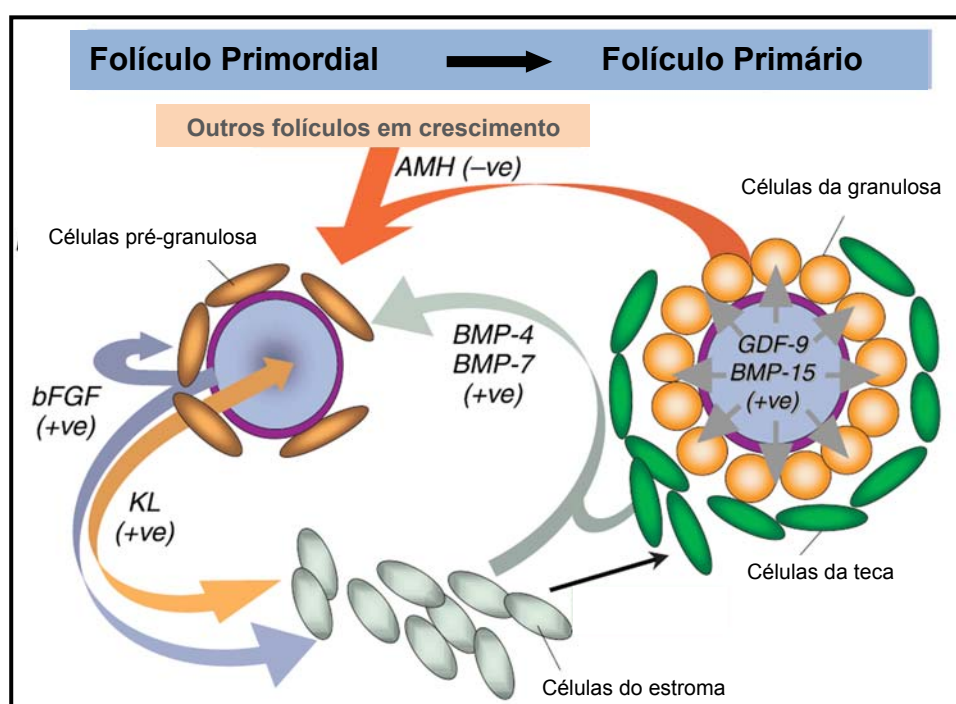


Figura 9: Representação esquemática de potenciais interações envolvidas na transição de folículo primordial para folículo primário. (-ve): efeito inibitório; (+ve): efeito estimulatório.

Adaptado de *Knight P.G. e Glister C., 2006*

Para além da influência de factores membros da superfamília do TGF- β , o sistema *c-Kit*/ligando Kit parece também ele desempenhar um papel fundamental na iniciação do crescimento folicular. O ligando Kit (LK) é um factor de crescimento que exerce a sua função nas células alvo por ligação ao receptor cinase de tirosina, *c-Kit*.

Uma vez que o LK é expresso pelas células da pré-granulosa e o *c-Kit* é expresso pelas células da teca e pelo ovócito, o LK actuará por via parácrina. Para além de intervir na transição de folículos primordiais para folículos primários, este ligando encontra-se também envolvido na estimulação do crescimento do ovócito, e recrutamento e proliferação das células da teca (*Hutt et al., 2006*).

Algumas das células do estroma ovárico que envolvem os folículos primordiais produzem um outro péptido, o factor de crescimento de queratinócitos (KGF) também designado por FGF-7 (*Fibroblast Growth Factor-7*) que vai aumentar a expressão de LK pelas células da granulosa, que por sua vez induz a proliferação das células da teca e o crescimento do ovócito (*Kezele et al., 2005*). Adicionalmente, o FGF-2, outro membro da família FGF, é expresso pelo ovócito dos folículos primordiais e estimula também a expressão de LK pelas células da granulosa, promovendo a transição de folículo primordial para folículo primário (*Nilsson e Skinner, 2004*).

O desenvolvimento dos folículos primários em folículos pré-antrais ou antrais iniciais implica o aumento do tamanho do ovócito, a formação da zona pelúcida, a proliferação extensiva das células da granulosa de modo a formar várias camadas, a condensação das células do estroma à volta da membrana basal, agora mais evidente, de modo a formar a camada das células da teca e o desenvolvimento de espaços cheios de fluido que coalescem gradualmente de modo a formar uma única cavidade antral. A formação da camada das células da teca prossegue em associação com a vascularização do folículo a partir das arteríolas, formando uma rede de capilares que envolve a sua membrana basal. Concomitantemente, as células da teca começam a expressar receptores da LH e adquirem a capacidade de sintetizar hormonas esteróides.

Varios membros da superfamília do TGF- β funcionam como reguladores positivos do crescimento de folículos pré-antrais. Estes são o GDF-9 e o BMP-15 de origem ovocitária, activinas produzidas pelas células da granulosa e BMP-4 e BMP-7 produzidos pelas células da teca. Outros membros desta mesma família funcionam como reguladores negativos, como a já mencionada AMH, que inibe a proliferação das células da granulosa nos folículos quiescentes. Na transição de folículo primário para folículo pré-antral o BMP-4 e o BMP-7, sintetizados pelas células da teca, estimulam a proliferação das células da granulosa, o que resulta no crescimento do folículo pré-antral. Adicionalmente, o GDF-9 e o BMP-15, produzidos pelo ovócito, são essenciais para a progressão para além da fase de folículo primário, embora a importância do BMP-15 apresente variações entre espécies. Por sua vez, a activina estimula a proliferação das células da granulosa e aumenta a expressão nestas do receptor para

a FSH (FSHR), tornando, a partir deste momento, o folículo sensível à acção desta gonadotrofina.

A progressão do folículo para a fase antral está associada com a proliferação continuada das células da granulosa e da teca, o aumento da vascularização da teca, o aumento do tamanho do ovócito e o aumento rápido do diâmetro e volume do folículo. O aumento do tamanho e da complexidade do folículo vai influenciar as acções de moléculas sinalizadoras secretadas por compartimentos intrafoliculares diferentes. Deste modo, diferentes tipos de células no mesmo folículo encontram-se expostas e respondem a diferentes combinações de moléculas sinalizadoras dependendo da posição relativa que assumem e do facto de expressarem ou não os receptores específicos (Figura 10).

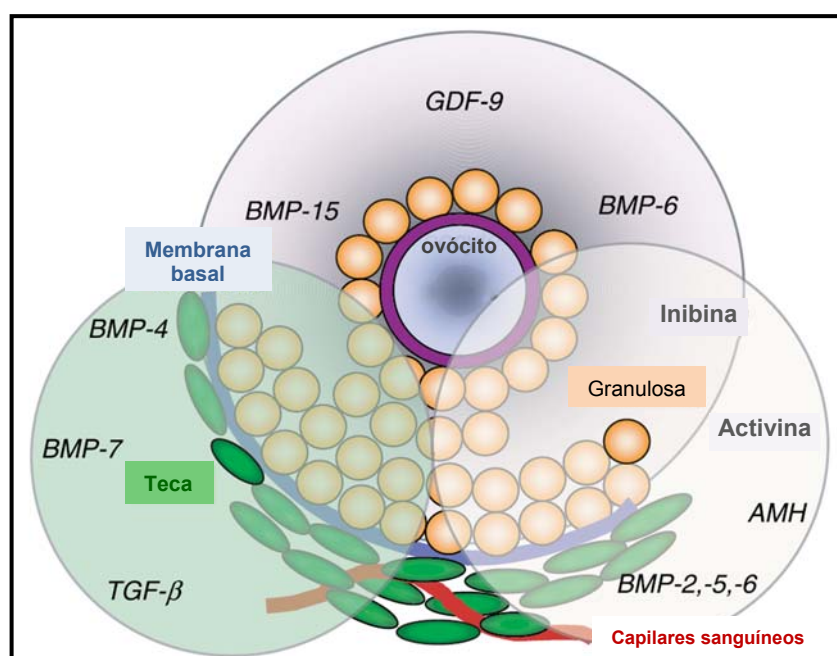


Figura 10: Cada célula responde a diferentes combinações de moléculas sinalizadoras de acordo com a sua posição relativa no folículo antral.

Adaptado de Knight e Glistler, 2006

A transição de um folículo pré-antral para folículo antral é promovida pela FSH. A partir do momento em que o folículo atinge a fase antral, a sua sobrevivência e crescimento tornam-se dependentes da presença desta gonadotrofina.

A expressão de diversos BMPs e do GDF-9 nos diferentes compartimentos do folículo antral tem sido alvo de estudo em diversas espécies de mamíferos incluindo roedores, ruminantes e o ser humano. Sucintamente, os ovócitos expressam BMP-6, BMP-15 e GDF-9, as células da granulosa expressam BMP-2, BMP-5 e BMP-6 e as células da teca expressam BMP-2, BMP-4 e BMP-7. Deste modo, o GDF-9 e o BMP-

15 expressos pelos ovócitos de folículos antrais induzem a proliferação das células da granulosa que os rodeiam. Tanto o BMP-15 como o BMP-6 ovocitários são capazes de atenuar a acção da FSH nas células da granulosa, o BMP-15 pela diminuição da síntese de FSHR e o BMP-6 por inibição da actividade da enzima adenilato ciclase. Estes três factores com expressão ovocitária (BMP-15, BMP-6 e GDF-9), são capazes de inibir a secreção de progesterona induzida pelas gonadotrofinas.

No que diz respeito aos factores expressos pelas células da granulosa, o BMP-2, BMP-5 e BMP-6 actuam por via autócrina e promovem a sobrevivência do folículo, prevenindo a sua luteinização prematura e atresia, tal como acontece pela acção do GDF-9 e BMP-15 com origem no ovócito. Adicionalmente, as activinas produzidas pelas células da granulosa de folículos pré-antrais promovem a proliferação das células da granulosa e inibem a produção de androgénios pelas células da teca. Por fim, o BMP-4 e BMP-7 secretados pelas células da teca actuam por via parácrina induzindo a proliferação das células da granulosa e aumentando a produção de estradiol, inibina e activina. Para além da função parácrina, estes factores desempenham também uma função autócrina suprimindo a secreção de androgénios induzida pela LH e estimulando a proliferação das células da teca.

É de esperar que nos próximos tempos a quantidade de conhecimento produzido em anos recentes e cuja continuidade se antevê, venha a ser melhor relacionada entre si e integrada no processo de maturação ovocitária.

Ovulação e Luteinização

Para a pequena porção de folículos que atingem a fase de folículo maduro ou ovulatório a foliculogénese termina com a libertação do complexo ovócito-*cumulus* (COC). Após a ovulação, a parede do folículo colapsa formando pregas e a membrana basal que separava as células da granulosa das células da teca interna desintegra-se. As células da granulosa e as células da teca interna sofrem modificações como hipertrofia e acumulação de gotas lipídicas e transformam-se em células luteínicas. Concluída esta transformação pós-ovulatória, a estrutura formada designa-se corpo lúteo.

O corpo lúteo sintetiza e secreta uma grande quantidade de progesterona e estradiol, essenciais para suportar um potencial estado de gravidez. Na mulher, depois de formado, o corpo lúteo torna-se uma fonte importante de inibina A, que vai estimular a síntese de progesterona. Adicionalmente, o TGF- β juntamente com a prolactina é capaz de suportar o corpo lúteo pelo aumento da produção de progesterona e supressão da apoptose. O processo de luteinização encontra-se sob o

controle de inibidores de origem ovocitária que previnem a produção de progesterona até ao momento em que o ovócito é libertado pelo processo de ovulação. Como já foi referido, o BMP-6, BMP-15 e GDF-9 são factores ovocitários capazes de actuar como inibidores do processo de luteinização, pela inibição da produção de progesterona, aumento da síntese de estradiol e aumento da proliferação das células da granulosa. Deste modo, é plausível que a perda da influência destes factores após a ovulação afecte as restantes células foliculares promovendo a sua luteinização. No caso de não ocorrer fertilização e subsequente implantação, a esteroidogénese cessa e o corpo lúteo regride (*Knight e Glister, 2006*).

Factores extra-ovários

Para além da regulação mediada por factores intra-ovários, o desenvolvimento folicular encontra-se também sob a influência de factores endócrinos extra-ovários, como são exemplo as gonadotrofinas. O crescimento folicular pode então ser dividido em três fases distintas, sendo cada uma delas influenciada por um conjunto diferente de factores (Figura 11). A progressão de folículo primordial até folículo secundário não requer a presença de gonadotrofinas e é por isso designada como fase independente de FSH. A transição de folículo pré-antral para folículo antral inicial é essencialmente regulada por factores intra-ovários. Nesta fase, as gonadotrofinas são também capazes de promover o crescimento folicular, embora a sua presença não seja crucial. Esta fase designa-se por fase respondente à FSH. O crescimento para além da fase de folículo antral até à ovulação é dependente de gonadotrofinas, uma vez que os folículos necessitam de FSH para continuarem o seu crescimento e sobreviverem (*Craig et al., 2007*).

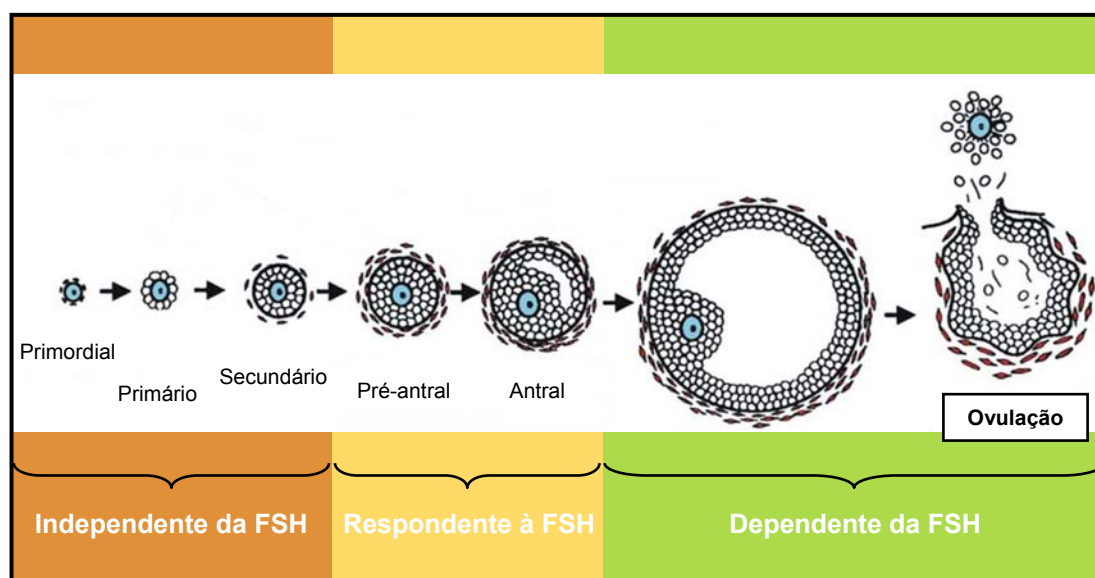


Figura 11: Desenvolvimento folicular: dependência de gonadotrofinas.

Adaptado de *Craig, et al., 2007*

1.4.3. Crescimento e maturação ovocitária

Os ovócitos em crescimento, apesar da sua aparência quiescente, são células metabolicamente activas, que expressam genes essenciais para o sucesso da fertilização e desenvolvimento embrionário que ocorre antes da implantação. De facto, na primeira fase do seu desenvolvimento, o embrião socorre-se de componentes acumulados no ovócito, graças ao transporte bidireccional permanente de nutrientes, factores de crescimento e outras moléculas através das junções de hiato existentes entre o ovócito e as células da granulosa envolventes. Durante o seu crescimento, os ovócitos sofrem algumas alterações morfológicas, como o aumento do seu tamanho e a formação da zona pelúcida, pela produção activa e secreção das glicoproteínas que a constituem.

Os ovócitos que constituem a reserva ovárica encontram-se em dictióteno na meiose I. Estes ovócitos crescem juntamente com os folículos que os contêm e apenas quando atingem uma determinada dimensão é que passam a ser capazes de retomar a divisão meiótica (Figura 12). Num estudo recente, verificou-se que os ovócitos humanos se mantêm parados em dictióteno na meiose I por uma via de sinalização associada à proteína G estimulatória (G_s) que, por activação da enzima adenilato ciclase, mantém elevados os níveis de cAMP nos ovócitos (*DiLuigi, et al., 2008*). Este cAMP activa a Proteína cínase A (PKA), do que resulta a hiperfosforilação e inactivação da cínase dependente da ciclina 1 (CDK1), que constitui o complexo CDK1/Ciclina B, anteriormente designado factor promotor da maturação ou mitose (MPF). A inactivação deste complexo bloqueia a progressão da divisão meiótica (*Mehlmann, 2005*).

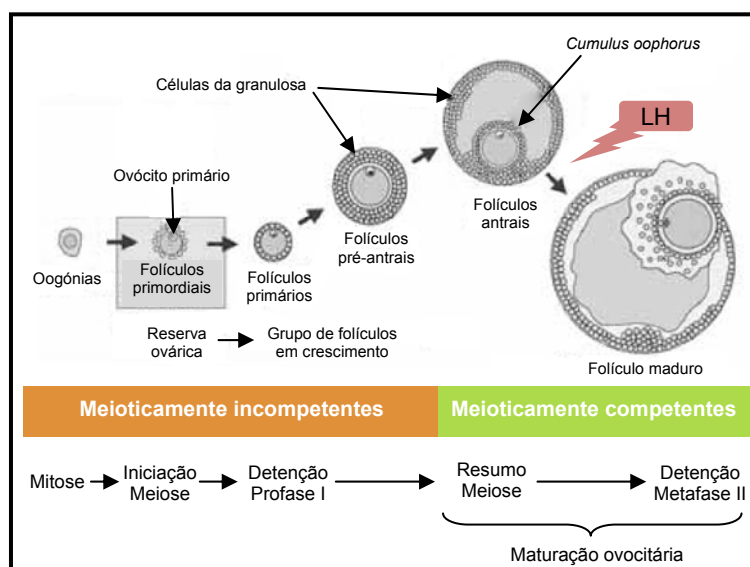


Figura 12: Desenvolvimento de ovócitos meioticamente competentes e maturação ovocitária.

Adaptado de Kimura N. et al., 2006

A progressão desde a subfase de dictióteno até à metafase II é designada maturação ovocitária e inclui as alterações nucleares e citoplasmáticas que vão permitir a fertilização do ovócito depois de libertado. A continuação da meiose é induzida pelo aumento brusco dos níveis de LH, mas o processo suspende de novo em metafase II até ao momento em que ocorre a fertilização.

Durante a maturação nuclear, o ovócito primário é convertido num ovócito secundário, uma vez que é completada a meiose I e surge o primeiro glóbulo polar. Morfologicamente, a ocorrência de maturação nuclear é detectada inicialmente pela fragmentação do invólucro nuclear. Ao entrar em contacto com o citoplasma, a cromatina condensa e direcciona-se para uma área periférica da célula onde se inicia o fuso da primeira divisão meiótica. Completa-se então a primeira divisão meiótica com a separação dos cromossomas homólogos, extrusão do primeiro glóbulo polar e divisão notoriamente assimétrica do citoplasma, que é residual no glóbulo polar. Na célula maior, o ovócito secundário, a cromatina prossegue imediatamente para a segunda divisão meiótica, os cromossomas adquirem a conformação de profase, mas não ultrapassam a metafase II. É este ovócito, em metafase II, que por ovulação é libertado para a cavidade pélvica de onde é atraído para o pavilhão tubário por acção do movimento das fimbrias das trompas de Falópio. Por fim, a segunda divisão meiótica completar-se-á com a formação do segundo glóbulo polar apenas no momento da fertilização.

