UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

DAIANA CRISTINA CHIELLI PEDROSO

**Comprimento do telômero e atividade da telomerase em células do
cumulus de mulheres com Síndrome dos Ovários Policísticos**

RIBEIRÃO PRETO

2018

DAIANA CRISTINA CHIELLI PEDROSO

**Comprimento do telômero e atividade da telomerase em células do
cumulus de mulheres com Síndrome dos Ovários Policísticos**

Tese apresentada ao Departamento de Ginecologia e
Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
para obtenção do Título de Doutor em Ciências Médicas.

Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Doutora Rosana Maria dos Reis
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Cristina Libardi Miranda Furtado

RIBEIRÃO PRETO

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa, desde que seja citada a fonte.

Pedroso, Daiana Cristina Chielli

Comprimento do telômero e atividade da telomerase em células do *cumulus* de mulheres com Síndrome dos Ovários Policísticos./Daiana Cristina Chielli Pedroso; Ribeirão Preto, 2018

97p. il.; 30cm

Tese para título de Doutor apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Rosana Maria dos Reis

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Cristiana Libardi Miranda Furtado

Telomere length and telomerase activity in cumulus cells of women with Polycystic Ovarian Syndrome.

1 - Polycystic ovarian syndrome; 2 - Telomere length,
3 - Telomerase activity, 4 - Cumulus cells, 5 - Oocytes, 6 - Leukocytes.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Daiana Cristina Chielli Pedroso

Comprimento do telômero e atividade da telomerase em células do *cumulus* de mulheres com Síndrome dos Ovários Policísticos

Tese apresentada ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutor em Ciências Médicas.

Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia

Aprovada em:

Banca examinadora

Profª. Dra. Rosana Maria dos Reis

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho primeiramente à Deus, pois através da minha fé consegui ultrapassar diversas barreiras e Ele esteve sempre ao meu lado.

Aos meus pais queridos, Vera e Wilson, por sempre mostrarem através de muito amor e dedicação o melhor caminho a ser seguido sempre.

Às minhas irmãs Keli e Tatiana que sempre me incentivaram e me apoiaram em todos os momentos.

Às minhas sobrinhas Luana e Letícia, que através de momentos especiais e de muita alegria fizeram com que eu me tornasse uma pessoa melhor.

Ao Chico, meu companheirinho de quatro patas que esteve presente desde o início deste doutorado e me acompanhou nos momentos mais difíceis, me proporcionando momentos de muita parceria, amor e lealdade.

Agradecimentos

À minha orientadora e amiga Rosana Maria dos Reis, que além de ser uma excelente profissional, é uma pessoa única, um exemplo a ser seguido, no qual me inspirei desde o primeiro momento que a vi. Durante toda a minha jornada na pós-graduação me incentivou e favoreceu cada vez mais o meu crescimento profissional e pessoal. Me orgulho muito por fazer parte da sua equipe e levarei esse aprendizado para sempre em minha vida.

À minha amiga e co-orientadora Cristiana Libardi Miranda Furtado, que desde o primeiro momento nos simpatizamos e nos tornamos muito amigas. Trabalharmos juntas me fez crescer profissionalmente, me fez acreditar que posso ir além. Construímos uma amizade linda que cresce a cada dia. Obrigada por todo aprendizado e por ser tão presente em minha vida.

À banca examinadora, pela disponibilidade em participar deste momento tão importante da minha vida.

À todas as voluntárias participantes deste estudo, pois cada uma delas foi imprescindível para concluir este trabalho.

Ao Tarcísio Teles de Azevedo por proporcionar momentos especiais e de muito companheirismo. Obrigada por todo amor, carinho e parceria.

À toda equipe do laboratório de Reprodução Humana do HC-FMRP-USP, especialmente para Marisa Oliva Blanco, Marilda Hatsumi Yamada Dantas, Cristina Carolina Padovan, Lourdes Adriana de Souza Andrade, Fabiana Aparecida Fazio, Giselle Villela Prado, Maria Aparecida Carneiro Vasconcelos, Maria Auxiliadora Pádua Rosa, Maria Cristina Brentigani, Océlia de Vasconcelos pelo convívio e aprendizado.