A maturação citoplasmática, menos evidente que as alterações morfológicas observáveis durante a maturação nuclear, ocorre também após o aumento dos níveis de LH e é crucial para o sucesso de fertilização do ovócito e para o desenvolvimento embrionário pré-implantação, caso ocorra a fertilização. Ao nível ultraestrutural, verifica-se a alteração na distribuição das mitocôndrias, retículo endoplasmático e grânulos corticais para a região periférica do ovócito. Na zona da membrana citoplasmática mais próxima do fuso meiótico que mantém os cromatídeos em metafase II, há perda das microvilosidades, modificação importante para prevenir a entrada do espermatozóide nessa região onde se encontra a cromatina e evitar a sua interferência na progressão normal da meiose.

O aumento brusco dos níveis de LH que induzem a continuação da divisão meiótica é também responsável pela indução da ovulação. Estes dois eventos encontram-se bem coordenados, de modo a que no momento em que ocorre a ovulação o ovócito libertado já tenha terminado todo o processo de maturação e se encontre pronto a ser fertilizado.

1.5. Cumulus Oophorus

Nos folículos antrais, com a formação da cavidade antral, as células da granulosa em proliferação diferenciam-se em dois tipos de célula: as do *cumulus oophorus*, que envolvem o ovócito (Figura 13) e as células da granulosa murais que revestem a parede do folículo (Cortvrindt e Smitz, 2001).

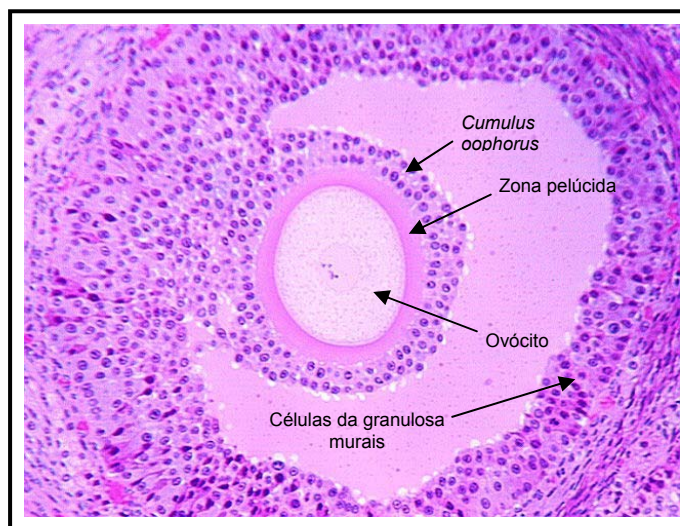


Figura 13: Cumulus oophorus.

Adaptado de www.cytochemistry.net

As células do *cumulus oophorus* são então um tipo de células da granulosa, esteroidogênicas, que rodeiam o ovócito, e se encontram envolvidas em três processos importantes já descritos: maturação do ovócito, condução do ovócito ao pavilhão imediatamente após a ovulação e participação em mecanismos que controlam o acesso dos espermatozóides ao ovócito (Tanghe et al., 2002).

Pouco antes da ovulação as células do *cumulus* sintetizam uma matriz extracelular que leva a um grande aumento das dimensões do COC e à sua libertação da parede do folículo. A este processo dá-se o nome de expansão do *cumulus oophorus*. Ao mesmo tempo que o COC se desprende da parede do folículo, dá-se a maturação ovocitária, desencadeada pelo aumento dos níveis de LH, e por fim ocorre a ruptura do folículo que culmina com a libertação do COC para a cavidade pélvica.

A matriz extracelular produzida pelas células do *cumulus oophorus* é bastante rica em ácido hialurônico (AH) e desempenha um papel importante durante o processo de ovulação, encontrando-se envolvida no processo de reconhecimento e captação do COC pelas fímbrias e também no processo de penetração do espermatozóide (Kimura et al., 2006). Adicionalmente, alguns estudos revelam que o AH influencia aspectos funcionais importantes dos espermatozóides como a motilidade e a sua capacitação (Bakhtiari et al., 2007).

2. Procriação Medicamente Assistida

2.1. Infertilidade

A infertilidade é definida como a impossibilidade em engravidar após um ano de tentativas sem recorrer a qualquer método contraceptivo (*Jose-Miller et al., 2007*). A infertilidade pode ser causada por anomalias no aparelho reprodutor feminino ou no masculino e num número substancial de casos não é possível estabelecer a causa. Na Tabela 1 estão listadas as causas específicas mais frequentes.

Tabela 1: Principais causas de infertilidade.

Adaptado de *Jose-Miller et al., 2007*

Causas de infertilidade	(%)
Inexplicada	28
Factor masculino	24
Disfunção ovulatória	21
Factor tubário	14
Endometriose	6
Outras causas	7

A causa designada como factor masculino está a maior parte das vezes relacionada com a qualidade e/ou quantidade de espermatozóides, e deve-se a disfunção testicular de causa incerta, também denominada hipogonadismo primário. Menos frequentemente identificável, o factor masculino resulta de uma desregulação hormonal alheia à gónada, que impede o seu funcionamento normal e é por isso referido como hipogonadismo secundário.

Porém, são mais comuns as causas femininas. As razões mais frequentes de infertilidade nas mulheres estão relacionadas com disfunção ovulatória, mais concretamente, irregularidade ou ausência de ovulações; outras vezes o problema é de ordem anatómica, sendo a obstrução ou distorção das trompas de Falópio a alteração anatómica mais frequente. A endometriose é uma entidade clínica também muito comum que se caracteriza pelo crescimento de tecido endometrial fora da cavidade uterina e origina manifestações clínicas já muito bem documentadas (*Teng et al., 2008; Ulukus et al., 2006; Seli et al., 2003; Sharpe-Timm, 2001*). Importa aqui referir que a infertilidade é uma das suas consequências mais problemáticas e que se pode dever a diversos mecanismos, como distorção da anatomia pélvica consequente ao processo inflamatório permanente e à reacção fibrótica subsequente, alterações na

composição do líquido folicular, perturbações da função endometrial, que podem levar a dificuldades na implantação do embrião, entre muitas outras alterações (*De Hondt et al., 2006*).

2.2. Técnicas de Procriação Medicamente Assistida

As técnicas de Procriação Medicamente Assistida (PMA) envolvem a manipulação de gâmetas (ovócitos e espermatozóides) e embriões humanos *in vitro* tendo como objectivo atingir-se a fertilização e estabelecer uma gravidez.

A lei da Assembleia da República nº32/2006 inclui nas técnicas de PMA a Fertilização *in vitro* (FIV) e a Injecção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI – *Intracytoplasmic Sperm Injection*). No artigo 4º, nº 2, a lei impõe como primeira condição da aplicação destas técnicas o diagnóstico de infertilidade, salientando no nº 1 do mesmo artigo que, no seu conjunto, as técnicas de PMA, constituem um método subsidiário e não alternativo, de procriação (*Diário da República, 1ª série — Nº143 — 26 de Julho de 2006*). Assim, estas técnicas estão indicadas em situações de infertilidade causadas por disfunções ovulatórias, obstrução tubária, endometriose e factor masculino.

As pacientes que recorrem às técnicas de PMA são submetidas a uma estimulação com gonadotrofinas de origem humana, purificadas, ou de síntese, por recombinação, e o crescimento folicular é regularmente avaliado por ecografia pélvica e níveis de estradiol plasmático. As doses hormonais administradas e o tempo e frequência da estimulação variam de paciente para paciente, e também de ciclo para ciclo numa mesma paciente. Quando os folículos maiores atingem um diâmetro máximo de cerca de 20 mm, é administrada gonadotrofina coriónica humana (hCG – *human Chorionic Gonadotropin*) e passadas 34-38 horas é realizada uma aspiração folicular transvaginal guiada por ecografia. O líquido recolhido é observado no microscópio, para verificação de presença de complexos ovócito-*cumulus*. A partir deste passo, o processamento é um pouco diferente dependendo da técnica a ser utilizada, FIV ou ICSI.

A anteceder a FIV propriamente dita, é necessário realizar a remoção parcial das células do *cumulus oophorus* dos COC o que é feito muitas vezes mecanicamente. Em seguida os ovócitos, ainda rodeados por algumas células do *cumulus oophorus* são incubados em contacto com os espermatozóides (Figura 14), para a fertilização. Após um dia de incubação, as placas são observadas para verificação da fertilização e avaliação dos embriões formados. Quando estes atingem

um estado de 6-8 células (3 dias) são transferidos para as trompas de Falópio da paciente.

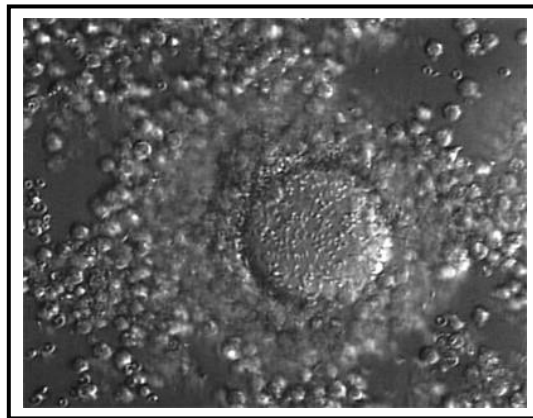


Figura 14: Fertilização *in vitro*: Ovócito rodeado por células de *cumulus oophorus* é colocado em contacto com os espermatozóides para que ocorra a fertilização.

Adaptado de <http://www.ivf.gr>

Em alguns casos específicos, principalmente quando se reconhece por exemplo má qualidade ou escassez de espermatozóides, recorre-se à ICSI, uma variante especializada da fertilização *in vitro*, na qual um único espermatozóide é injectado directamente no citoplasma do ovócito (Figura 15). Apenas os ovócitos secundários (em metafase II da meiose) podem ser submetidos a esta técnica, e antes da microinjecção é necessária a remoção total das células do *cumulus oophorus* dos COC, através da dissociação enzimática com hialuronidase (Braude e Rowell, 2003).

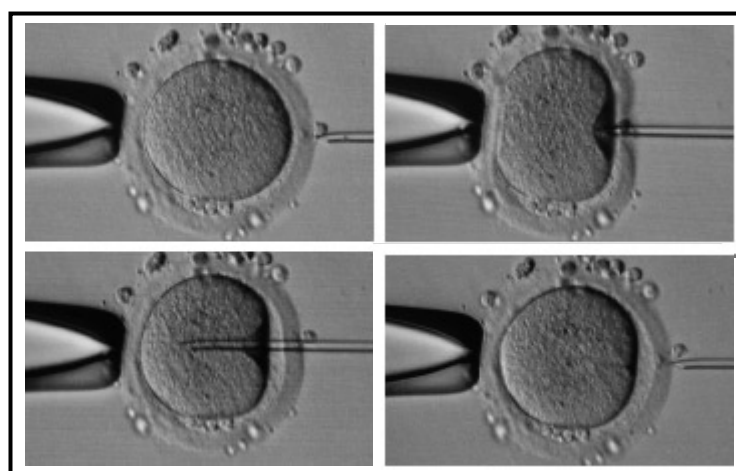


Figura 15: Injecção Intracitoplasmática de um espermatozóide (ICSI)

Adaptado de <http://www.brighamandwomens.org>

2.3. Eficácia da aplicação das técnicas de PMA

A eficácia de uma terapia é estabelecida pela sua taxa de sucesso. A taxa de sucesso das técnicas de PMA pode ser apresentada pelo menos de seis formas diferentes: percentagem de ciclos iniciados que resultaram numa gravidez; percentagem de ciclos iniciados que resultaram num ou mais nados vivos; percentagem de ciclos nos quais foram recolhidos ovócitos que resultaram num ou mais nados vivos; percentagem de transferências que resultaram num ou mais nados vivos; percentagem de ciclos iniciados que resultaram num único nado vivo; e percentagem de transferências que resultaram num único nado vivo. Todas estas formas de apresentação resultam na obtenção de valores ligeiramente diferentes. A forma de apresentação que produz valor mais elevado é a percentagem de transferências que resultam num ou mais nados-vivos, mas essa não é uma estimativa real da taxa de sucesso das técnicas de PMA. Assim, vários investigadores reconhecem que a percentagem de ciclos iniciados que resultam em nados vivos, é o indicador mais representativo da realidade.

O factor que mais influencia a taxa de sucesso das técnicas de PMA é a idade da mulher (Figura 16). A partir dos 35 anos, e principalmente depois dos 40 anos, o número e a qualidade dos ovócitos obtidos por estimulação diminuem, e consequentemente a percentagem de ciclos iniciados que resultam em nados vivos sofre também uma forte diminuição, de resto seguindo a redução marcada de folículos que se observa após os 37 anos (*Faddy et al., 1992*). Por esse motivo, as taxas de sucesso devem também ser avaliadas tendo em conta grupos etários bem definidos.

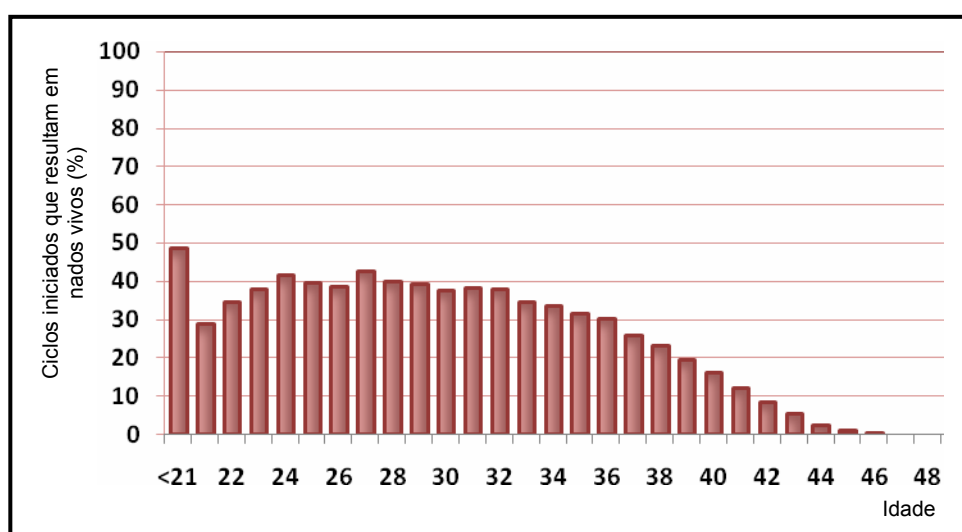


Figura 16: Variação da percentagem de transferências que resultam em nados vivos com a idade da mulher.

Adaptado de *Centers for Disease Control and Prevention: Assisted Reproductive Technology Report, 2005*

Com o passar dos anos tem ocorrido algum aperfeiçoamento das técnicas de PMA o que se traduziu num aumento da percentagem de ciclos iniciados que resultam em nados vivos até 2002, data a partir da qual se tem mantido uma estabilização dos valores (Figura 17). Em termos de eficácia terapêutica, as taxas de sucesso situam-se por volta dos 30%, o que está muito aquém do que seria desejado. Por este motivo, são necessários mais estudos de modo a melhorar metodologias laboratoriais, como por exemplo a optimização dos meios de cultura, e a melhor definir marcadores de qualidade dos gâmetas e embriões.

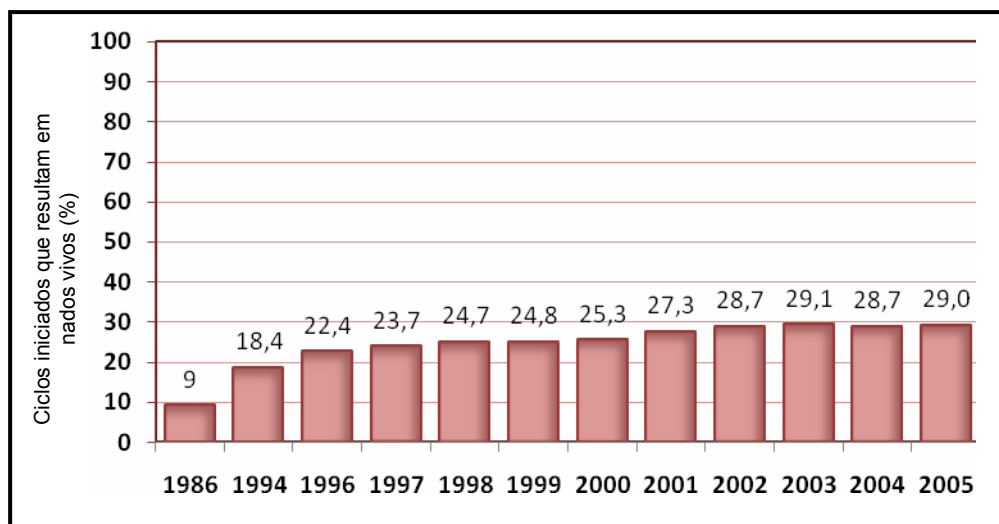


Figura 17: Taxas de sucesso das técnicas de PMA ao longo dos anos.

Adaptado de *Centers for Disease Control and Prevention: Assisted Reproductive Technology Report, 2005*

Efectivamente, o ambiente folicular onde o ovócito se encontra *in vivo* ou *ex vivo* influencia o seu desenvolvimento, qualidade e capacidade para fertilizar. Esse ambiente é composto pelas células do *cumulus oophorus* que o envolvem directamente e pelo líquido folicular que preenche a cavidade antral ou o meio de cultura onde o ovócito é fertilizado.

O líquido folicular é produzido pelas células da granulosa e por difusão com origem nos capilares existentes na camada das células da teca, durante a foliculogénese. Este fluido é semelhante ao plasma sanguíneo na medida em que contém diversas proteínas, anticoagulantes e enzimas, que irão providenciar ao ovócito um microambiente contendo os factores reguladores, tanto parácrinos como endócrinos, necessários para a sua maturação (*Angeluci et al., 2006*). Adicionalmente, as células do *cumulus oophorus*, pela sua relação tão íntima e persistente com o ovócito desde o crescimento folicular até ao momento em que a fertilização acontece, decerto influenciam a qualidade do ovócito e o sucesso da sua fertilização.

Atendendo a que a presença no líquido folicular, de níveis moderados de espécies reactivas de oxigénio (ROS) parece favorecer o sucesso das técnicas de

PMA (Agarwal *et al.*, 2006), admite-se que factores do stress oxidativo presentes no líquido folicular poderão ser utilizados na avaliação da qualidade ovocitária e do prognóstico das taxas de sucesso das técnicas de PMA.

3. Stress Oxidativo

3.1. Espécies Reactivas de Oxigénio

As espécies reactivas de oxigénio (ROS) são pequenas moléculas extremamente reactivas que na sua maior parte resultam da redução incompleta do oxigénio molecular, e devido ao seu forte carácter oxidante, são potencialmente muito tóxicas. Os três tipos principais de ROS são o anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o radical hidroxilo ($OH^{\cdot}$). A maior parte dos aniões superóxido são formados no decurso das sucessivas reacções de oxidação-redução que ocorrem na cadeia transportadora de electrões existente na membrana interna da mitocôndria. Habitualmente, o oxigénio molecular (O_2) é duplamente reduzido para originar água; porém, cerca de 2% do O_2 fica apenas parcialmente reduzido na forma de $O_2^{\cdot-}$. Tanto o $O_2^{\cdot-}$ como o H_2O_2 podem danificar as células em determinadas circunstâncias. No entanto, os efeitos são geralmente mais acentuados quando combinados com outras espécies reactivas ou na presença de metais que actuam como catalizadores. Talvez o melhor exemplo conhecido seja a redução, mediada pelo ferro, do H_2O_2 pelo $O_2^{\cdot-}$, dando origem ao $OH^{\cdot}$ (Halliwell e Gutteridge, 1999).

As ROS possuem a capacidade de reagir com diversas biomoléculas danificando-as: causam peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e quebras nas cadeias de ADN. A peroxidação lipídica resulta da oxidação de ácidos gordos poli-insaturados, o que provoca alterações estruturais nas membranas celulares, modificações funcionais em receptores e enzimas membranares e, em última instância, à morte celular. As quebras nas cadeias de ADN induzem muitas vezes a activação dos mecanismos de reparação do ADN, mas outras vezes levam à morte celular. Por último, as ROS inibem também a síntese de proteínas em algumas células, possivelmente como resultado da disfunção ribossomal, e também pela inibição da síntese de ARNm ou pela sua degradação (Leung e Adashi, 2004).

Tendo em conta que as ROS são continuamente geradas, é crucial a neutralização destas moléculas de modo a que a funcionalidade celular seja preservada. Essa neutralização é efectuada por diversos agentes antioxidantes. A produção excessiva de ROS ou a insuficiência de meios de defesa antioxidante, isto é,

o desequilíbrio entre uns e outro, origina a condição denominada stress oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 2007).

3.2. Antioxidantes

Um antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparativamente com o substrato oxidável, atrasa significativamente ou previne a oxidação desse mesmo substrato (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Existem dois tipos principais de agentes antioxidantes: não enzimáticos e enzimáticos.

Não enzimáticos

Este grupo de compostos antioxidantes pode ser dividido em dois sub-grupos: os compostos produzidos *in vivo*, e os compostos ingeridos na alimentação.

A bilirrubina é um antioxidante existente *in vivo* que resulta da degradação do grupo heme. A maior parte de bilirrubina (cerca de 80%) provém do catabolismo da hemoglobina, enquanto os restantes 20% provêm da degradação dos grupos heme de outras proteínas como a mioglobina, catálase e citocromo p450. Esta molécula é insolúvel em água a pH fisiológico e por isso liga-se à albumina. No fígado dissocia-se da albumina e é endocitada pelo hepatócito, onde vai sofrer conjugação com o ácido glucurónico, formando moléculas solúveis em água que podem agora ser excretadas na bílis. Outros compostos que pertencem ao grupo de antioxidantes produzidos *in vivo* são, por exemplo, a glutathione, a coenzima Q, o ácido úrico e o piruvato.

Do sub-grupo de antioxidantes provenientes da alimentação é exemplo o α -tocoferol (vitamina E), provavelmente o antioxidante mais importante na prevenção da progressão da peroxidação lipídica. O mesmo sub-grupo inclui ainda o ácido ascórbico (vitamina C) e os carotenóides. A vitamina C bloqueia também a progressão do processo peroxidativo e participa ainda na reciclagem da vitamina E e glutathione oxidada (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Enzimáticos

Os agentes antioxidantes enzimáticos mais importantes são a catálase, peroxidase da glutathione e dismutase do superóxido (SOD).

A SOD, na verdade, constitui uma família de enzimas antioxidantes que actua removendo as ROS do ambiente celular pela catálise da dismutação do anião superóxido a peróxido de hidrogénio e oxigénio (figura 18). Nas células eucarióticas existem duas isoformas intracelulares de SOD: a SOD Cobre-Zinco (CuZnSOD)

(McCord e Fridovich, 1969) e a SOD Manganês (MnSOD) (Weisiger e Fridovich, 1973). A CuZnSOD é a isoforma predominante dentro da célula, e existe como um homodímero de 32 kDa localizado no citoplasma e núcleo de todos os tipos de células estudadas, onde actua como um sequestrador de grande parte dos aniões superóxido (Crapo *et al.*, 1992). A MnSOD é um homotetrâmero de 96 kDa e está localizada essencialmente na matriz mitocondrial (Weisiger e Fridovich, 1973; Slot *et al.*, 1986). Para além destas duas isoformas intracelulares, existe ainda uma isoforma de SOD Extracelular (E-SOD), que é uma proteína tetramérica normalmente secretada para o espaço extracelular com cerca de 135 kDa, que contém cobre e zinco (Marklund, 1984).

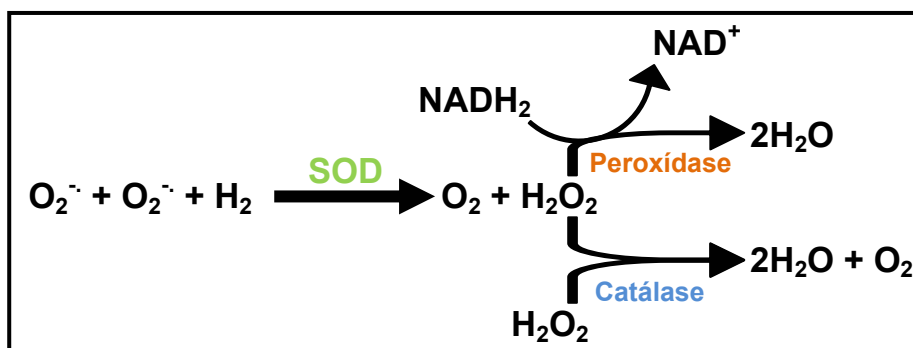


Figura 18: Reacções simplificadas do modo de acção da SOD, catalase e peroxidase na neutralização de ROS.

Adaptado de Kenneth Todar, University of Wisconsin-Madison, 2000

Dada a natureza ubiqüitária dos mecanismos de produção e neutralização das ROS, o stress oxidativo é uma condição que pode afectar qualquer parte do organismo, incluindo o aparelho genital feminino, e neste, o folículo ovárico.

3.3. Influência na Reprodução

Em anos recentes o interesse pelo estudo do efeito do stress oxidativo na reprodução em geral, e humana em especial, cresceu extraordinariamente, melhorando de forma considerável o conhecimento que dele temos. Para além da reprodução, vista genericamente, o estudo abordou também a sua patologia e, em particular, os fenómenos ligados à infertilidade.

Por razões relacionadas com a maior facilidade em obter material de estudo, o papel do stress oxidativo na patogénese da infertilidade masculina encontra-se bem documentado (Agarwal e Saleh, 2002). Em resumo, os danos oxidativos induzidos no espermatozóide incluem a peroxidação lipídica da membrana celular e das

mitocôndrias, o que afecta a sua motilidade, danos nas bases púricas e pirimidínicas do ADN, indução da apoptose conduzindo à fragmentação do ADN e morte celular. É compreensível que o uso de espermatozóides assim danificados, quer durante a sua produção e transporte, quer durante o seu processamento, possa resultar em insucesso das técnicas de PMA (Tremellen, 2008).

Relativamente ao seu papel na infertilidade de causa feminina, há um considerável número de informações mas algumas estão baseadas em estudos não humanos, geraram controvérsia e resultados conflituosos por vezes; há quem afirme que o stress oxidativo influencia a qualidade do ovócito e do embrião e por isso o sucesso da fertilização (Agarwal *et al.*, 2005b), e quem discorde (Jozwik *et al.*, 1999). Talvez por isso não exista um conhecimento integrado, profundo acerca deste assunto.

Os radicais livres desempenham funções importantes na modulação de vários processos fisiológicos na reprodução, desde a maturação do ovócito até à fertilização, desenvolvimento embrionário e gravidez, actuando como moléculas sinalizadoras cruciais, em equilíbrio com antioxidantes, ou como contribuintes para processos patológicos do sistema reprodutor feminino tais como a infertilidade, a endometriose, embriopatias e abortamento, e outras patologias da gravidez (Figura 19) (Agarwal *et al.*, 2006).

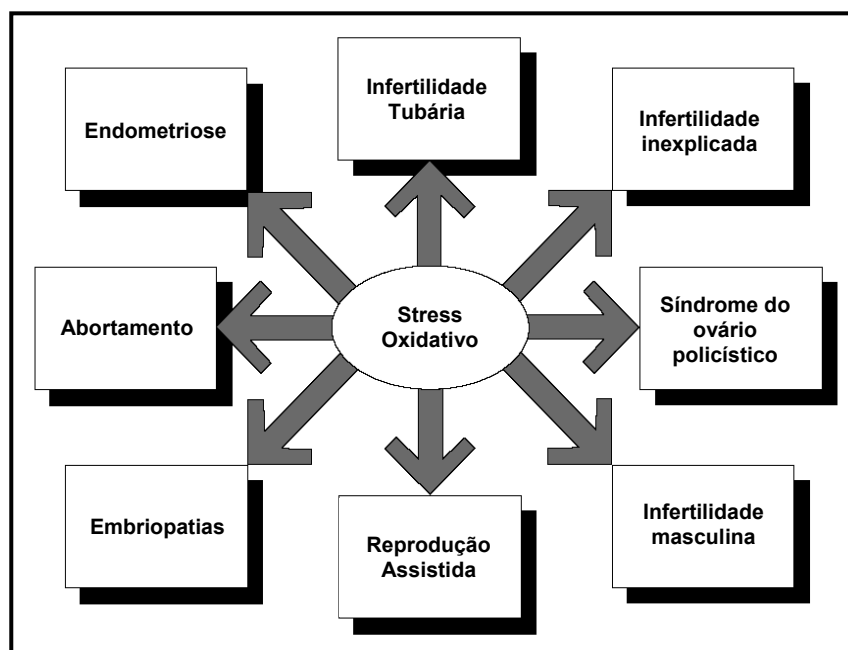


Figura 19: Papel do stress oxidativo na reprodução.

Adaptado de Agarwal *et al.*, 2006

Visto ser impossível estudar e avaliar o ovócito seleccionado para PMA sem o inutilizar, o conhecimento das acções do stress oxidativo sobre ele exercidas terá de

ser adquirido estudando o ambiente que o envolve: o líquido folicular, o líquido intraperitoneal, o líquido tubário, as células da granulosa e as células do *cumulus oophorus*.

O líquido folicular reflecte processos hormonais e metabólicos que ocorrem no microambiente que rodeia o ovócito antes da ovulação e é, inclusivamente, o objecto de estudo preferencial para a busca de novos parâmetros preditivos do sucesso das técnicas de PMA. No decurso da busca desses marcadores no líquido folicular humano, detectou-se antes da ovulação uma maior actividade da SOD quando comparada com a do soro (Sabatini *et al.*, 1999); no porco, esse aumento é de sete vezes, sugerindo estes exemplos um efeito protector contra danos oxidativos no ovócito (Tatemoto *et al.* 2004). Efeito semelhante poderão ter outros antioxidantes não enzimáticos do tracto reprodutor feminino. É o caso da taurina e hipotaurina do líquido tubário, assim como a glutathione do líquido folicular e tubário, que conferem protecção antioxidante ao ovócito e ao embrião, em especial a este, quando na trompa, local onde têm particular papel no desenvolvimento do zigoto para o estadio de blastocisto (Agarwal *et al.*, 2005a). Ao invés, a presença de determinadas quantidades de ROS e a actividade da peroxidase da glutathione dependente de selénio no líquido folicular, estão positivamente relacionadas com o sucesso da gravidez (Paszkowski *et al.* 1995; Attaran *et al.*, 2000). Este aparente equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes no líquido folicular não parece ser preditivo do sucesso da fertilização, nem parece ser necessário para tal. A Capacidade Antioxidante Total (CAT) do líquido folicular não depende da presença de ovócito no folículo, e portanto não parece ser por ele regulada de forma importante, mas o seu aumento, segundo uns, influencia favoravelmente o sucesso da fertilização (Oyawoye *et al.*, 2003). Segundo outros, mais do que uma capacidade antioxidante diminuída, a diminuição do potencial de fertilização dos ovócitos em casos de infertilidade tubária dever-se-ia a níveis elevados de ROS do líquido folicular (Das *et al.*, 2006) ou mesmo aos lipoperóxidos (Pasqualotto *et al.*, 2004). Estas observações mostram que as moléculas que contribuem para a CAT são também factores moduladores da foliculogénese e desenvolvimento embrionário inicial. O seu papel real é ainda bastante controverso.

No fluido intraperitoneal, os resultados dos estudos indicaram uma relação entre níveis elevados de ROS e infertilidade idiopática, sugerindo um papel do stress oxidativo neste tipo de infertilidade (Wang *et al.*, 1997; Bedaiwy *et al.*, 2002) não apenas por aumento das ROS mas também por diminuição da CAT do fluido (Polak *et al.*, 2001).

Para além do líquido folicular, a envolver directamente o ovócito encontram-se as células do *cumulus oophorus*. Estas e o ovócito, estabelecem entre si junções de

hiato que proporcionam um importante meio para a entrada de vários metabolitos no citoplasma do ovócito. Provavelmente por esta íntima comunicação, as células do *cumulus oophorus* potenciam a maturação nuclear dos ovócitos até atingirem a metafase II e favorecem a maturação citoplasmática que origina ovócitos aptos para uma fertilização e desenvolvimento embrionário normais (Suzuki *et al.*, 2000).

A realização de estudos utilizando células do *cumulus oophorus* humanas é limitada devido à dificuldade de obtenção de grandes quantidades desse tipo de células provenientes do mesmo indivíduo, motivo por que para este efeito se efectuaram estudos noutras espécies de mamíferos. No rato (Vanderhyden e Armstrong, 1989), na ovelha (Staigmiller e Moor, 1984) e na vaca (Zhang *et al.*, 1995), a remoção das células do *cumulus* dos ovócitos antes da sua maturação *in vitro* afecta-a negativamente, bem como a própria fertilização e o potencial de desenvolvimento embrionário. Porém, a presença de células do *cumulus* a rodear o ovócito *in vitro*, aumenta a taxa de fertilização no ratinho (Itagaki e Toyoda, 1991), no porco (Kikuchi *et al.*, 1993), no búfalo (Nandi *et al.*, 1998) e também na vaca (Fatehi *et al.*, 2002).

O *cumulus oophorus* não só desempenha um papel importante na aquisição de competência por via da maturação citoplasmática do ovócito, como também se encontra envolvido na protecção dos ovócitos contra danos celulares causados pelo stress oxidativo. De facto, num estudo efectuado com ovócitos de porco, verificou-se que as ROS induziram a apoptose em ovócitos cultivados sem células de *cumulus oophorus*, mas não naqueles que com elas foram cultivados, sugerindo que estas protegem os ovócitos da morte celular induzida pelo stress oxidativo (Tatemoto *et al.*, 2000). Este efeito *in vitro* poderá ocorrer também *in vivo*. Na verdade, estudos realizados em homogeneizados de ovários de ratas revelaram alterações cíclicas nos níveis de SOD durante o ciclo éstrico, exibindo o mínimo na fase diéstrica I (0,8 U SOD/mg tecido) e o máximo na fase proéstrica (2,1 U SOD/mg tecido), que acompanha o crescimento folicular, e verificou-se também que os níveis de SOD estão inversamente relacionados com os do radical superóxido (Lolaraya *et al.*, 1988). Um outro trabalho, de cultura de complexos ovócito-*cumulus* de bovino durante a fertilização, permitiu concluir que os ovócitos integrantes dos complexos eram menos sensíveis às ROS do que os ovócitos sem células de *cumulus oophorus* (Fatehi *et al.*, 2005). Acresce ainda que se encontrou uma associação entre a presença de níveis elevados de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8OHdG), um indicador de danos no DNA causados por stress oxidativo, em células da granulosa murais e do *cumulus oophorus*, e redução do sucesso na fertilização e da qualidade dos embriões originados (Seino *et al.*, 2002). Finalmente, um estudo recente deu consistência a

estes dados ao concluir que do aumento da produção de ROS nas células da granulosa, e por isso do aumento do seu stress oxidativo, resulta diminuição da capacidade de fertilização do respectivo ovócito, assim como da qualidade do embrião e do sucesso da sua implantação (*Jancar et al., 2007*). Notoriamente, o crescimento, maturação e fertilização do ovócito, bem como o desenvolvimento embrionário mais primitivo, necessitam de um equilíbrio delicado entre ROS e os seus neutralizadores antioxidantes existentes nas células do *cumulus oophorus*, algo que não era tão evidente no líquido folicular.

Do excesso de ROS, isto é, do stress oxidativo podem resultar patologias que afectam a reprodução feminina. Sabe-se que o stress oxidativo está relacionado com causas de infertilidade como a endometriose (*Langendonckt et al., 2002*) e a infertilidade idiopática (*Wang et al., 1997*), o que tem justificado um aumento do interesse em analisar o seu papel na reprodução feminina. Não obstante a sua importância no funcionamento normal do sistema reprodutor feminino e na patogénese de infertilidade feminina (*Agarwal e Allamaneni, 2004; Bedaiwy et al., 2002a*), continua por se estabelecer se o stress oxidativo é causa ou consequência, ou por que mecanismo condiciona a sua acção.

O estudo da contribuição das ROS para as causas de infertilidade encontra um espaço importante quando o assunto é endometriose. Foi sugerido o envolvimento das ROS no aumento da proliferação e adesão das células do endométrio à cavidade peritoneal, assim promovendo a endometriose e infertilidade (*Portz, 1991*). *Szczepanska* e cols. (2003), estudando o líquido peritoneal de mulheres inférteis com endometriose, reportaram menor capacidade antioxidante total e menor actividade das enzimas antioxidantes SOD e peroxidase da glutathione, e aumento dos níveis de peróxidos lipídicos, comparativamente com mulheres férteis. Adicionalmente, no soro, já se verificava que os níveis de alguns marcadores de stress, como peróxidos lipídicos e proteínas oxidadas eram superiores nas mulheres com endometriose comparadas com mulheres saudáveis (*Shanti et al., 1999*). Acresce ainda que nas células da granulosa de pacientes com endometriose se observaram teores mais elevados de 8OHdG, um marcador de lesão oxidativa do ADN como já se disse, e de 4-hidroxi-2-nonenal (4HNE), um produto da peroxidação lipídica, comparativamente com as células da granulosa de pacientes com outros factores de infertilidade (*Saito et al., 2002*). Curiosamente, no próprio endométrio de mulheres com endometriose, encontrou-se expressão aumentada da SOD, independentemente da fase do ciclo menstrual (*Ota et al., 1999*), em contraste com um padrão variável conforme a fase do ciclo menstrual (*Sugino et al., 1996*). Embora este achado sugira intervenção do anião superóxido e da SOD na proliferação e diferenciação no endométrio, o trabalho de *Ota*

e cols. (1999) indica existir um envolvimento permanente do anião superóxido numa entidade que cursa com infertilidade. Porém, nem todos os estudos reportaram associação entre marcadores de stress oxidativo, ROS e capacidade antioxidante total no fluido peritoneal, e endometriose (*Ho et al., 1997; Wang et al., 1997*), o que mostra como por vezes é difícil separar a acção funcional da contribuição para a patologia e como a comparação de dados é também dificultada pelo facto de existir grandes divergências nos critérios utilizados na realização dos estudos, incluindo a selecção dos grupos controlo, a selecção dos marcadores de stress e até mesmo o material biológico utilizado. Numa tentativa de padronizar os resultados, *Jackson e cols. (2005)* avaliaram alguns biomarcadores de stress oxidativo e a capacidade antioxidante em amostras de soro de mulheres com e sem endometriose tendo em conta algumas características pessoais como a idade, o índice de massa corporal e a ingestão de hormonas nos últimos doze meses, entre outras. Apesar de revelar algumas limitações, esse estudo mostrava uma relação entre os níveis de substâncias reactivas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), um índice de peroxidação lipídica, e a endometriose (*Jackson et al., 2005*).

Por conseguinte, não obstante a maioria dos estudos favorecer a existência de uma relação directa entre o stress oxidativo e a endometriose, os resultados não são unânimes e também não é claro o mecanismo causal subjacente.