Aos Docentes do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia desta faculdade, pelos ensinamentos e convívio.

Ao Prof. Dr. David Keefe por oferecer ajuda nos momentos de dúvidas. Sua participação foi fundamental para a finalização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Tocantins Calado pela parceria, ajuda nos momentos de interpretação dos resultados dos experimentos, por sempre oferecer suporte e ideias para a realização deste trabalho.

Às embriologistas Maria Cristina Picinato, Roberta Cristina Giorgenon, Camila Kokudai Balieiro Santos e Thalita Souza Berteli que ajudaram na coleta dos oócitos e ofereceram todo suporte que precisei.

À Flávia Sacilotto Donaires Ramos pelo ensinamento da técnica de análise da atividade da telomerase.

À Barbara Santana que esteve presente nos meus experimentos de análise do comprimento do telômero e me ofereceu todo suporte para concluir este estudo.

Ao Ricardo Pimentel pela disponibilidade em ajudar nos experimentos.

Às amigas Michele Gomes Da Broi, Daiane Bulgarelli Colateli, Bruna Zanato Barone, Viviane Santana, Telma Fabiana Pires, Valéria Gomes, Juliana Meola, Gislaine Satyko Kogure e Arislaine Nogueia, pelos momentos de felicidade, desabafo, companheirismo e que sempre me ajudaram com uma palavra de apoio quando mais precisei.

À Maria Albina Vallada Verceze e Tatiana Marina Vieira Giorgenon pelas dosagens dos hormônios.

À Suelen Soares Bezerra pela ajuda nos momentos burocráticos da pós-graduação.

À Ilza Alvez de Rezende Mazzonato e à Rosane Aparecida Cunha Casula pela ajuda nos momentos de dúvidas.

À Suleimy Cristina Mazin por toda análise estatística deste trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa de Doutorado.

Epígrafe

" O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis".

(José de Alencar)

RESUMO

PEDROSO, D.C.C. **Comprimento do telômero e atividade da telomerase em células do *cumulus* de mulheres com Síndrome dos Ovários Policísticos.** Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

A Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) representa um dos distúrbios endócrinos reprodutivos mais comuns em mulheres em idade reprodutiva. As mulheres com SOP normalmente respondem bem ao tratamento de reprodução assistida (TRAs), mas frequentemente apresentam oócitos de baixa qualidade e capacidade reprodutiva, a qual está correlacionado com a interação do oócito com as células do *cumulus*. A baixa qualidade oocitária pode estar relacionada a perda de estabilidade genômica do oócito, ou até mesmo das células do *cumulus*, o que pode levar a uma redução gradativa da fertilidade feminina. Os telômeros e a atividade da telomerase possuem um papel fundamental na manutenção da estabilidade genômica e são considerados importantes marcadores de viabilidade celular, podendo ser um indicativo da qualidade oocitária. O objetivo do estudo foi avaliar o comprimento do telômero e atividade da telomerase nas células do *cumulus* de mulheres com SOP. Neste estudo prospectivo caso-controle foram incluídas 110 voluntárias, sendo 43 mulheres com SOP e 67 controles no período de Setembro de 2015 a Junho de 2017. Foram avaliados os dados como idade, Índice de massa corporal (IMC), hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo estimulante (FSH), globulina de ligação de hormônios sexuais (SHBG), prolactina, estradiol, insulina, testosterona total, androstenediona, índice de androgênio livre (FAI), homocisteína e proteína c-reativa. Foi avaliado o comprimento do telômero nas células do *cumulus* de oócitos imaturos (CCI), nas células do *cumulus* de oócitos maduros (CCM), nos oócitos imaturos no estágio de vesícula germinativa (VG), nos oócitos imaturos em metáfase I (MI) e nos leucócitos pelo método quantitativo da reação em cadeia da polimerase (qPCR). A atividade da telomerase das CCI, CCM, dos oócitos VG e MI foram avaliadas pelo Kit TRAPeze® XL. A análise estatística foi determinada pelo teste Mann-Whitney, regressão linear múltipla e correlação de Spearman. Os resultados foram que as variáveis IMC ($p=0,001$), LH ($p=0,015$), estradiol ($p=0,004$), insulina ($p=0,002$), testosterona ($p<0,0001$), androstenediona ($p=0,001$), FAI ($p<0,0001$) e proteína c-reativa ($p=0,003$) foram maiores no grupo SOP. FSH ($p=0,0002$) foi menor no grupo SOP. A prolactina e a homocisteína não diferiram entre os grupos. O comprimento do telômero nas CCI não diferiu entre os grupos SOP e controle ($1,60\pm0,56$ vs $1,58\pm0,33$; $p=0,649$, respectivamente), bem como o comprimento do telômero nas CCM não diferiu entre os grupos SOP e controle ($1,61\pm0,47$ vs $1,70\pm0,43$; $p=0,378$, respectivamente). Entretanto, nos leucócitos o comprimento do telômero foi menor no grupo SOP ($p=0,025$). A atividade da telomerase nas CCI foi maior no grupo SOP do que no grupo controle ($1,62\pm1,49$ vs $0,30\pm0,42$; $p=0,003$, respectivamente) e a atividade da telomerase nas CCM também foi maior no grupo SOP do que no grupo controle ($1,39\pm1,63$ vs $0,55\pm0,84$; $p=0,022$, respectivamente). O comprimento do telômero e a atividade da telomerase nos oócitos VG e MI não diferiu entre os grupos. Uma correlação positiva foi observada entre a atividade da telomerase e o comprimento do telômero nas CCI no grupo controle ($p=0,051$). O grupo SOP apresentou uma correlação positiva entre a atividade da telomerase e o comprimento do telômero, porém nas CCM ($p=0,048$). Foi observada uma correlação positiva do comprimento do telômero entre as células (leucócitos, CCI e CCM) em ambos os grupos. Os dados sugerem que a SOP parece não afetar o comprimento do telômero nas CCI e CCM, apenas nos leucócitos. Por outro lado, uma maior atividade da telomerase nas CCI e CCM pode ser necessária para a manutenção do comprimento telomérico à nível reprodutivo nas mulheres com SOP.

Palavras-chave: Síndrome dos ovários policísticos, Comprimento do telômero, Atividade da telomerase, Células do *cumulus*, Oócitos, Leucócitos