Sendo então o stress oxidativo um modulador da fertilidade em diversos momentos, essa acção suscitou um interesse acrescido por se admitir que pudesse justificar parte da ainda baixa eficácia das técnicas de PMA (*Agarwal et al., 2003; Agarwal e Allamaneni, 2004; Pasqualotto et al., 2004*), que mesmo assim são o tratamento de eleição em muitos casos de infertilidade de causa masculina ou feminina. E note-se que os efeitos reconhecidos *in vivo* podem ainda ser agravados no curso das técnicas de PMA devido à incerteza quanto aos mecanismos de defesa antioxidante disponíveis nos meios de cultura e ao elevado número de potenciais fontes de ROS existentes.

Aquando da realização das técnicas de PMA, os critérios vulgarmente utilizados para avaliar a qualidade dos ovócitos a fertilizar e os embriões a implantar baseiam-se no seu aspecto morfológico, em especial a velocidade de segmentação das suas células (*Van Royen et al., 2001*). Este tipo de análise é, no entanto, subjectivo e não prevê de um modo fiável a qualidade do embrião, uma vez que grande parte dos embriões com uma morfologia considerada normal possui anomalias cromossómicas (*Munné et al., 1993*). Por este motivo eram frequentemente transferidos 3 - 4 embriões de uma vez, para que a probabilidade de alcançar uma gravidez bem sucedida fosse maior. Atendendo a que de tal procedimento resultavam muitas vezes gestações

múltiplas, de alto-risco, associadas ao aumento substancial de morbilidade e mortalidade fetal (*Armour e Callister, 2005*), as recomendações mais recentes favorecem a transferência de menos embriões (*American Society for Reproductive Medicine, 2006*). Compreende-se pois que, quaisquer marcadores bioquímicos objectivos que consigam predizer do potencial de fertilização dos ovócitos e subsequente desenvolvimento do embrião seriam muito desejáveis por permitir otimizar a selecção dos ovócitos e embriões, e diminuir o número de embriões a transferir sem perda da taxa de sucesso.

Neste enquadramento, as células do *cumulus oophorus* são por isso muito interessantes e potencialmente capazes de fornecer informações preditivas do potencial de desenvolvimento do ovócito. São também quase ideais para estudo, uma vez que são removidas e rejeitadas durante a realização das técnicas de PMA e por outro lado, o seu aproveitamento não interfere no curso habitual destas. Depois de justificada por motivos clínicos a acção invasiva para colher os ovócitos, o estudo das células restantes, no âmbito da avaliação da qualidade do embrião não requer acção invasiva adicional. Estudos indicam que o perfil de expressão génica das células do *cumulus oophorus* poderá ser um parâmetro, para além da morfologia, capaz de auxiliar na selecção dos embriões, uma vez que a expressão de determinados genes nessas células humanas parece predizer da maturidade do ovócito, do seu potencial de fertilização e da qualidade do embrião (*McKenzie et al., 2004*). Para além disso, verificou-se ainda que a incidência de apoptose nas células do *cumulus oophorus* humanas pode também ser usada como um método preditivo da qualidade ovocitária e da taxa de sucesso da FIV e transferência do embrião (*Lee et al., 2001*).

Mas a evidência recente, recolhida de estudos realizados no líquido folicular e células do *cumulus oophorus*, que se acabou de rever, mostra que as ROS exercem acção moduladora da maturação ovocitária e da sua fertilização. Por isso, sem ignorar a possibilidade de a análise génica ou o índice apoptótico poderem proporcionar elementos de previsão do sucesso da FIV, admite-se como hipótese que nas células do *cumulus oophorus*, o teor ou a actividade de enzimas antioxidantes essenciais podem vir a ser utilizados no curso da PMA como marcadores preditivos do seu sucesso. Por esse motivo, justificam-se os objectivos do presente trabalho.

4. Objectivos

- Propiciar condições para cultura primária de células de *cumulus oophorus* humanas e caracterizá-las morfolologicamente ao longo do tempo de cultura.
- Determinar a presença e localização das isoformas intracelulares da SOD – MnSOD e CuZnSOD – nas células de *cumulus oophorus* humanas.
- Quantificar a actividade da SOD total e quantidade relativa de cada uma das isoformas em colheitas individuais de células de *cumulus oophorus* e relacioná-los com causas de infertilidade e idade de cada paciente.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Recolha e obtenção de células de cumulus oophorus

As células de *cumulus oophorus* (CCO) foram recolhidas entre Janeiro e Julho de 2006. Provinham de material não ovocitário, excedente de procedimentos de PMA realizados na Unidade de Medicina da Reprodução do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de S. João/ Faculdade de Medicina do Porto. Os diagnósticos clínicos foram estabelecidos no curso das consultas médicas da Unidade e nesta fora estabelecida a decisão para PMA e a técnica a empregar (FIV ou ICSI), de acordo com as normas ou orientações então vigentes. Depois da punção folicular aspirativa e ainda na Unidade de Medicina da Reprodução, os complexos ovócito-*cumulus oophorus* eram seleccionados e, sob a lupa, o ovócito era separado das células envolventes por meios mecânicos. Enquanto o ovócito era preparado para os procedimentos previamente definidos, os aglomerados de CCO. remanescentes, em vez de rejeitados, eram recolhidos para tubo anonimizado contendo meio HBSS - Hank's Balanced Salt Solution (Sigma-Aldrich®), e lá mantidos em gelo até serem processados. Cada tubo continha complexos ovócito-*cumulus* de uma única paciente e foi processado e estudado como uma amostra distinta e não integrado em *pools* de amostras. A ele vinha anexada uma informação com a idade da paciente e o diagnóstico clínico antes estabelecido.

2. Cultura primária de células

Para realização de culturas primárias, a suspensão de agregados celulares recebida foi centrifugada a 1000 rpm, durante 5 minutos, à temperatura de 4°C (Eppendorf® Centrifuge 5702R). Depois de rejeitar o sobrenadante, correspondente ao HBSS original, as células foram mecanicamente dissociadas e ressuspendidas em meio de cultura M-199 (Sigma-Aldrich®) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (Biochrom®), 1 mM de L-Glutamina (Biochrom®), 50 µg/mL da combinação de antibióticos Penicilina/Estreptomicina (Biochrom®), 50 µg/mL de Canamicina (Biochrom®), 1 µg/mL de Estradiol (Sigma-Aldrich®), 0,1 mM de Piruvato de Sódio, 0,075 UI/mL de FSH (Puregon® 100 UI/0,5mL, Organon, gentilmente fornecida pelo CETI - Centro de Estudos e Tratamento de Infertilidade, Porto), 0,075 UI/mL de hCG e 0,5 µg/mL de Anfotericina B (Biochrom®). Estas células em suspensão foram distribuídas por placas de cultura de 24 poços a cujo fundo, com ou sem lamelas de vidro, aderiram ao longo do tempo de cultivo. As células foram incubadas numa estufa a 37°C com 5% CO₂ (Nuaire® US autoflow NU-4750E) durante um período máximo de

15 dias, com mudança do meio de cultura de 3 em 3 dias por meio M-199 suplementado fresco, em condições estéreis (ADS Laminaire® Optimale 9).

Coloração Hematoxilina-Eosina e Sudão III/ IV

Aos 3, 5, 10 e 15 dias de cultura, foram retiradas 2 lamelas com células aderentes e fixadas com formol tamponado em fosfato durante 20 minutos. Uma das lamelas foi submetida à coloração com Hematoxilina–Eosina para exame morfológico, enquanto a outra foi corada com Sudão III/IV, para evidenciar reservas lipídicas.

Para a coloração com Hematoxilina - Eosina, após a fixação, as células aderentes às lamelas foram lavadas com água destilada e incubadas em Hematoxilina durante 1 minuto. Depois de nova lavagem com água destilada, foram incubadas em Eosina durante 15 minutos. As células foram então desidratadas em soluções de concentração crescente de etanol (70%, 90%, 100%), clareadas com xilol 1-2 min e montadas em lâminas de vidro utilizando como meio de montagem o Entellan (Merck®).

Para a coloração com Sudão III/IV, as lamelas foram também fixadas, lavadas com água destilada e incubadas cerca de 10 minutos numa solução aquosa com 50% de Etanol. Em seguida as lamelas foram imersas 1 minuto em solução de Sudão III/IV a 4°C e lavadas com uma passagem por etanol a 70%, seguida de água destilada. Por fim, as lamelas foram montadas em lâminas, empregando como meio de montagem a Geleia de Glicerina (Merck®).

2.1. Imunocitoquímica para detecção de CuZnSOD e MnSOD

As células em cultura aderentes às lamelas, foram fixadas em formol tamponado durante 20 minutos. Após a fixação, foram lavadas com água destilada e permeabilizadas incubando em TBS 0,1 M com 1% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich®), durante 5 minutos. Depois de lavar com TBS 0,1 M e incubar 20 minutos à temperatura ambiente numa solução aquosa de 3% de H₂O₂ (Merck®), de modo a inibir a actividade da peroxidase celular endógena, lavou-se com TBS 0,1 M por 5 minutos e bloquearam-se os locais de ligação inespecífica empregando uma solução de 2% de Albumina sérica bovina (Sigma-Aldrich®) em TBS 0,1 M durante 1 hora. As lamelas foram então incubadas em anticorpo primário de coelho contra a MnSOD ou CuZnSOD (Stressgen®), diluídos a 1:1000 em solução de bloqueio, a 4°C e com agitação, durante uma noite. No dia seguinte, lavaram-se duas vezes em TBS 0,1 M, e incubaram-se 1 hora em anticorpo secundário anti-coelho biotilado (DAKO®), diluído

a 1:500 em TBS 0,1 M. Após três lavagens com TBS 0,1 M, incubou-se de novo durante 1 hora em complexo ABC (DAKO®) diluído a 1:500 em TBS 0,1 M. Por fim, e após algumas lavagens em TBS 0,1 M, a reacção foi revelada por adição do substrato diaminobenzidina (Sigma-Aldrich®), na presença de H₂O₂. Depois de breve coloração com Hematoxilina, fez-se a desidratação e montagem com Entellan (Merck®).

3. Morfologia Ultra-estrutural

As colheitas recebidas foram centrifugadas (Eppendorf® Centrifuge 5702R) a 1000 rpm durante 5 minutos, a 4°C, o sobrenadante foi rejeitado e o pellet de células foi fixado numa solução de 2,5% glutaraldeído (Sigma-Aldrich®) em tampão cacodilato, durante 2 horas, a 4°C. Em seguida, as células foram recolhidas novamente por uma centrifugação a 1000 rpm, 5 minutos a 4°C, e o sedimento foi incubado numa solução de 7% de sacarose (Merck®) em tampão cacodilato, durante a noite a 4°C. No dia seguinte, as células foram pós-fixadas numa solução de 1% de tetróxido de ósmio (Agar®) em tampão Palade, durante 2 horas a 4°C, desidratadas por incubações sucessivas de 7 minutos em soluções de etanol a 30%, 50% e 70%, 15 minutos em etanol a 90% e por fim três vezes em etanol absoluto (Merck®) durante 20 minutos. A diafanização foi efectuada com óxido de propileno (Merck®) durante 30 minutos, e por fim as células foram colocadas durante 30 minutos numa mistura de óxido de propileno/Epon 1:1, e permaneceram durante a noite em óxido de propileno/Epon 1:2. No dia seguinte as células foram colocadas em cápsulas e submetidas à inclusão final em Epon (Agar®). Após polimerizar em estufa a 60°C durante 3 dias, fizeram-se cortes ultra-finos (Leica® Reichert Ultracut S) que se contrastaram com acetato de uranilo e citrato de chumbo para serem observados no microscópio electrónico (Jeol® 100 CX II).

4. Estudos Bioquímicos

4.1. Avaliação da viabilidade celular e contagem das células

As células dos aglomerados de CCO recebidos foram dissociadas mecanicamente na solução de HBSS original, através de múltiplas pipetagens, centrifugadas a 1000 rpm durante 10 minutos a 4°C (Eppendorf® Centrifuge 5702R) e ressuspensas num volume conhecido de HBSS. Misturou-se 20 µL de suspensão celular com 10 µL de solução de Azul de Tripán (Biochrom®) e procedeu-se à contagem do número total de

células e do número de células não viáveis. As contagens foram realizadas em triplicado em câmara de Neubauer de polietileno (Biosigma®), e no fim foi utilizada a média dos valores obtidos para o cálculo da viabilidade celular que foi apresentada como percentagem de células viáveis existente em cada colheita.

4.2. Obtenção de homogeneizados

Após a contagem das células, a respectiva suspensão celular foi centrifugada a 1000 rpm, 10 minutos a 4°C, e as células foram ressuspensas em 100 µL de solução de homogeneização constituída por: 0,25 M de sacarose (Merck®), 1 mM de EDTA (Merck®), 10 mM de Tris-HCl (Merck®) pH 7,5. Depois de adicionar 20% de glicerol (Merck®) e 0,1% PMSF, as amostras foram rotuladas e armazenadas a -20°C até à utilização.

4.3. Quantificação da actividade da SOD

A quantificação da actividade da SOD utilizada no presente trabalho consistiu numa modificação do método da redução do NBT (NitroBlue Tetrazolium), pela adição de BCS (Bathocuproinedisulfonic acid) (*Spitz e Oberley, 1989*). Este método indirecto utiliza o sistema xantina/xantina oxidase, como sistema gerador de aniões superóxido, e como composto indicador o NBT (amarelo), cuja redução pelos aniões é acompanhada pela produção de formazan (azul) e consequente variação na absorvância a 560 nm. Este método baseia-se na competição entre a substância indicadora e a SOD presente nas amostras, pelo anião superóxido. Assim, aquando da presença da enzima ocorre uma inibição da redução do NBT traduzida por uma menor variação nos valores de absorvância ao longo do tempo.

Em primeiro lugar preparou-se a solução 1: 35,7 mg de DETAPAC – ácido di-etileno-tri-amino-penta-acético (Sigma-Aldrich®), 1,5 mg de xantina (Sigma-Aldrich®), 2,8 mg de BCS (Sigma-Aldrich®), 13,0 mg de Albumina sérica bovina (Sigma-Aldrich®), 61 µL NBT 75 mg/mL (Fermentas®), 100 U de catálase (Fluka®) em 100 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8. Em seguida preparou-se a solução 2: 0,2 U/mL de xantina oxidase (Sigma-Aldrich®) em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8. Enquanto a solução 1 foi mantida à temperatura ambiente, a solução 2 permaneceu em gelo durante toda a experiência. Numa cuvete de vidro misturaram-se 2,9 mL de solução 1, 50 µL de homogeneizado celular e 50 a 100 µL de solução 2. Para a realização do branco substituiu-se o volume de homogeneizado celular pelo mesmo volume de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,8. A reacção foi seguida a 560 nm,

com medições de 5 em 5 segundos durante 1 minuto (Beckman® DU640 Spectrophotometer). A curva da redução do NBT na ausência de SOD foi ajustada, pela variação do volume de solução 2 adicionado, a uma $\Delta A.\text{min}^{-1} = 0,020$. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima capaz de inibir a redução do NBT para 50%. Antes de se preparar o homogeneizado celular o número de células foi quantificado, tendo sido o resultado da actividade de SOD total nas amostras expresso em U SOD/ 10^6 células de *cumulus*.

5. Análise Molecular

5.1. Preparação das amostras para SDS-PAGE

O teor de proteínas dos homogeneizados de cada colheita, preparados como se encontra acima descrito, foi quantificado pelo método de Bradford (*Bradford et al.*, 1976), após utilizar diferentes concentrações de Albumina sérica bovina para traçar a recta padrão.

Os homogeneizados que apresentaram uma menor concentração de proteínas totais foram submetidos à precipitação proteica pelo método de Ácido tricloroacético/Desoxicolato (TCA/DOC). Assim, pipetaram-se os volumes que correspondiam a 20 μg de proteínas, adicionou-se 1/15 do volume da amostra de uma solução de 3% de DOC (Sigma-Aldrich®) e 1/9 do volume da amostra de uma solução de 100% de TCA (Merck®). Estas misturas ficaram a repousar em gelo durante 15 minutos, permitindo a precipitação proteica. Em seguida as misturas foram centrifugadas (Heraeus Instruments® Biofuge haemo) a 13000 rpm, durante 15 minutos. Os sobrenadantes foram rejeitados e os sedimentos de proteínas foram lavados com acetona (Merck®). Após nova centrifugação a 13000 rpm durante 15 minutos e rejeição da acetona da lavagem, o sedimento foi depois bem seco e as proteínas foram ressuspensas em tampão de amostra para SDS-PAGE que continha: 2% de 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich®), 4% de SDS (Sigma-Aldrich®), 20% de glicerol (Merck®), 0,2% de azul de bromofenol (Sigma-Aldrich®) e 0,1 M DTT (Sigma-Aldrich®) em Tris-HCl 0,1 M pH 6,8. Para os homogeneizados que apresentavam concentração de proteínas totais mais elevada, pipetaram-se os volumes correspondentes a 20 μg de proteínas e adicionou-se também tampão de amostra. Todas as amostras foram então aquecidas a 65°C (Eppendorf® Thermomixer 5436) durante 15 minutos, e centrifugadas a 13000 rpm durante 5 minutos, ficando assim prontas para serem submetidas à electroforese.

5.2. SDS-PAGE

O procedimento utilizado na realização da electroforese vertical em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), foi previamente descrito (Cleveland *et al.*, 1977). Para a separação das proteínas dos diferentes homogeneizados utilizou-se um sistema descontinuo de géis, composto por um gel de empacotamento e um gel de separação. O gel de empacotamento, foi preparado com acrilamida a 5%, uma malha mais larga. Para o gel de separação, depois de algumas experiências preliminares, utilizou-se uma concentração de 14% de acrilamida, de modo a proporcionar uma boa resolução das proteínas com menor peso molecular, atendendo a que os monómeros das isoformas MnSOD e CuZnSOD apresentam um peso molecular aproximado de 24kDa e 21kDa, respectivamente. A separação electroforética foi realizada numa tina BioRad®, em tampão tris-HCl 25 mM, 0,1% SDS (Sigma-Aldrich®) e 250 mM de glicina (Merck®) durante aproximadamente 2 horas, à temperatura ambiente, e com uma intensidade de corrente constante de cerca de 20 mA por gel.

5.3. Western blotting

As proteínas previamente separadas por electroforese foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Schleicher & Schuell® 0,45 µm) utilizando um sistema Hoefer TE 42 a 20 V durante 2 horas em tampão de transferência constituído por 48 mM de Tris (Merck®), 39 mM de glicina (Merck®), 0,037% de SDS e 20% de metanol (Merck®). Para verificar a eficiência da transferência, a membrana de nitrocelulose foi temporariamente corada com uma solução de Ponceau S, lavada com água destilada e incubada numa solução de bloqueio constituída por 5% de leite em pó sem gordura (Nestlé® Molico) e 0,1% de Tween-20 (Sigma-Aldrich®) em TBS 0,1 M, durante 1 hora, à temperatura ambiente, de modo a bloquear os locais de ligação não específicos da membrana de nitrocelulose. Procedeu-se então à incubação da membrana em anticorpo primário policlonal de coelho anti-MnSOD ou anti-CuZnSOD (Stressgen®), diluído a 1:2000 em solução de bloqueio, durante uma noite, a 4°C e com agitação. Após esta incubação, a membrana foi lavada em TBS 0,1 M com 0,1% de Tween-20 várias vezes, e incubada em anticorpo secundário de cabra anti-coelho marcado com peroxidase (Vector®), diluído a 1:5000 em solução de bloqueio, durante 1 hora à temperatura ambiente com agitação. Por fim, foram realizadas novamente várias lavagens em TBS 0,1 M com 0,1% de Tween-20. A revelação da membrana foi

efectuada em substrato quimioluminescente para detecção da peroxidase (SuperSignal[®], West Pico Chemiluminescent Substrate) durante 5 minutos, seguida de detecção em película de raio-X (CL-X Posure[®]).