ABSTRACT

PEDROSO, D.C.C. **Telomere length and telomerase activity in cumulus cells of women with Polycystic Ovarian Syndrome.** Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Polycystic Ovarian Syndrome (PCOS) represents one of the most common reproductive endocrine disorders in women of reproductive age. Women with PCOS, despite responding well to Assisted Reproduction Treatments (ART), the oocytes usually have low quality and reproductive capacity, which is correlated to oocyte interaction with cumulus cells. The low oocyte quality may be related to loss of genomic stability of oocytes, or even cumulus cells, and may lead to a reduction of female fertility. The telomere length and telomerase activity play a fundamental role in maintaining genomic stability, which is considered an important molecular marker of cell viability, whose alterations are related to apoptosis and/or senescence, maybe also an indicative of oocyte quality. The aim of the study was to evaluate the telomere length and telomerase activity in cumulus cells of women with PCOS. In this prospective case-control study, 110 volunteers were included, 43 women with PCOS and 67 controls from September 2015 to June 2017. Data were evaluated as age, body mass index (BMI), luteinizing hormone (LH), follicle stimulating hormone (FSH), sex hormone binding globulin (SHBG), prolactin, estradiol, insulin, total testosterone, androstenedione, index of free androgen (FAI), homocysteine and c-reactive protein. Telomere length in cumulus cells from immature (ICC) and mature (MCC) oocytes, leukocytes and immature oocytes in the germinal vesicle stage (VG) and in metaphase I (MI) were evaluated by quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR). Telomerase activity of ICC, MCC, VG and IM oocytes were evaluated by TRAPeze® XL Kit. Statistical analyses were determined by the Mann-Whitney test, multiple linear regression and Spearman's correlation. The results were that the variables BMI ($p=.001$), LH ($p=.015$), estradiol ($p=.004$), insulin ($p=.002$), testosterone ($p<.0001$), androstenedione ($p=.001$), FAI ($p<.0001$) and c-reactive protein ($p=.003$) was increased in PCOS group. FSH ($p=.0002$) was smaller in PCOS group. Prolactin and homocysteine were not different between the groups. The telomeres length in ICC did not differ between PCOS and control groups (1.60 ± 0.56 vs 1.58 ± 0.33 ; $p=.649$, respectively). The telomeres length in MCC did not differ between PCOS and control groups (1.61 ± 0.47 vs 1.70 ± 0.43 ; $p=.378$, respectively). However, in leukocytes reduced telomeres were observed in the PCOS ($p=.025$), respectively. The telomerase activity in ICC was higher in the PCOS group than in the control group (1.62 ± 1.49 vs 0.30 ± 0.42 ; $p=.003$, respectively) and the telomerase activity in MCC was higher in the PCOS group than in the control group (1.39 ± 1.63 vs 0.55 ± 0.84 ; $p=.022$, respectively). The telomere length and telomerase activity in VG and MI oocytes did not differ between groups. A positive correlation between telomerase activity and telomere length in the ICC was observed in control group ($p=.051$). PCOS also presented a positive correlation between telomerase activity and telomere length in MCC ($p=.048$). Telomere length of leukocytes, ICC and MCC were a positive correlated in both groups. The data suggest that PCOS does not appear to affect telomere length in ICC and MCC, only in leukocytes. On the other hand, a greater activity of telomerase in CCI and CCM may be necessary for the maintenance of telomere length at the reproductive level in women with PCOS.

Keywords: Polycystic ovarian syndrome; Telomere length, Telomerase activity, Cumulus cells, Oocytes, Leukocytes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma do estudo.....	38
Figura 2: Gráfico <i>Box Plot</i> do comprimento do telômero nas CCI e nas CCM em relação aos grupos SOP e controle.....	43
Figura 3: Gráfico <i>Box Plot</i> do comprimento do telômero nos oócitos VG e MI em relação aos grupos SOP e controle.....	44
Figura 4: Gráfico <i>Box Plot</i> do comprimento do telômero nas leucócitos em relação aos grupos SOP e controle.	44
Figura 5: Gráfico <i>Box Plot</i> da atividade da telomerase nas CCI e nas CCM em relação aos grupos SOP e controle.	45
Figura 6: Gráfico <i>Box Plot</i> da atividade da telomerase nos oócitos VG e MI em relação aos grupos SOP e controle.....	46
Figura 7: <i>Box Plot</i> dos embriões 4G1 e 8G1 em relação aos grupos SOP e controle.....	52
Figura 8: Gráfico <i>Box Plot</i> dos blastocistos 3.1.1. e 4.1.1. em relação aos grupos SOP e controle.....	53
Figura 9: Gráfico de dispersão do comprimento do telômero nos leucócitos em relação com a idade nos grupos SOP e controle.	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados antropométricos e bioquímicos das mulheres do grupo controle e SOP.....	40
Tabela 2: Distribuição das frequências das causas de infertilidade entre os grupos controle e SOP.....	41
Tabela 3: Distribuição das frequências de outras comorbidades entre os grupos controle e SOP.....	42
Tabela 4: Distribuição das frequências em relação à resposta esperada da HOC nas mulheres controle e SOP.	42
Tabela 5: Comprimento dos telômeros nos leucócitos, nas células do <i>cumulus</i> e nos oócitos imaturos das mulheres do grupo controle e SOP.....	43
Tabela 6: Atividade da telomerase nas células do <i>cumulus</i> e nos oócitos imaturos das mulheres do grupo controle e SOP.....	45
Tabela 7: Dados sobre CFA, folículos ≥ 14 mm, oócitos coletados, injetados, fertilizados e clivados das mulheres do grupo controle e SOP.	47
Tabela 8: Captação de oócitos após HOC nas mulheres dos grupos controle e SOP.	47
Tabela 9: Características morfológicas oocitárias das mulheres do grupo controle e SOP.	48
Tabela 10: Características do desenvolvimento embrionário no dia 1 das mulheres do grupo controle e SOP.....	49
Tabela 11: Características do estágio de desenvolvimento embrionário no dia 2 das mulheres do grupo controle e SOP.....	50
Tabela 12: Características do estágio de desenvolvimento embrionário no dia 3 das mulheres do grupo controle e SOP.....	51
Tabela 13: Características do estágio de desenvolvimento embrionário no dia 5/6 das mulheres do grupo controle e SOP.....	52
Tabela 14: Distribuição das frequências de transferências de embriões considerando um ciclo de TEF e um ciclo de TEC entre os grupos controle e SOP.....	53
Tabela 15: Distribuição das frequências das taxas de gravidez por TEF entre os grupos controle e SOP.....	54
Tabela 16: Distribuição das frequências das taxas de gravidez por TEC entre os grupos controle e SOP.....	54
Tabela 17: Distribuição das frequências das taxas de gravidez, considerando um ciclo de TEF e um ciclo de TEC, entre os grupos controle e SOP.	55
Tabela 18: Características dos nascidos vivos das mulheres do grupo controle e SOP.....	55

Tabela 19: Modelo de regressão linear múltipla ajustado para comprimento do telômero dos leucócitos.	56
Tabela 20: Modelo de regressão linear múltipla ajustado para o comprimento do telômero das CCI.	57
Tabela 21: Modelo de regressão linear múltipla ajustado para o comprimento do telômero das CCM.	57
Tabela 22: Modelo de regressão linear múltipla ajustado para o comprimento do telômero dos oócitos imaturos VG.	58
Tabela 23: Modelo de regressão linear múltipla ajustado para a atividade da telomerase das CCI.	58
Tabela 24: Modelo de regressão linear múltipla ajustado para a atividade da telomerase das CCM.	59
Tabela 25: Correlação do comprimento do telômero nos leucócitos.	59
Tabela 26: Correlação do comprimento do telômero das CCI.	60
Tabela 27: Correlação do comprimento do telômero das CCM.	60
Tabela 28: Correlação do comprimento do telômero nos oócitos imaturos VG.	61
Tabela 29: Correlação do comprimento do telômero nos oócitos imaturos MI.	61
Tabela 30: Correlação da atividade da telomerase nas CCI.	61
Tabela 31: Correlação da atividade da telomerase nas CCM.	62
Tabela 32: Correlação da atividade da telomerase nos oócitos imaturos VG.	62
Tabela 33: Correlação da atividade da telomerase nos oócitos imaturos MI.	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SOP:	Síndrome dos ovários policísticos
TRA:	Tratamento de reprodução assistida
SHO:	Síndrome de hiperestimulação ovariana
HOC:	Hiperestimulação ovariana controlada
Oócitos MII:	oócitos em metáfase II
RI:	Resistência insulínica
SHBG:	Globulina transportadora de hormônio sexual
DCV:	Doença cardiovascular
DM2:	diabetes mellitus tipo 2
EROs:	espécies reativas de oxigênio
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
TERT:	Transcriptase reversa
TERC:	Componente de RNA
RNA:	Ácido ribonucleico
COCs:	Complexos <i>cumulus</i> -oócitos
FSH:	Hormônio folículo estimulante
Oócitos VG:	Oócitos imaturos no estágio de vesícula germinativa
Q-FISH:	Fluorescência quantitativa de hibridação <i>in situ</i>
FMRP-USP:	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
FIV:	Fertilização <i>in vitro</i>
ICSI:	Injeção intracitoplasmática de espermatozoide
CAAE:	Certificado de apresentação para apreciação ética
ESCA:	Infertilidade sem causa aparente
ACO:	Anticoncepcional hormonal oral
GnRH:	Hormônio liberador de gonadotrofina
r-hCG:	Gonadotrofina coriônica recombinante