A quantificação da densidade das bandas obtidas por *Western blotting* foi realizada utilizando o *software* “Scion Image for Windows” (Scion Corporation[®]).

6. Análise Estatística

Salvo indicação em contrário, todos os resultados quantitativos são apresentados sob a forma de média $\pm$ erro padrão para a média (SEM). Utilizou-se o teste t para a análise comparativa das variáveis estudadas, considerando $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

RESULTADOS

I. Número de células e viabilidade celular

O número de células e a viabilidade celular de colheitas de *cumulus oophorus* foram, ao longo deste trabalho, os parâmetros que mais limitaram a realização das experiências. Estes dois parâmetros são muito variáveis de colheita para colheita (Figura 20). Para um total de 65 colheitas diferentes, o menor número de células observado para uma colheita foi de $5,7 \times 10^3$ células, e o valor máximo obtido foi de $1,3 \times 10^6$ células. Como se pode verificar pelo gráfico A da figura 20, 40% das colheitas apresentaram menos de 1×10^5 células: 6% das colheitas tinham menos de 1×10^4 , 23% apresentaram entre 1×10^4 e 5×10^4 células e em 11% das colheitas foram contabilizadas entre 5×10^4 a 1×10^5 células. Os restantes 60% das colheitas apresentaram acima de 1×10^5 células: em 45% das colheitas verificou-se a existência de 1×10^5 a 5×10^5 células, e por fim, 15% das colheitas obtidas tinham mais de 5×10^5 células. Relativamente à viabilidade celular, o valor máximo obtido para a percentagem de células viáveis numa colheita foi de 68%, enquanto que o valor mínimo observado foi de 9,6%. A maioria das colheitas (61%) apresentou uma viabilidade celular compreendida entre os 20 e os 40%, havendo no entanto 18% das colheitas que apresentaram viabilidade inferior a 20%, e cerca de 21% com viabilidades acima dos 40%: 8% das colheitas apresentaram viabilidades compreendidas entre 40 e 50%, outros 8% possuíam entre 50 a 60% de células viáveis e 5% das colheitas continham acima de 60% de células viáveis (Figura 20B).

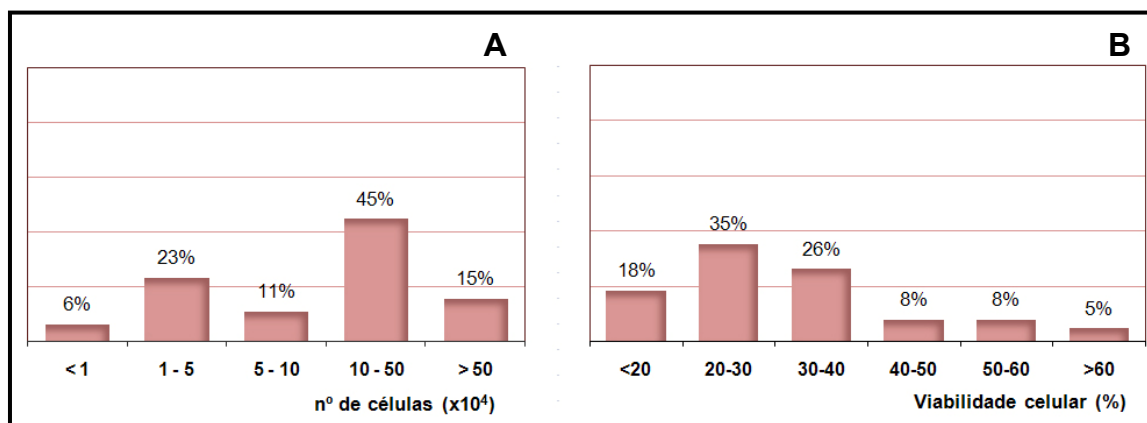


Figura 20: Variação no número de células (A) e na viabilidade celular (B) das diferentes colheitas de *cumulus oophorus*.

II. Caracterização das culturas primárias de células de *cumulus oophorus*

Diversas colheitas de células de *cumulus oophorus* removidas mecanicamente de complexos ovócito-cumulus humanos foram cultivadas em placas de 24 poços em meio M-199 suplementado. No dia em que foram colocadas em cultura, as células

encontravam-se dissociadas e em suspensão. Ao fim do primeiro dia, começaram a aderir à superfície da placa e a formar prolongamentos citoplasmáticos. No segundo dia em cultura estes prolongamentos estabeleciam já contactos entre as células o que favoreceu o seu crescimento e proliferação, evidentes a partir do quarto dia em cultura (Figura 21). Este comportamento não se verificou para todas as colheitas colocadas em cultura, uma vez o número de células inicial e a viabilidade celular da colheita são cruciais para o sucesso da cultura destas células. Este foi de facto uma das grandes limitações ao uso de células de *cumulus oophorus* provenientes de pacientes individuais para estudos de crescimento e proliferação *in vitro* uma vez que o número de células viáveis obtidas em algumas colheitas era escasso. Outra limitação importante, especialmente ao estudo prolongado destas células, advinha da ocorrência, não rara, de contaminações das culturas. Além da mudança de cor do meio de cultura (devido à alteração de pH), a observação das placas no microscópio invertido revelava a presença de microrganismos que se movimentavam em suspensão no meio, e que por vezes formavam focos de pequenos agregados celulares. Ocasionalmente encontravam-se células de tipo navicular, originárias do epitélio pavimentoso vaginal, arrastadas durante a punção e certamente contribuindo para a contaminação do meio com agentes infecciosos. Estas circunstâncias motivaram alterações na composição inicial do meio, em particular a adição de antifúngicos. O problema foi também resolvido em parte, encorajando a limpeza cuidada dos fundos de saco vaginais antes de se realizar as punções.

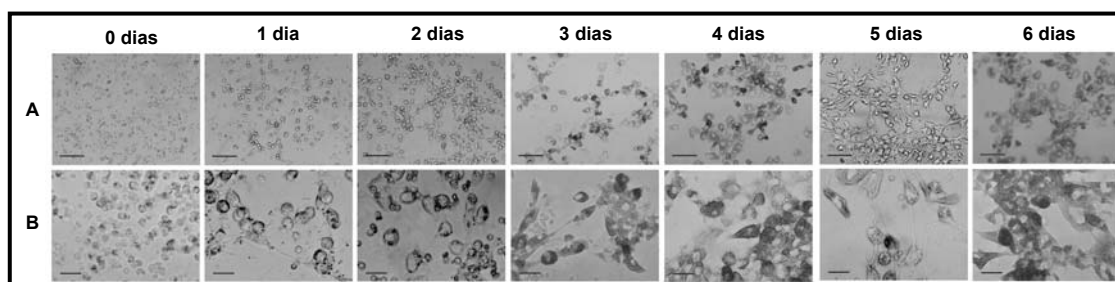


Figura 21: Aspecto morfológico das células do *cumulus oophorus* em cultura ao longo do tempo. Ao fim de 2 dias em cultura as células encontram-se já totalmente aderentes à superfície da placa. Aos 4 dias as células estabeleceram já contactos entre elas que lhes permite crescer e proliferar. **A:** barra = 100 μm; **B:** barra = 20 μm

Aos três dias de cultivo, no exame morfológico de células coradas com Hematoxilina-Eosina verificou-se que elas exibiam prolongamentos citoplasmáticos longos que permitiam o estabelecimento de contactos entre células adjacentes. Além disso, tornavam-se maiores e começavam a proliferar, como demonstravam as frequentes figuras mitóticas, bem evidenciadas pela basofilia dos cromossomas. A partir do quinto dia, a proliferação celular mantinha-se até se atingir um estado de

confluência, o que se verificou na maior parte dos casos por volta dos quinze dias (Figura 22), embora, mais uma vez, dependente do número inicial de células e da sua viabilidade.

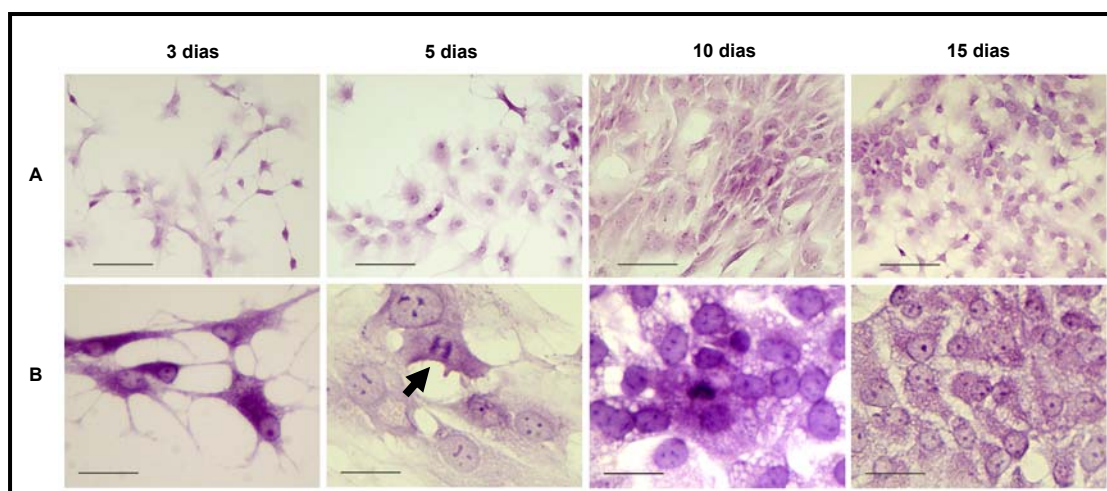


Figura 22: Células em cultura submetidas à coloração Hematoxilina-Eosina. No terceiro dia as células encontram-se totalmente aderentes às lamelas exibindo longos prolongamentos citoplasmáticos. Aos 5 dias começam a aparecer algumas figuras mitóticas (seta). A proliferação continua até se atingir um estado de confluência por volta dos 15 dias. **A:** barra = 100µm; **B:** barra = 25 µm

Além das modificações da periferia celular já referidas (a formação de prolongamentos e a aquisição de uma configuração estrelada) e do aparecimento de figuras de mitose, houve modificações citoplasmáticas sugerindo a acumulação de lípidos na forma de pequenas gotas, o que veio a ser confirmado em algumas lamelas coradas com Sudão III/IV aos 3, 5, 10 e 15 dias (Figura 23). No terceiro dia todas as células revelaram a presença de uma grande quantidade de gotas lipídicas no seu

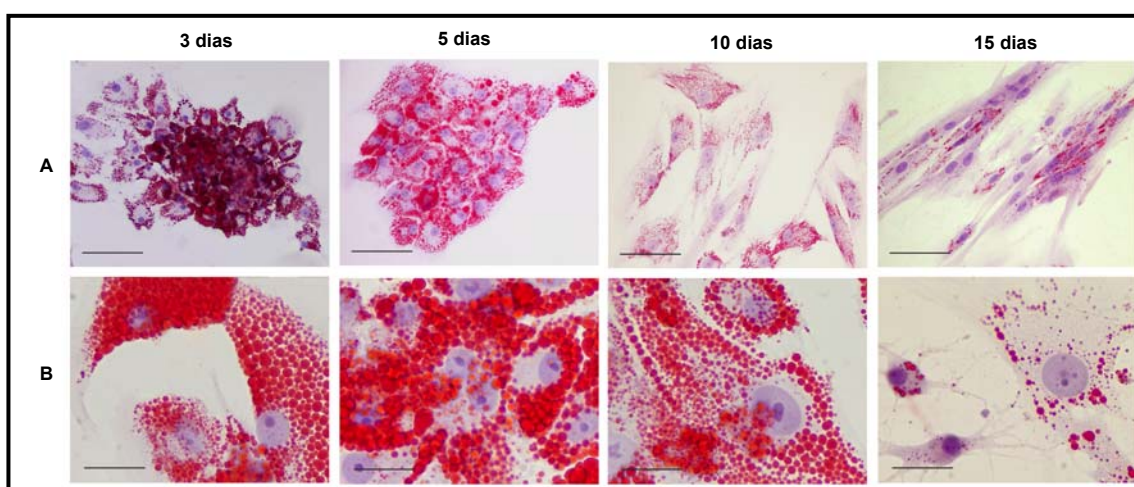


Figura 23: Células em cultura coradas com Sudão III/IV. Com 3 dias todas as células possuem gotas lipídicas, o que já não se verifica aos 15 dias. **A:** barra = 100µm; **B:** barra = 25 µm

citoplasma, que se manteve até ao quinto dia de cultura. Aos 10 dias, as gotas lipídicas são já menores e menos abundantes, tendência que prossegue até aos 15 dias de cultura, quando algumas das células estão já delas isentas.

III. Estudo ultra-estrutural

A organização ultra-estrutural das células de *cumulus oophorus* estava de acordo com a organização característica de células esteroidogénicas (Figura 24). O núcleo, de grandes dimensões, continha heterocromatina perinuclear e perinucleolar, sendo o nucléolo habitualmente volumoso. No citoplasma, existiam diversas gotas

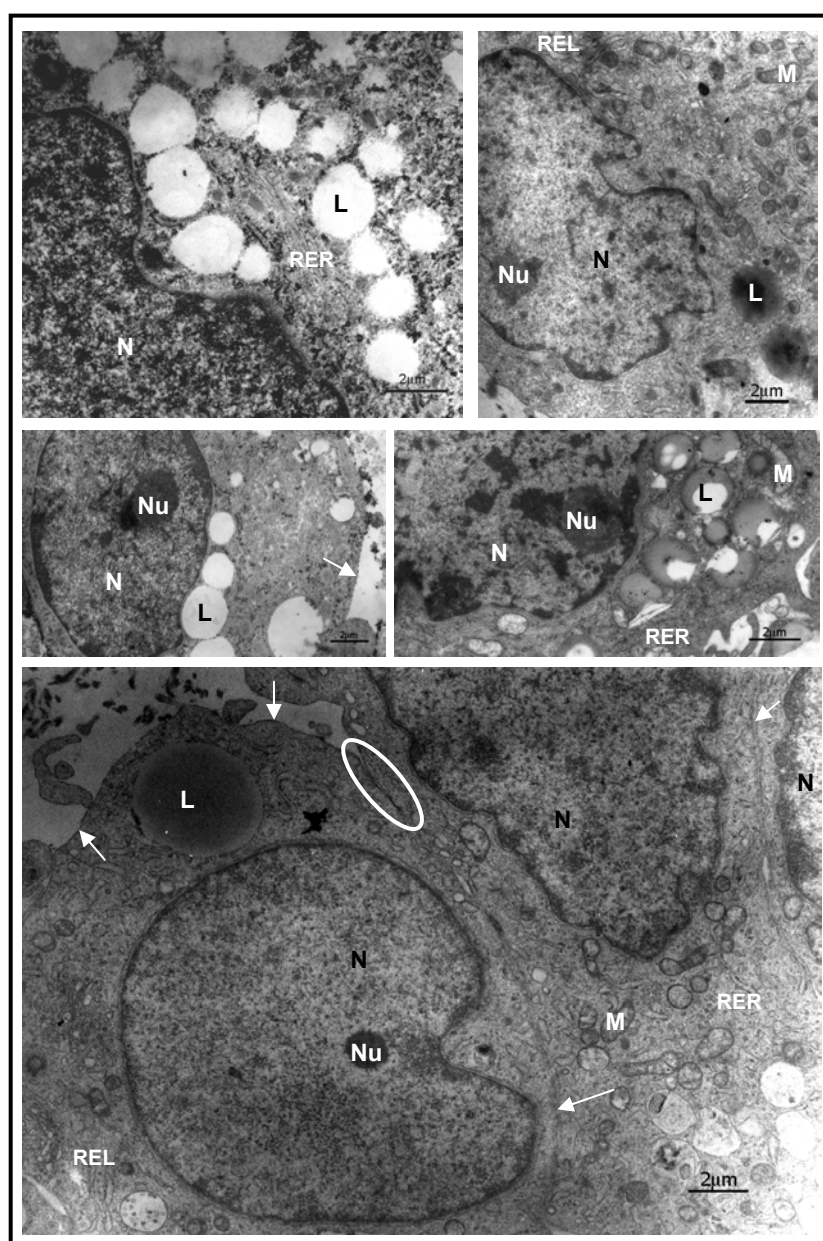


Figura 24: Ultra-estrutura das células do *cumulus oophorus*. N: Núcleo; Nu: Nucléolo; L: Gota Lipídica; M: Mitocôndria; RER: Retículo Endoplasmático Rugoso; REL: Retículo Endoplasmático Liso; Seta: Membrana Citoplasmática; Elipse: Junção de hiato.

lipídicas, de densidade electrónica variável, frequentemente rodeadas por sistemas membranares de perfil vesicular, típico do retículo endoplasmático liso e numerosas mitocôndrias ovóides ou em forma de bastonete e com cristas do tipo tubulo-vesicular. Nas zonas de contacto entre células contíguas foram identificados locais de contacto íntimo de membranas celulares adjacentes sugerindo junções de hiato, que são cruciais para a troca de pequenas moléculas entre as células da granulosa e permitem que estas respondam a sinais extracelulares de forma coordenada (Gittens *et al*, 2005).

IV. Imunodeteccção das enzimas CuZnSOD e MnSOD

As enzimas antioxidantes MnSOD e CuZnSOD foram detectadas por imunocitoquímica em células de *cumulus oophorus* aderentes a lamelas de vidro, com 5 e 10 dias de cultura. Para a isoforma mitocondrial MnSOD, verificou-se, durante a totalidade do tempo de cultura, uma marcação citoplasmática de aspecto granular, dispersa, em todas as células, compatível com a localização subcelular da enzima; os núcleos estavam isentos de marcação. Já a isoforma citoplasmática CuZnSOD encontrava-se homogeneamente distribuída pelo citoplasma de todas as células, tendo sido por vezes detectada numa maior abundância na região perinuclear (Figura 25).

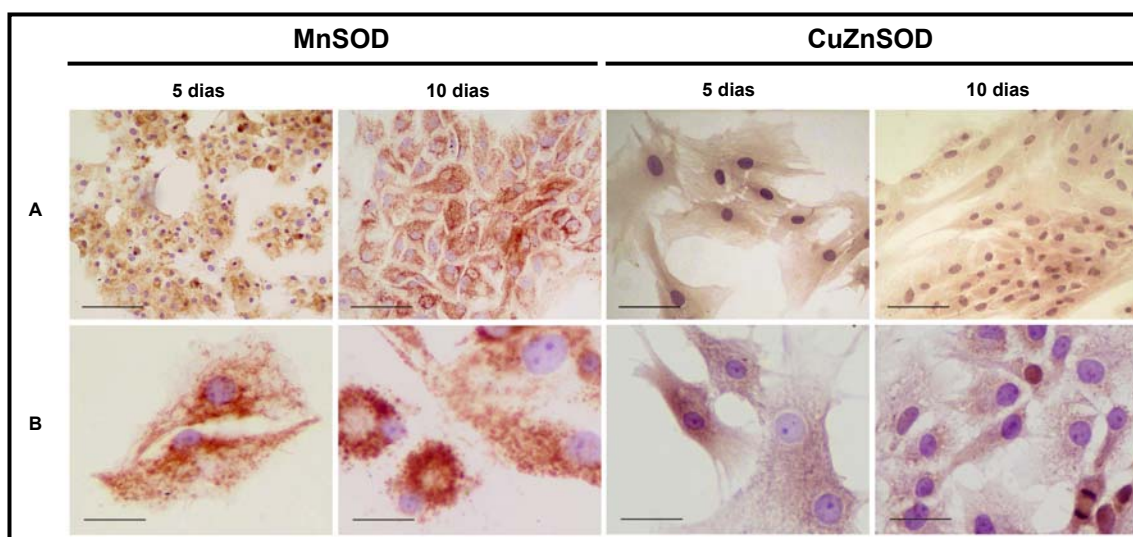


Figura 25: Imunodeteccção da MnSOD e CuZnSOD em células de *cumulus oophorus*. Ao longo de toda a cultura, todas as células apresentam marcação para as enzimas MnSOD e CuZnSOD. **A:** barra=100 μ m; **B:** barra = 25 μ m

V. Quantificação da actividade da SOD

Para a quantificação da actividade total da SOD utilizaram-se 44 colheitas de CCO provenientes de diferentes pacientes. Os valores obtidos situavam-se entre as 0,2 U SOD/ 10^6 células e as 31,1 U SOD/ 10^6 células. Confrontando esses valores com a causa de infertilidade da respectiva paciente, verificou-se que nos casos em que o factor masculino era causa única estabelecida ($n=23$), o valor médio da actividade da SOD era de $2,18 \pm 0,32$ U SOD/ 10^6 células (Figura 26). Estes casos foram utilizados como controlo. Para os casos cujo motivo de infertilidade era desconhecido ou inexplicado ($n=5$) observou-se um valor médio de $3,73 \pm 1,42$ U SOD/ 10^6 células. Apesar de existir uma tendência para este valor ser superior ao encontrado nos casos controlo, a diferença obtida não foi significativa ($p>0,05$). No entanto, nos casos de infertilidade de causa ovulatória ($n=5$) ou secundária a endometriose ($n=6$), notou-se aumento da actividade da SOD comparativamente com o controlo: $8,22 \pm 2,24$ U SOD/ 10^6 células e $12,35 \pm 4,89$ U SOD/ 10^6 células, respectivamente ($p<0,05$). Nos casos referidos como de «origem tubária» ($n=4$), verificou-se actividade da SOD de

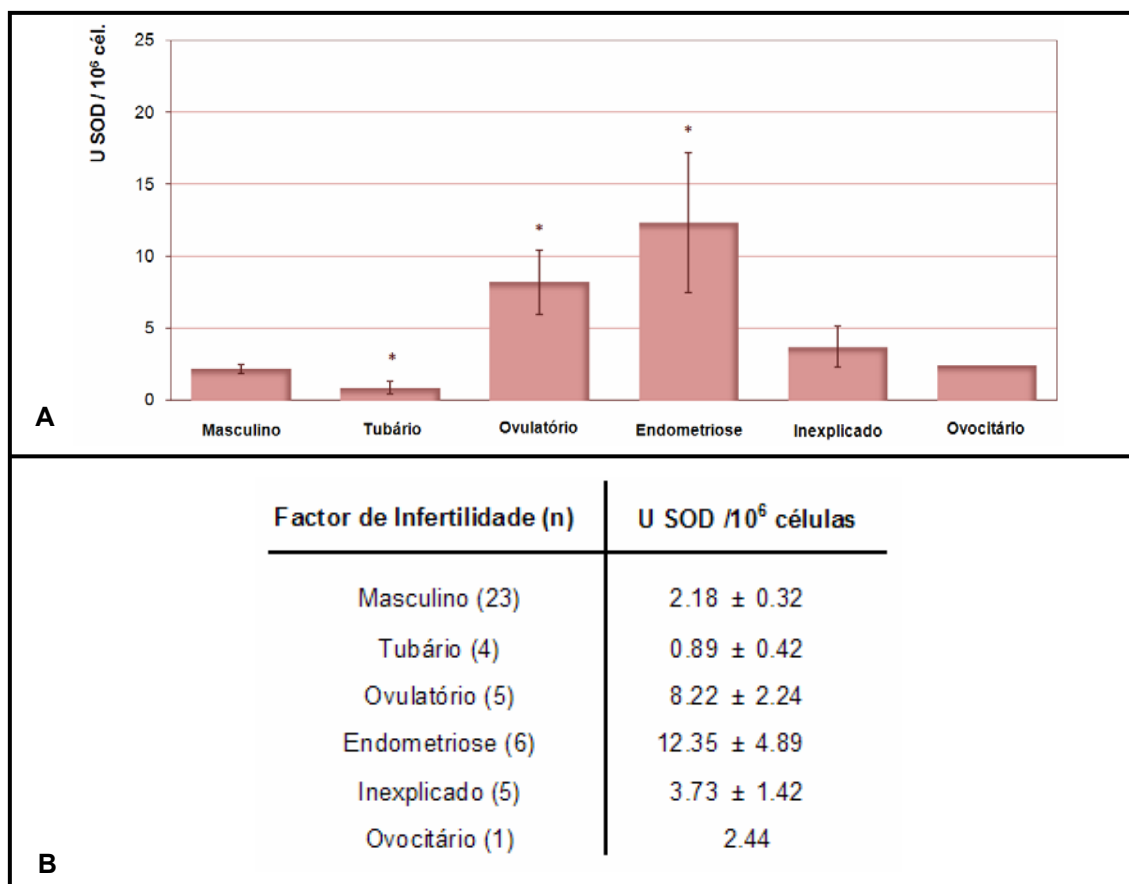


Figura 26: Representação gráfica dos valores da actividade da SOD total nas colheitas de *cumulus oophorus* em função da causa de infertilidade. (A), e respectiva tabela de valores com indicação do número de colheitas (n) para cada factor de infertilidade (B). Valores apresentados como Média $\pm$ Erro padrão. * $p < 0,05$ quando comparado com o factor masculino.

$0,89 \pm 0,42$ U SOD/ 10^6 células, significativamente diminuída quando comparada com os controlos ($p < 0,05$).

A variação da actividade da SOD nas células de *cumulus oophorus* com a idade, foi avaliada utilizando-se apenas os 23 casos controlo, para que fosse excluída a possível influência das diferentes patologias. A idade das pacientes, cujo único factor de infertilidade era de causa masculina, variou entre os 23 e os 42 anos. Assim, formaram-se quatro grupos etários distintos: células de pacientes com idade menor ou igual a 30 anos ($n=5$), compreendida entre os 31 e os 33 anos ($n=9$), os 34 e 36 anos ($n=6$) e por fim superior ou igual a 37 anos ($n=3$). O valor médio, obtido para a actividade de SOD nas células de *cumulus oophorus* das pacientes dos diferentes grupos etários, encontra-se registado na figura 27B. Observando a representação gráfica dos valores obtidos, verificou-se uma tendência para a diminuição da actividade da SOD nas células do *cumulus oophorus* com o aumento da idade da mulher (Figura 27A), que, lembra-se, neste grupo é tida como saudável. O valor máximo registado foi de $2,75 \pm 0,25$ U SOD/ 10^6 células para o grupo das mulheres mais jovens (≤ 30 anos) e o valor mais baixo foi de $1,30 \pm 0,46$ U SOD/ 10^6 células para o grupo com idades compreendidas entre os 34 e os 36 anos, o que corresponde a cerca de metade da actividade de SOD encontrada para o grupo mais jovem ($p < 0,05$).

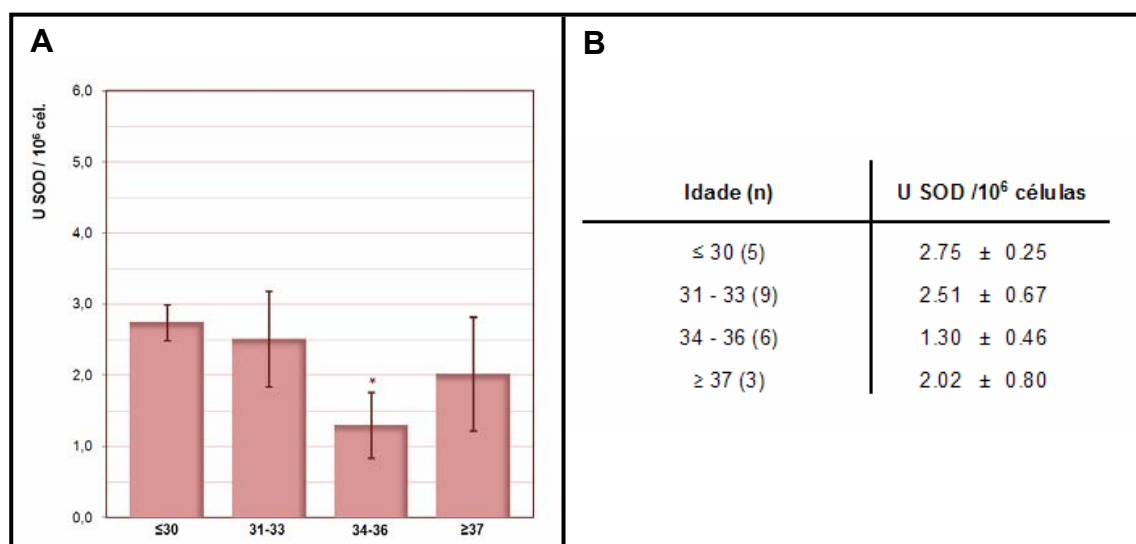


Figura 27: Representação gráfica dos valores da actividade da SOD total nas células de *cumulus oophorus* em função idade das pacientes (A) e respectiva tabela de valores com indicação do número de colheitas utilizadas (n) para cada grupo de idades (B). Valores apresentados como Média $\pm$ Erro padrão. * $p < 0,05$ comparativamente com o grupo mais jovem (≤ 30 anos).

VI. Detecção e quantificação da CuZnSOD e MnSOD

As duas isoformas intracelulares de SOD, a mitocondrial MnSOD e a citoplasmática CuZnSOD, foram detectadas e quantificadas em homogeneizados de células de *cumulus oophorus* humanas provenientes de pacientes com diversas indicações de Infertilidade, recorrendo à técnica de *Western Blotting*. A quantidade de MnSOD nas células de *cumulus oophorus* não varia nas mulheres cujo factor de infertilidade é ovulatório ou endometriose (Figura 28A) encontrou-se com a quantidade existente nas mesmas células de mulheres sem patologia (factor masculino). Verificou-se, no entanto, um aumento de cerca de 83% na quantidade da MnSOD nas células de *cumulus oophorus* de mulheres cujo factor de infertilidade era desconhecido ou inexplicado comparativamente com as mulheres controlo ($p < 0,001$). Relativamente à CuZnSOD (Figura 28B) verificou-se um aumento de cerca de 32% na quantidade de enzima para o grupo de pacientes cujo factor de infertilidade era ovulatório comparativamente com o grupo das pacientes controlo ($p < 0,05$). Adicionalmente, verificou-se que para o grupo de pacientes com endometriose a quantidade de CuZnSOD nas células de *cumulus oophorus* estava aumentada para mais do dobro (115%) quando comparada com a quantidade da mesma enzima nas mulheres sem patologia associada ($p < 0,05$).

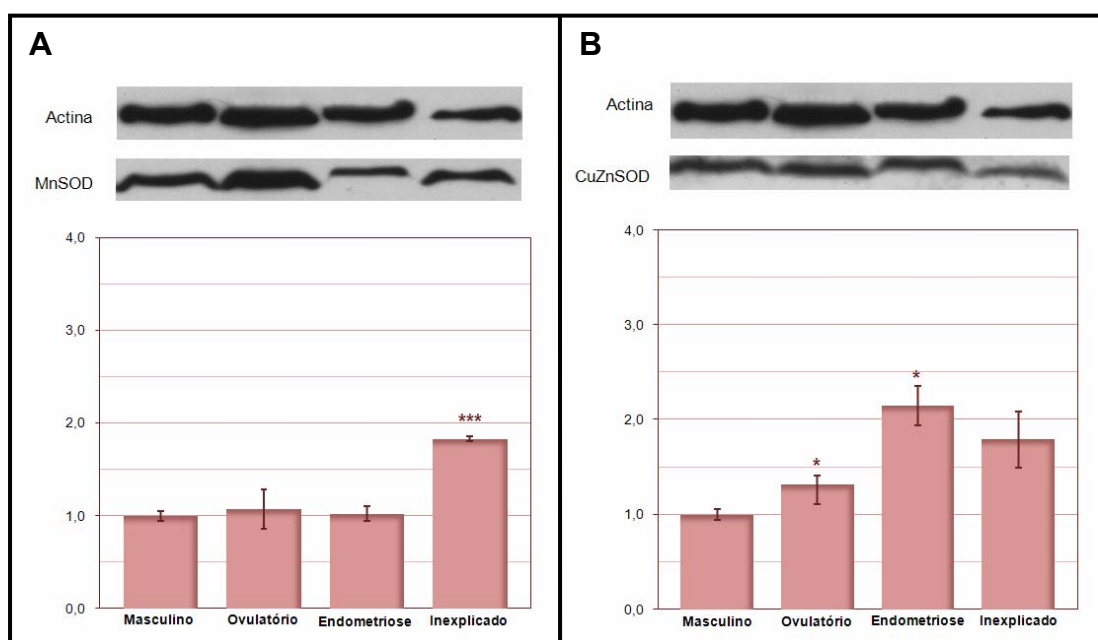


Figura 28: Variação da quantidade das isoformas intracelulares da SOD de acordo com a causa de infertilidade das pacientes. (A) Isoforma mitocondrial MnSOD; (B) Isoforma citoplasmática CuZnSOD. Valores relativos assumindo que a quantidade da respectiva isoforma no grupo controlo é igual a 1.

* $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ comparativamente com o grupo de factor masculino

Realizou-se também a detecção e quantificação das duas isoformas intracelulares de SOD por *Western Blotting* em homogeneizados de células de *cumulus oophorus* de pacientes controlo (factor masculino) agrupadas nos quatro grupos de idades já definidos anteriormente: idade menor ou igual a 30 anos, compreendida entre 31-33 anos, 34-36 anos e superior ou igual a 37 anos (Figura 29). Relativamente à isoforma mitocondrial da SOD, a MnSOD (Figura 29A), verificou-se uma diminuição de 44% na sua expressão, no grupo de pacientes com idade ≥ 37 anos quando comparada com o grupo mais jovem ($p < 0,01$). As restantes variações na quantidade de MnSOD entre os restantes grupos etários não foram estatisticamente significativas. No que diz respeito à isoforma citoplasmática da SOD, a CuZnSOD (Figura 29B) observou-se diminuição de cerca de 28% na expressão desta enzima para o grupo com idades compreendidas entre os 34 e os 36 anos ($p < 0,01$) e uma diminuição mais notável, cerca de 33%, para o grupo com idade ≥ 37 anos ($p < 0,05$), quando comparadas com o grupo mais jovem.

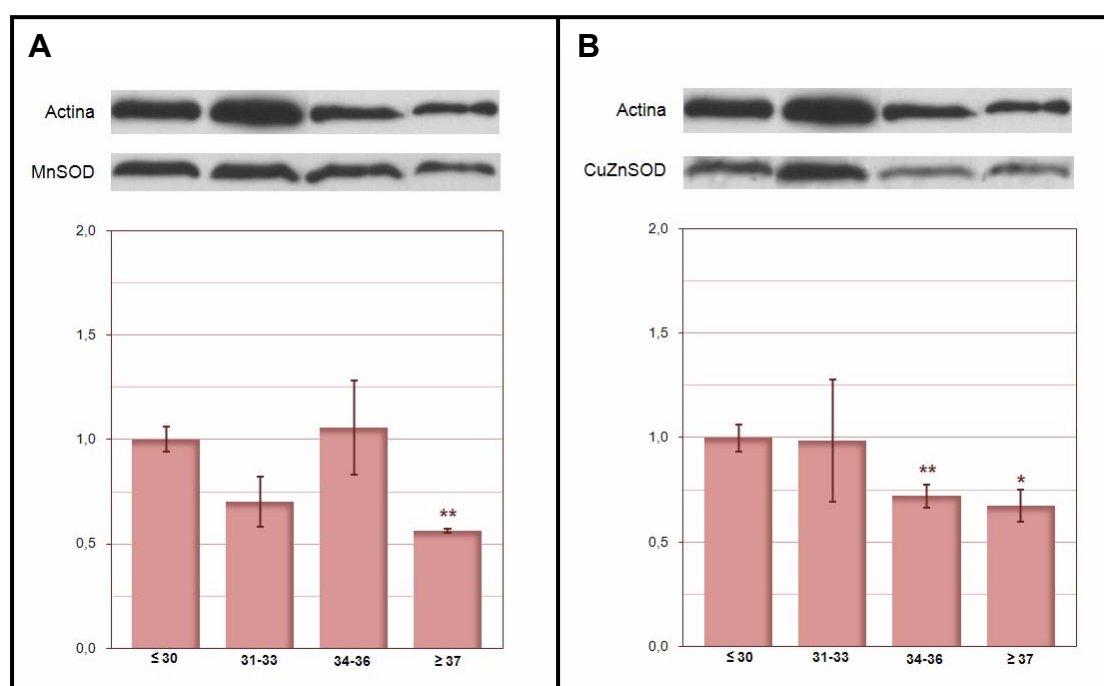


Figura 29: Variação da quantidade das isoformas intracelulares da SOD de acordo com a idade das pacientes. (A) Isoforma mitocondrial MnSOD; (B) Isoforma citoplasmática CuZnSOD. Valores relativos assumindo que a quantidade da respectiva isoforma no grupo mais jovem é igual a 1.

* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparativamente com o grupo mais jovem.

DISCUSSÃO

As células do *cumulus oophorus* mais frequentemente estudadas são provenientes de outros mamíferos que não o ser humano. São disso exemplo o ratinho (Eppig, 1980), o rato (Khamisi e Roberge, 2001), o porco (Sirotkin et al., 2002) e a vaca (Roberts et al., 1994). Acresce ainda que além de serem pouco conhecidas, o estudo de células de *cumulus oophorus* humanas *in vitro*, é feito após breves períodos de tempo em cultura, não superiores a 48h (Baltes et al., 1998; Chian et al., 1999). O objectivo desses trabalhos é geralmente quantificar determinadas moléculas, caso de esteróides e ácido hialurónico segregados, após estímulos com factores de crescimento e/ou hormonas gonadotróficas.

Tanto quanto sabemos, o presente trabalho é o primeiro que utiliza culturas primárias de células de *cumulus oophorus* humanas de diferentes pacientes por um período de tempo alongado, que neste caso atinge 15 dias. O seu exame morfológico ao longo desse período de tempo, mostrou que, nestas condições de cultura, as células têm comportamentos semelhantes ao de outras células quando cultivadas. Em particular, aderem ao fundo da placa e adquirem prolongamentos citoplasmáticos que permitem o estabelecimento de contactos entre si, proliferar e manter-se activas.

A síntese de esteróides pelas células de *cumulus oophorus in vitro* encontra-se já bem documentada por vários investigadores na vaca (Mingoti et al., 2002), no rato (Sherizly, 1980), no porco (Channing et al., 1981) e também no ser humano (Chian et al., 1999; Schoenfelder et al., 2003). O facto de se ter observado importantes depósitos lipídicos (evidenciados pela sua positividade com o Sudão III/IV) e a sua regressão, indica que nas condições de cultura aqui descritas, a natureza esteroideogénica das células se mantém e subsiste a produção de hormonas esteróides.

As células da granulosa desempenham um papel fundamental na criação do microambiente necessário para o crescimento e maturação do ovócito (Skinner, 2005). Usualmente, essas células são obtidas por centrifugação do líquido folicular colhido em mulheres que se submetem a tratamento de infertilidade e por isso são constituídas essencialmente por células da granulosa murais e antrais, muitas vezes contaminadas com eritrócitos e diversos glóbulos brancos. Morfologicamente, as células da granulosa, murais e antrais, apresentam forma poliédrica e núcleo proeminente com quantidade variável de heterocromatina e 1 ou 2 nucléolos. No citoplasma existe um número variável de gotas lipídicas que podem ser mais ou menos densas electronicamente e quando é estudada a sua ultra-estrutura, observa-se retículo endoplasmático rugoso e liso, complexo de Golgi pouco desenvolvido e diversas mitocôndrias (Dhar et al., 1996). O interesse por estas células e a necessidade de evitar esta contaminação suscitaram a busca de métodos adequados

à sua purificação (Quinn *et al.* 2006) e a análise ultra-estrutural das células assim isoladas, revelou elementos morfológicos do núcleo e citoplasma que confirmaram os achados de Dhar e cols.

As células do *cumulus oophorus*, porém, não têm ultra-estrutura tão bem conhecida devido à maior dificuldade na sua obtenção. Motta e cols. (1995) realizaram uma análise ultra-estrutural das células de *cumulus oophorus* a rodear ovócitos, fertilizados ou não, presentes no oviducto de mulheres saudáveis que se submeteram a esterilização cirúrgica. O núcleo dessas células, a acompanhar a sua forma, apresentava cromatina dispersa no centro, heterocromatina perinuclear típica e um nucléolo volumoso. No citoplasma, estas células continham numerosas gotas lipídicas, mitocôndrias em forma de bastonete, uma extensa rede de retículo endoplasmático liso, vesículas e membranas pertencentes a complexos de Golgi e algumas cisternas de retículo endoplasmático rugoso. As gotas lipídicas encontravam-se frequentemente próximas das mitocôndrias, ou rodeadas por retículo endoplasmático liso (Motta *et al.*, 1995) numa organização semelhante à de outras células esteroideogénicas (Rhodin, 1971).

No presente trabalho, a organização ultra-estrutural das células de *cumulus oophorus* estudadas *ex vivo* era muito semelhante à que se acaba de se descrever. Este facto indica que as células do *cumulus oophorus* utilizadas permanecem funcionalmente activas, o que está de acordo com os diversos dados de observação já referidos. A proximidade frequentemente observada entre as gotas lipídicas e as mitocôndrias ou o sistema membranar pertencente ao retículo endoplasmático, realça o papel destes organelos na esteroideogénese e sugere ainda que estas células mantêm uma elevada capacidade de síntese dessas hormonas.

O papel das espécies reactivas de oxigénio e enzimas antioxidantes nos tecidos do sistema reprodutor feminino ao longo do ciclo menstrual, tem sido alvo de investigação e parece ser fisiologicamente importante durante o processo da ovulação (Espey, 1980), na regulação do desenvolvimento folicular que a antecede e na luteinização que se lhe segue (Laloraya *et al.*, 1989). Adicionalmente, as células do *cumulus oophorus* são extremamente importantes para a protecção do ovócito da apoptose induzida pelo stress oxidativo (Tatemoto *et al.*, 2000). É assim crucial que os níveis de ROS produzidas durante a ovulação se encontrem equilibrados com a capacidade antioxidante do meio envolvente, no que se inclui as células do *cumulus oophorus*, de modo a evitar o stress oxidativo e a ocorrência de danos no ovócito que afectem a função reprodutiva (Fujii *et al.*, 2005).

As ROS originam-se em células inflamatórias como macrófagos e neutrófilos que estão presentes no ovário na altura da ovulação (Brännström *et al.*, 1993), e

produzem níveis elevados de radicais livres. No entanto, há ampla evidência de que outras células, residentes no ovário, exercem também um papel considerável nesse domínio. Em tecido ovárico de mulheres submetidas a histerectomia ou ooforectomia, não foi detectada a CuZnSOD no epitélio germinativo, túnica albugínea e folículos pré-antrais. Todavia, nos folículos antrais observou-se expressão intensa dessa mesma isoforma nas células da teca que os rodeavam, e marcação fraca ou inexistente nas células da granulosa (Shiotani *et al.*, 1991). Num outro estudo de pesquisa da distribuição da CuZnSOD no ovário humano, verificou-se que os folículos primordiais e primários se encontravam isentos de marcação, enquanto que os folículos pré-antrais e antrais não dominantes, apresentavam marcação tênue e circunscrita às células da teca interna que os envolviam. Porém, nos folículos dominantes, além das células da teca interna envolventes, as células da granulosa já possuíam marcação evidente para essa isoforma (Suzuki *et al.*, 1999).

No que diz respeito à presença e distribuição da isoforma MnSOD no ovário humano, ela foi originalmente descrita por imunohistoquímica nas células da granulosa e nas da teca (Tamate *et al.*, 1995). Um estudo posterior confirmou presença de marcação fraca, nas células da teca que rodeavam folículos pré-antrais e respectivas células da granulosa, mas ausência nos folículos primordiais e primários. Todavia, nos folículos antrais, dominantes ou não, era detectável uma marcação intensa tanto nas células da granulosa como nas células da teca interna circundantes (Suzuki *et al.*, 1999).

Estes dados mostram que as células esteroidogénicas do folículo ovárico e da teca adjacente sintetizam activamente MnSOD e CuZnSOD mas não o fazem permanentemente. De facto, quer para uma enzima quer para a outra a expressão inicia-se quando os folículos são recrutados durante a fase proliferativa e a expressão é intensa quando eles se tornam dominantes. Tal indica pois que *in vivo*, ambas as enzimas têm uma acção muito importante no momento crítico da vida do folículo, isto é, quando ele é determinado a seguir para a ovulação.

No presente trabalho, as células de *cumulus oophorus* utilizadas provêm de folículos ováricos de mulheres submetidas a hiperestimulação ovárica controlada, que mimetizam os folículos antrais maduros. O estudo imunocitoquímico nelas realizado mostrou que ambas as isoformas de SOD têm elevada expressão e que esta se mantém em todas as células de *cumulus oophorus* ao longo da totalidade do tempo de cultura. A notável concordância desta marcação com a observada nos cortes de ovário, já descrita, apoia a utilidade deste procedimento para o estudo do papel destas células e mostra o seu papel importante no amortecimento ou prevenção do stress oxidativo no folículo maduro, antecedente da ovulação.

Outros dados sugerem que na função reprodutora feminina, as ROS e os antioxidantes desempenham um papel complexo que tanto pode ser fisiológico como contribuir para acções patológicas (Agarwal e Allamaneni, 2004). Um modo de o avaliar é determinar os teores de ROS e antioxidantes no tracto reprodutor feminino. Tal revela-se uma tarefa bastante difícil atendendo à sua enorme diversidade (veja-se por exemplo a variedade de compartimentos no ovário).

O líquido folicular, pela facilidade na sua obtenção e por ser considerado representativo do microambiente que envolve o ovócito em desenvolvimento antes de ovular, é o componente melhor estudado. A capacidade antioxidante total é baixa no líquido folicular de folículos cujos ovócitos apresentam um potencial de fertilização diminuído (Oyawoye *et al.*, 2003). No mesmo ambiente, níveis reduzidos da enzima peroxidase da glutathione dependente de selénio, encontram-se associados com a incapacidade de fertilização dos ovócitos recolhidos dos respectivos folículos (Paszkowski *et al.*, 1995). No entanto, um outro estudo constatou que a actividade da SOD era superior no líquido folicular de folículos cujos ovócitos não fertilizaram, quando comparada com o de folículos cujos ovócitos fertilizaram (Sabatini *et al.*, 1999). Num estudo quantitativo da SOD, catálase e peroxidase da glutathione em líquido folicular encontraram-se variações no seu teor em relação com a idade das pacientes e em particular observou-se o aumento de 25% da actividade da SOD (Carbone *et al.*, 2003). A intervenção e influência do stress oxidativo, num ambiente especial como é o do líquido folicular, está pois bem evidenciada. Mas continua por se saber se o papel que cabe a cada um dos intervenientes é unicamente de amortecedor do stress oxidativo ou também de regulador.

As células da granulosa são igualmente componentes desse ambiente folicular. Nelas, o envelhecimento reprodutivo está associado à diminuição da expressão de enzimas antioxidantes de combate directo às ROS, como é o caso das duas isoformas intracelulares de SOD, a CuZnSOD e a MnSOD, e da catálase (Tatone *et al.*, 2006). Visto que as células da granulosa são cruciais para a maturação folicular e ovocitária, é provável que a diminuição do poder antioxidante destas células e o consequente aumento do stress oxidativo não permitam o normal desenvolvimento ovocitário nas mulheres com idade reprodutiva avançada. No presente trabalho, demonstrou-se que nas células do *cumulus oophorus*, a actividade da SOD total, bem como a quantidade das duas isoformas intracelulares, diminui também com a idade reprodutiva da mulher. Observando independentemente a variação da expressão de cada uma das isoformas de SOD, verificou-se que os níveis da CuZnSOD citoplasmática diminuíam significativamente a partir dos 34 anos de idade e os da MnSOD mitocondrial só diminuíam de modo significativo a partir dos 37 anos. Atendendo a que o aumento do

stress oxidativo durante o envelhecimento reprodutivo provoca danos nas células da granulosa, que atingem essencialmente as mitocôndrias (Tatone *et al.*, 2006), tal poderá justificar a diminuição da isoforma mitocondrial MnSOD nas células do *cumulus oophorus* numa fase já mais tardia do envelhecimento reprodutivo.

Para além da diferente expressão conforme a idade das pacientes, a actividade de SOD total mostrou algumas diferenças consoante a causa de infertilidade, estando aumentada nos casos de origem ovulatória e de endometriose, e diminuída nos de origem tubária comparativamente com os casos controlo.

A disfunção ovulatória é um dos factores de infertilidade feminina mais comum, e na idade adulta decorre de causas hipotalâmicas (35%), hipofisárias (15%) ou ováricas (50%), estas frequentemente em associação com a depleção precoce da reserva ovárica e o síndrome do ovário policístico (Strauss e Barbieri, 2004). O pequeno número de casos e a escassez das informações recebidas não permitem uma discussão segura. Mas atendendo a que a grande maioria das situações de disfunção de origem ovárica resulta de síndrome do ovário policístico, que se sabe cursar com aumento de ROS (González, 2006), essa poderá ser a justificação para o aumento da actividade da SOD nestes casos estudados, comparativamente com os casos controlo.

No presente estudo observou-se aumento de actividade de SOD total nas amostras de *cumulus oophorus* provenientes de mulheres com endometriose; apesar de se tratar de uma entidade com manifestações clínicas e patológicas bem conhecidas, a sua etiologia continua misteriosa. Porém, há evidência substancial a favor da intervenção do stress oxidativo na endometriose como o atestam os estudos no soro (Shanti *et al.*, 1999), no fluido peritoneal (Szczepanska *et al.*, 2003), no endométrio (Ota *et al.*, 1999), nas células da granulosa (Saito *et al.*, 2002) e nas células do *cumulus oophorus* (Seino *et al.*, 2002 e presente estudo) de mulheres com endometriose. Enquanto se mantém por esclarecer o mecanismo subjacente ao stress oxidativo na endometriose, no trabalho presente, as células mostraram-se capazes de uma boa resposta antioxidante ao activar algumas enzimas importantes. Se essa resposta é insuficiente ou se a acção oxidante é excessiva ou se ambos contribuem para a endometriose, é algo incerto. Há pois imenso espaço para investigação ulterior.

A actividade aumentada da SOD nos casos de endometriose parece resultar inteiramente da expressão aumentada da isoforma CuZnSOD, conforme se conclui do estudo por *Western blotting*. Sendo esta enzima característica da fracção extra-mitocondrial do citoplasma das células do *cumulus oophorus*, a sua intervenção preponderante sugere que será este o mecanismo antioxidante que estas células usualmente activam quando confrontadas com o stress oxidativo, pois também é

aquele que gradualmente perdem à medida que o envelhecimento reprodutivo vai progredindo.

Mas é possível que outros factores mediem a acção antioxidante em condições peculiares, como por exemplo na infertilidade de causa inexplicada. No presente trabalho, com surpresa verificamos que comparando estes casos com os controlos, a actividade da SOD total é maior, de modo não significativo, mas sobretudo porque há um aumento, significativo, da quantidade de MnSOD. Assim, é provável que, neste tipo especial de infertilidade, seja activado um mecanismo antioxidante peculiar nas células do *cumulus oophorus*, dando preferência ao aumento da expressão da MnSOD em relação ao da CuZnSOD. Outras informações e outros estudos seriam necessários para aprofundar os motivos destas diferenças.

O factor tubário de infertilidade está normalmente associado a obstrução total ou parcial das trompas de Falópio que resulta, frequentemente, de infecções pélvicas. Nos casos em que ocorre hidrossalpinge, o fluido acumulado exerce influência negativa nas taxas de sucesso da fertilização *in vitro*, uma vez que dificulta a implantação do embrião. Curiosamente, este efeito embriotóxico do fluido de hidrossalpinge parece resultar da existência de teores de ROS inferiores a um mínimo necessário para o desenvolvimento embrionário normal (Bedaiwy *et al.*, 2002b), e tal poderá dever-se a danos consideráveis na endossalpinge (Agarwal *et al.*, 2008).

Além da esperada influência do fluido tubário sobre o ovo em desenvolvimento, os resultados deste trabalho sugerem que o fluido exerce acções a montante, sobre o próprio desenvolvimento ovocitário. De facto, observa-se diminuição significativa na actividade da SOD nas células de *cumulus oophorus* de pacientes com infertilidade tubária comparativamente com as pacientes controlo, indicando a existência de menores níveis de ROS; além disso, em apoio destes dados, verificou-se que o teor de 8OHdG em células de *cumulus oophorus* de doentes com infertilidade de causa tubária era semelhante ao teor quando a causa era o factor masculino, mas significativamente menor que o observado nas doentes com endometriose (Seino *et al.*, 2002). Há pois, menor produção de ROS nos casos de infertilidade de causa tubária e é provável que sendo a obstrução das trompas um achado frequente, o fluido tubário esteja por isso impedido de atingir o peritoneu, aí provocar inflamação e activar a produção de ROS.

Em suma, estes resultados mostram que é possível manter culturas primárias de células de *cumulus oophorus* por períodos de tempo até duas semanas, sem que se altere de forma notável a expressão de enzimas antioxidantes CuZnSOD e MnSOD. Eles mostram ainda que há variações na actividade ou do teor destas enzimas em relação com a idade das pacientes (um dos factores determinantes da

fecundabilidade ovocitária) e com entidades clínicas associadas ao insucesso da PMA. Uma caracterização mais fina, com um número de casos maior e em confronto com os resultados das técnicas de PMA, contribuirá para confirmar a sua utilidade na predição do sucesso da PMA.

CONCLUSÕES

- É possível cultivar as células de *cumulus oophorus* colhidas de cada paciente por um período razoável de tempo, mantendo-as metabolicamente activas, enquanto exibem propriedades observadas *in situ*.
- A cultura de células de *cumulus oophorus* humanas torna possível a avaliação de potenciais marcadores moleculares de qualidade ovocitária de modo a tentar prever o sucesso das técnicas de PMA.
- O estudo da actividade da SOD é realizável nas células de *cumulus oophorus* humanas e há evidência de diminuição da sua actividade com o envelhecimento reprodutivo, facto que realça a importância da intervenção das ROS na reprodução.
- A actividade da SOD total encontra-se aumentada nas células de *cumulus oophorus* de pacientes com endometriose ou disfunção ovulatória, aumento explicado pelo aumento dos níveis da isoforma citoplasmática CuZnSOD.
- A actividade da SOD total nas células do *cumulus oophorus* provenientes das pacientes com infertilidade tubária é significativamente menor que a encontrada nas células de pacientes controlo, sugerindo a existência de uma menor protecção do ovócito contra o stress oxidativo quando existe disfunção tubária.
- As células de *cumulus oophorus* de pacientes com infertilidade inexplicada expressam níveis significativamente mais elevados da isoforma mitocondrial MnSOD comparativamente com as células das pacientes controlo.
- O conjunto dos dados obtidos mostra que estas enzimas moduladoras do stress oxidativo no *cumulus oophorus* humano devem ser consideradas marcadores biológicos potenciais, preditivos do sucesso em PMA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwal A. e Saleh R.A., (2002), Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment., *The Urologic Clinics of North America*, 29, 817-827
- Agarwal A., Saleh R.A., Bedaiwy M.A., (2003) Role of reactive oxygen species in pathophysiology of human reproduction, *Fertility and Sterility*, 79, 829-843
- Agarwal A., Allamaneni S.S., (2004), Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction., *Reproductive BioMedicine Online*, 9, 338-347
- Agarwal A., Gupta S. e Sharma R.K., (2005a), Role of oxidative stress in female reproduction., *Reproductive Biology and Endocrinology*, 14, 3-28
- Agarwal A., Gupta S. e Sharma R.K., (2005b), Oxidative stress and its implications in female infertility – a clinician's perspective., *Reproductive Biomedicine Online*, 11, 641-650
- Agarwal A., Guota S. e Sikka S., (2006), The role of free radicals and antioxidants in reproduction., *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 18, 325-332
- Agarwal A., Gupta S., Sekhon L., Shah R., (2008), Redox Considerations in Female Reproductive Function and Assisted Reproduction: From Molecular Mechanisms to Health Implications, *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(8), 1375-403
- American Society for Reproductive Medicine Practice Comittee, (2006), Guidelines on number of embryos transferred., *Fertility and Sterility*, 86(Suppl 4), S51-S52
- Angeluci S., Ciavardellet D., Di Giuseppe F., Eleuterio E., Sulpizio M., Tiboni G.M., Giampietro F., Palumbo P., Di Ilio C., (2006), Proteome analysis of human follicular fluid., *Biochimica et Biophysica Acta*, 1764, 1775–1785
- Armour K.L. e Callister L.C., (2005), Prevention of triplets and higher order multiples. Trends in reproductive medicine, *Journal of Perinatal and Neonatal Nursing*, 19(2), 103–111
- Attaran M., Pasqualotto E., Falcone T., Goldberg J.M., Miller K.F., Agarwal A., Sharma R.K., (2000), The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of in vitro fertilization., *International Journal of Fertility and Womens Medicine*, 45, 314-320
- Bakhtiari M., Sobhani A., Akbari M., Pasbakhsh P., Abbasi M., Hedayatpoor A., Amidi F., Sargolzaei F., (2007), The effect of hyaluronic acid on motility, vitality and fertilization capability of mouse sperms after cryopreservation, *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 5(2), 45-50

- Baltes P., Sánchez R., Peña P., Villegas J., Turley H., Miska W., (1998), Evidence for the synthesis and secretion of a CBG-like serpin by human cumulus oophorus and fallopian tubes., *Andrologia*, 30(4-5), 249-253
- Bedaiwy M.A., Falcone T., Sharma R.K., Goldberg J.M., Attaran M., Nelson D.R., Agarwal A., (2002a), Prediction of endometriosis with serum and peritoneal fluid markers: a prospective controlled trial., *Human Reproduction*, 17(2), 426-431
- Bedaiwy M.A., Goldberg J.M., Falcone T., Singh M., Nelson D., Azab H., Wang X., Sharma R., (2002b), Relationship between oxidative stress and embryotoxicity of hydrosalpingeal fluid., *Human Reproduction*, 17(3), 601-604
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding., *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254
- Brännström M., Mayrhofer G., Robertson S.A., (1993), Localization of Leucocyte Subsets in the Rat Ovary during the Periovulatory Period., *Biology of Reproduction*, 48, 277-286
- Braude P. e Rowell P., (2003), Assisted conception.II – In *vitro* fertilisation and intracytoplasmic sperm injection., *British Medical Journal*, 327, 852-855
- Carbone M.C., Tatone C., Delle Monache S., Marci R., Caserta D., Colonna R., Amicarelli F., (2003), Antioxidant enzymatic defences in human follicular fluid: characterization and age-dependent changes., *Molecular Human Reproduction*, 9(11), 639-643
- Channing C.P., Bae I.H., Stone S.L., Anderson L.D., Edelson S., Fowler S.C., (1981), Porcine granulosa and cumulus cell properties. LH/hCG receptors, ability to secrete progesterone and ability to respond to LH., *Molecular and cellular endocrinology*, 22(3), 359-370
- Chian R-C., Ao A., Clarke H.J., Tulandi T., Tan S-L., (1999), Production of steroids from human cumulus cells treated with different concentrations of gonadotropins during culture *in vitro*., *Fertility and Sterility*, 71(1), 61-66
- Cleveland D.W., Fischer S.G., Kirschner M.W., Laemmli U.K.,(1977), Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis., *J Biol Chem* 252(3), 1102-1106
- Combelles C.M.H., Fissore R.A., Albertini D.F., Racowsky C., (2005), *In vitro* maturation of human oocytes and cumulus cells using a co-culture three-dimensional collagen gel system., *Human Reproduction*, 20(5), 1349–1358

- Cortvrindt R. e Smitz J., (2001), *In vitro* follicle growth: achievements in mammalian species, *Reproduction in Domestic Animals*, 36, 3-9
- Craig J., Orisaka M., Wang H., Orisaka S., Thompson W., Zhu C., Kotsuji F., Tsang B.K., (2007), Gonadotropin and intra-ovarian signals regulating follicle development and atresia: the delicate balance between life and death., *Frontiers in Bioscience*, 12, 3628-3639
- Crapo J.D., Oury T., Raboville C., Slot J.W., Chang L.Y., (1992), Copper, zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 10405-10409
- Das S., Chattopadhyay R., Ghosh S., Ghosh S., Goswami S.K., Chakravarty B.N., Chaudhury K., (2006), Reactive oxygen species level in follicular fluid – embryo quality marker in IVF?, *Human Reproduction*, 21(9), 2403-2407
- De Hondt A., Meuleman C., Tomassetti C., Peeraer K., D'Hooghe T. M., (2006), Endometriosis and assisted reproduction: the role for reproductive surgery?, *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 18, 374–379
- Dhar A., Dockery P., O W.S., Turner K., Lenton E.A., Cooke I.D., (1996), The human ovarian granulosa cell: a stereological approach., *Journal of Anatomy*, 188, 671-676
- DiLuigi A., Weitzman V.N., Pace M.C., Siano L.J., Maier D., Mehlmann L.M., (2008), Meiotic Arrest in Human Oocytes is Maintained by a Gs Signaling Pathway., *Biology of Reproduction*., 78(4), 667-72
- Driancourt M-A., Reynaud K., Cortvrindt R., Smitz J., (2000), Roles of KIT and KIT LIGAND in ovarian function, *Reviews of Reproduction*, 5, 143-152
- Eppig J.J., (1980), Regulation of Cumulus Oophorus Expansion by Gonadotropins in vivo and in vitro., *Biology of Reproduction*, 23, 545-552
- Espey L.L., (1980), Ovulation as an Inflammatory Reaction – A Hypothesis., *Biology of Reproduction*, 22, 73-106
- Faddy M.J., Gosden R.G., Gougeon A., Richardson S.J., Nelson J.F., (1992), Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause., *Human Reproduction*, 7(10), 1342-1346
- Fatehi A.N., Roelen B.A., Colenbrander B., Schoevers E.J., Gadella B.M., Beverst M.M., Van den Hurk R., (2005), Presence of cumulus cells during in vitro fertilization protects the bovine oocyte against oxidative stress and improves first cleavage but does not affect further development., *Zygote*, 13(2), 177-85

- Fatehi A.N., Zeinstra E.C., Kooij R.V., Colenbrander B., Bevers M.M., (2002), Effect of cumulus cell removal of in vitro matured bovine oocytes prior to in vitro fertilization on subsequent cleavage rate., *Theriogenology*, 57(4), 1347-1355
- Fujii J., Iuchi Y., Okada F., (2005), Fundamental role of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system., *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3, 43-52
- Gittens J.E.I., Barr K.J., Vanderhyden B.C., Kidder G.M., (2005), Interplay between paracrine signaling and gap junctional communication in ovarian follicles., *Journal of Cell Science*, 118, 113-122
- Guérin P., El Mouatassim S., Ménéz Y., (2001), Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings., *Human Reproduction Update*, 7(2), 175-89
- Halliwell B. e Gutteridge J.M.C., (2007), *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, 4th edition, Oxford
- Ho H.N., Wu M.Y., Chen S.U., Chao K.H., Chen C.D., Yang Y.S., (1997), Total antioxidant status and nitric oxide do not increase in peritoneal fluids from women with endometriosis., *Human Reproduction*, 12(12), 2810-2815
- Hutt K.J., McLaughlin E.A. e Holland M.K., (2006), Kit ligand and c-Kit have diverse roles during mammalian oogenesis and folliculogenesis., *Molecular Human Reproduction*, 12(2), 61-69
- Itagaki Y. e Toyoda Y., (1991), Factors affecting fertilization in vitro of mouse eggs after removal of cumulus oophorus. *Journal of Mammalian Ova Research*, 8, 126–34
- Jancar N., Kopitar A.N., Ihan A., Klun I.V., Bokal E.V., (2007), Effect of apoptosis and reactive oxygen species production in human granulosa cells on oocyte fertilization and blastocyst development., *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 24, 91–97
- Jackson L.W., Schisterman E.F., Dey-Rao R., Browne R., Armstrong D., (2005), Oxidative stress and endometriosis., *Human Reproduction*, 20(7), 2014-2020
- Jose-Miller A.B., J.W. Boyden e Frey K.A., (2007), Infertility., *American Family Physician*, 75(6), 849-856
- Jozwik M., Wolczynski S., Jozwik M., Szamatowicz M., (1999), Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans., *Molecular Human Reproduction*, 5, 409-413

- Kezele P., Nilsson E.E., Skinner M.K., (2005), Keratinocyte Growth Factor Acts as a Mesenchymal Factor That Promotes Ovarian Primordial to Primary Follicle Transition., *Biology of Reproduction*, 73, 967-973
- Khamsi F. e Roberge S., (2001), Granulosa cells of the cumulus oophorus are different from mural granulosa cells in their response to gonadotrophins and IGF-I., *Journal of Endocrinology*, 170, 565-573
- Kikuchi K., Nagai T., Motlik J., Shioya Y., Izaike Y., (1993), Effect of follicle cells on in vitro fertilization of pig follicular oocytes., *Theriogenology*, 39(3), 593-599
- Kimura N., Totsukawa K., Sato E., (2006), Significance of mammalian cumulus-oocyte complex matrix in oocyte meiotic maturation: Review of the synthetic control and possible roles of hyaluronan (HA) and HA-binding protein, *Journal of Mammalian Ova Research*, 23, 36-51
- Laloraya M., Pradeep K.G., Laloraya M.M., (1988), Changes in the levels of superoxide anion radical and superoxide dismutase during the estrous cycle of *rattus norvegicus* and induction of superoxide dismutase in rat ovary by lutropin., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 157, 146-153
- Laloraya M., Kumar G.P., Laloraya M.M., (1989), Histochemical study of superoxide dismutase in the ovary of the rat during the oestrous cycle., *Journal of Reproduction and Fertility*, 86(2), 583-587
- Langendonckt A.V., Casanas-Roux F., Donnez J., (2002), Oxidative stress and peritoneal endometriosis., *Fertility and Sterility*, 77(5), 861-870
- Lee K.S., Joo B.S., Na Y.J., Yoon M.S., Choi O.H., Kim W.W., (2001), Cumulus cells apoptosis as an indicator to predict the quality of oocytes and the outcome of IVF-ET., *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 18(9), 490-498
- Leung P.C. K. e Adashi E.Y., (2004), *The ovary.*, Elsevier Academic Press, 2nd Edition, USA
- Marklund S.L., (1984), Extracellular Superoxide Dismutase in Human Tissues and Human Cell Lines., *The Journal of Clinical Investigation*, 74(4), 1398-1403
- McCord J.M., Fridovich I., (1969), Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein), *J. Biol. Chem.*, 244, 6049-6055
- McKenzie L.J., Pangas S.A., Carson S.A., Kovanci E., Cisneros P., Buster J.E., Amato P., Matzuk M.M., (2004), Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF, *Human Reproduction*, 19(12), 2869-2874

- Mehlmann L.M., (2005), Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation., *Reproduction*, 130(6), 791-799
- Mingoti G.Z., Garcia J.M., Rosa-e-Silva A.A.M., (2002), Steroidogenesis in cumulus cells of bovine cumulus–oocyte-complexes matured in vitro with BSA and different concentrations of steroids., *Animal Reproduction Science*, 69, 175-186
- Motta P.M., Nottolax S.A., Pereda J., Croxatto H.B., Familiari G., (1995), Ultrastructure of human cumulus oophorus: a transmission electron microscopic study on oviductal oocytes and fertilized eggs., *Human Reproduction*, 10(9), 2361-2367
- Munné S., Lee A., Rosenwaks Z., Grifo J., Cohen J., (1993), Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos, *Human Reproduction*, 8(12), 2185-2191
- Nandi S., Chauhan M.S. e Palta P., (1998), Influence of cumulus cells and sperm concentration on cleavage rate and subsequent embryonic development of buffalo oocytes matured and fertilized in vitro., *Theriogenology*, 50(8), 1251-1262
- Nilsson E.E. e Skinner M.K., (2004), Kit ligand and basic fibroblast growth factor interactions in the induction of ovarian primordial to primary follicle transition., *Molecular and Cellular Endocrinology*, 214, 19–25
- Ota H., Igarashi S., Hatazawa J., Tanaka T., (1999), Immunohistochemical assessment of superoxide dismutase expression in the endometrium in endometriosis and adenomyosis., *Fertility and Sterility*, 72(1), 129-134
- Oyawoye O., Abdel Gadir A., Garner A., Constantinovici N., Perret C., Hardiman P., (2003), Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF: relationship to outcome., *Human Reproduction*, 18(11), 2270-2274
- Pasqualotto E.B., Agarwal A., Sharma R.K., Izzo V.M., Pinotti J.A., Joshi N.J., Rose B.I., (2004), Effect of oxidative stress in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive procedures., *Fertility and Sterility*, 81, 973-976
- Paszkowski T., Traub A.I., Robinson S.Y., McMaster D., (1995), Selenium dependent glutathione peroxidase activity in human follicular fluid., *Clinica Chimica Acta*, 236, 173-180
- Polak G., Koziół-Montewka M., Gogacz M., Błaszowska I., Kotarski J., (2001), Total antioxidant status of peritoneal fluid in infertile women., *European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology*, 94(2), 261-263

- Portz D.M., Elkins T.E., White R., Warren J., Adadevoh S., Randolph J., (1991), Oxygen free radicals and pelvic adhesion formation: I. Blocking oxygen free radical toxicity to prevent adhesion formation in an endometriosis model., *International Journal of Infertility*, 36(1), 39-42
- Quinn M.C., McGregor S.B., Stanton J.L., Hessian P.A., Gillett W.R., Green D.P., (2006), Purification of granulosa cells from human ovarian follicular fluid using granulosa cell aggregates., *Reproduction, fertility, and development*, 18(5), 501-508
- Rhodin J.A.G., (1971), The ultrastructure of the adrenal cortex of the rat under normal and experimental conditions. *Journal of Ultrastructure Research*, 34, 23-71
- Roberts A.J. e Echternkamp S.E., (1994), In Vitro Production of Estradiol by Bovine Granulosa Cells: Evaluation of Culture Condition, Stage of Follicular Development, and Location of Cells Within Follicles., *Biology of Reproduction*, 51, 273-282
- Sabatini L., Wilson C., Lower A., Al-Shawaf T., Grudzinskas J.G., (1999), Superoxide dismutase activity in human follicular fluid after controlled ovarian hyperstimulation in women undergoing in vitro fertilization., *Fertility and Sterility*, 72, 1027-1034
- Saito H., Seino T., Kaneko T., Nakahara K., Toya M., Kurachi H., (2002), Endometriosis and Oocyte Quality, *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 53(Suppl 1), 46-51
- Schoenfelder M., Schams D., Einspanier R., (2003), Steroidogenesis during in vitro maturation of bovine cumulus oocyte complexes and possible effects of tri-butyltin on granulosa cells., *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 84, 291-300
- Seino T., Saito H., Kaneko T., Takahashi T., Kawachiya S., Kurachi H., (2002), Eight-hydroxy-2-deoxyguanosine in granulosa cells is correlated with the quality of oocytes and embryos in an in vitro fertilization–embryo transfer program., *Fertility and Sterility*, 77(6), 1184-1190
- Seli E., Berkkanoglu M., Arici A., (2003), Pathogenesis of endometriosis., *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, 30(1), 41-61.
- Shanti A., Santanam N., Morales A.J., Parthasarathy S., Murphy A.A., (1999), Autoantibodies to markers of oxidative stress are elevated in women with endometriosis., *Fertility and Sterility*, 71(6), 1115-1118
- Sharpe-Timms K.L., (2001), Endometrial anomalies in women with endometriosis., *Annals of the New York Academy of Sciences*, 943, 131-147
- Sherizly P.E., (1980), Progesterone secretion by the post-ovulatory rat cumulus oophorus., *Gamete Research*, 3, 115–119

- Shiotani M., Noda Y., Narimoto K., Imai K., Mori T., Fujimoto K., Ogawa K., (1991), Immunohistochemical localization of superoxide dismutase in the human ovary., *Human Reproduction*, 6(10), 1349-1353
- Simon A.M., Goodenough D.A., Li E., Paul D.L., (1997), Female infertility in mice lacking connexin 37., *Nature*, 385, 525-529
- Sirotkin A.V., Dukesová J., Pivko J., Makarevich A.V., Kúbek A., (2002), Effect of growth factors on proliferation, apoptosis and protein kinase A expression in cultured porcine cumulus oophorus cells., *Reproduction, nutrition, development*, 42(1), 35-43
- Skinner M.K., (2005), Regulation of primordial follicle assembly and development, *Human Reproduction Update*, 11(5), 461–471
- Slot J.W., Geuze H.J., Freeman B.A., Crapo J.D., (1986), Intracellular localization of the copper-zinc and manganese superoxide dismutases in rat liver parenchymal cells, *Laboratory Investigation*, 55, 363-371
- Spitz D.R. e Oberley L.W., (1989), An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates., *Analytical Biochemistry*, 179(1), 8-18.
- Staigmiller R.B., Moor R.M., (1984), Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside the follicle. *Gamete Research*, 9(2), 221-229
- Strauss III J.F. e Barbieri R.L., (2004), *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology: physiology, pathophysiology, and clinical management.*, Elsevier Saunders, 5th Edition, USA
- Sugino N., Shimamura K., Takiguchi S., Tamura H., Ono M., Nakata M., Nakamura Y., Ogino K., Uda T., Kato H., (1996), *Human Reproduction*, 11(5), 1073-1078
- Suzuki H., Jeong B.S., Yang X., (2000), Dynamic changes of cumulus-oocyte cell communication during in vitro maturation of porcine oocytes., *Biology of Reproduction*, 63, 723-729
- Suzuki T., Sugino N., Fukaya T., Sugiyama S., Uda T., Takaya R., Yajima A., Sasano H., (1999), Superoxide dismutase in normal cycling human ovaries: immunohistochemical localization and characterization., *Fertility and Sterility*, 72(4), 720-726
- Szczepanska M., Koźlik J., Skrzypczak J., Mikołajczyk M., (2003), Oxidative stress may be a piece in the endometriosis puzzle., *Fertility and Sterility*, 79(6), 1288-1293

- Tamate K., Sengoku K., Ishikawa M., (1995), The role of superoxide dismutase in the human ovary and fallopian tube., *Journal of obstetrics and gynaecology* (Tokyo, Japan), 21(4), 401-409
- Tanghe S., Van Soom A., Nauwynck H., Coryn M., Kruif A., (2002), Minireview: Functions of the *cumulus oophorus* during oocyte maturation, ovulation and fertilization, *Molecular Reproduction and Development*, 61, 414-424
- Tatemoto H., Sakurai N., Muto N., (2000), Protection of Porcine Oocytes Against Apoptotic Cell Death Caused by Oxidative Stress During In Vitro Maturation: Role of Cumulus Cells, *Biology of Reproduction*, 63, 805-810
- Tatemoto H., Muto N., Sunagawa I., Shinjo A., Nakada T., (2004), Protection of porcine oocytes against cell damage caused by oxidative stress during in vitro maturation: role of superoxide dismutase activity in porcine follicular fluid., *Biology of Reproduction*, 71, 1150-1157
- Tatone C., Carbone M.C., Falone S., Aimola P., Giardinelli A., Caserta D., Marci R., Pandolfi A., Ragnelli A.M., Amicarelli F., (2006), Age-dependent changes in the expression of superoxide dismutases and catalase are associated with ultrastructural modifications in human granulosa cells., *Molecular Human Reproduction*, 12(11), 655–660
- Teng C.C., Yang H.M., Chen K.F., Yang C.J., Chen L.S., Kuo C.L., (2008) Abdominal wall endometriosis: an overlooked but possibly preventable complication., *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology*, 47(1), 42-48
- Tremellen K., (2008), Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective., *Human Reproduction Update*, 14(3), 243-58
- Ulukus M., Cakmak H., Arici A., (2006), The role of endometrium in endometriosis., *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 13(7), 467-476
- Van Royen E., Mangelschots K., De Neubourg D., Laureys I., Ryckaert G., Gerris J., (2001), Calculating the implantation potential of day 3 embryos in women younger than 38 years of age : a new model, *Human Reproduction*, 16(2), 326-332
- Vanderhyden B.C. e Armstrong D.T., (1989), Role of cumulus cells and serum on the in vitro maturation, fertilization, and subsequent development of rat oocytes, *Biology of Reproduction*, 40, 720-728
- Wang Y., Sharma R.K., Falcone T., Goldberg J., Agarwal A., (1997), Importance of reactive oxygen species in the peritoneal fluid of women with endometriosis or idiopathic infertility., *Fertility and Sterility*, 68(5), 826-30

- Weisiger R.A., Fridovich I., (1973), Mitochondrial superoxide dismutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization, *The Journal of biological chemistry*, 248, 4793-4796
- Wu M-H., Shoji Y., Chuang P-C., Tsai S-J., (2007), Endometriosis: disease pathophysiology and the role of prostaglandins, *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 9(2), 1-20
- Zhang L., Jiang S., Wozniak P.J., Yang X., Godke R.A., (1995), Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization and embryo development in vitro., *Molecular Reproduction and Development*, 40(3), 338-344

COMUNICAÇÕES ASSOCIADAS AO PRESENTE TRABALHO

Matos, L., Stevenson, D.; Gomes F.; Silva-Carvalho, J.L., Almeida, H. (2007) **Dismutase do Superóxido Manganês em células do *cumulus oophorus* humanas.** 3º Congresso Nacional da Sociedade Portuguesa de Medicina da Reprodução. Porto, Maio, Livro de Resumos, p28.

Matos, L., Stevenson, D.; Gomes F.; Silva-Carvalho, J.L., Almeida, H. (2007) **Assessing Manganese Superoxide Dismutase in cultured human *cumulus oophorus* cells.** Human Reproduction, 22: i200.
(23rd Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology, Lyon, France, 2007).

L. Matos, D. Stevenson, F. Gomes, J. Carvalho, H. Almeida. (2007) **Human *cumulus oophorus* primary culture and superoxide dismutase detection.** Proceedings of the International Conference on Microscopy and Microanalysis & XLII Congress of the Portuguese Microscopy Society, Coimbra, 2-7 December, Abstract Book, pp. 62.

Matos L., Stevenson D., Gomes F., Silva-Carvalho J.L., Almeida H., (2007), **Superoxide Dismutase Detection in Human *Cumulus Oophorus* Cells.**, Microscopy and Microanalysis Online, (*aceite para publicação*)

Matos L., Stevenson D., Gomes F., Silva-Carvalho J.L., Almeida H., **Superoxide Dismutase Expression in Human *Cumulus Oophorus* Cells.** (*em preparação*)