HTF:	Fluido tubáreo humano
PBS:	Tampão fosfato-salino
CCI:	Células do <i>cumulus</i> de oócitos imaturos
CCM:	Células do <i>cumulus</i> de oócitos maduros
Oócitos MI:	Oócitos em metáfase I
IMC:	Índice de massa corporal
LH:	Hormônio luteinizante
FAI:	Índice de androgênio livre
CFA:	Contagem de folículos antrais
Dia 1:	Dia 1 do desenvolvimento embrionário (checagem da fertilização)
Dia 5/6:	Dias 5 e 6 do desenvolvimento embrionário (Estágio de blastocisto)
Dia 2:	Dia 2 do desenvolvimento embrionário
4G1:	Embriões de 4 células grau 1
Dia 3:	Dia 3 do desenvolvimento embrionário
8G1:	Embriões de 8 células grau 1
3.1.1.:	Classificação de blastocisto expandido, com massa celular interna compactada e firmemente aderidas e trofoectoderma com muitas células formando epitélio coeso
4.1.1.:	Classificação de blastocisto em <i>hatched/hatching</i> , com massa celular interna compactada e firmemente aderidas e trofoectoderma com muitas células formando epitélio coeso
qPCR:	Método quantitativo da reação em cadeia da polimerase
Razão T/S:	Razão telômero/ <i>single gene</i>
SCT-qPCR:	<i>Single-Cell Telomere length measurement</i>
Razão T/R:	Razão telômero/ <i>Alu</i>
TRAP:	<i>Telomeric Repeat Amplification Protocol</i>
TRAPeze XL:	Protocolo de amplificação da repetição telomérica (Kit de detecção da telomerase)
CHAPS:	Tampão de lise

BCA:	Ensaio de ácido bicinconínico
TPG:	Produto total gerado
SAS:	Sistema de Análise estatística
TEF:	Transferência de embriões à fresco
TEC:	Transferência de embriões congelados
DESOV:	Descongelamento de oócitos
HAS:	Hipertensão arterial sistêmica
CP:	Corpúsculo Polar
ZP:	Zona Pelúcida
EP:	Espaço Perivitelino
D1:	Dia 1
PN:	Prónucleo
D2:	Dia 2
GF0:	Grau de fragmentação leve <10%
GF1:	Grau de fragmentação moderada 10-25%
GF2:	Grau de fragmentação grave >25%
D3:	Dia 3
3.2.1.:	Classificação de blastocisto expandido, com massa celular interna com algumas células vagamente agrupadas e trofoectoderma com muitas células formando epitélio coeso
3.2.2.:	Classificação de blastocisto expandido com massa celular interna com algumas células vagamente agrupadas e trofoectoderma com algumas células formando um epitélio solto
<i>TERRA:</i>	<i>Telomeric repeat-containing RNA</i>
PIG:	Recém-nascidas pequenas para a idade gestacional
AGA:	Adequado para idade gestacional

SUMÁRIO

1 Introdução	17
1.1 Síndrome dos Ovários Policísticos	18
1.2 Alterações metabólicas na SOP	19
1.3 Telômero e senescência celular	20
1.4 SOP, comprimento do telômero e atividade da telomerase.....	21
1.5 Comprimento do telômero e atividade da telomerase no complexo cumulus-oócito	22
1.6 Justificativa.....	24
 2 Objetivos.....	25
2.1 Objetivo primário	26
2.2 Objetivos Específicos	26
 3 Casuística, Material e Métodos	27
3.1 Casuística.....	28
3.2 Metodologia.....	28
3.2.1 Hiperestimulação Ovariana Controlada.....	28
3.2.2 Coleta das amostras e dosagens.....	29
3.2.3 Comprimento do telômero em células do cumulus e leucócitos	31
3.2.4 Comprimento do telômero nos oócitos.....	32
3.2.5 Atividade da telomerase em células do cumulus e oócitos	33
3.3 Análise estatística	35
 4 Resultados	36
 5 Discussão	64
 6 Conclusão	70
 Referências	72
 Anexos.....	85

1 Introdução

1.1 Síndrome dos Ovários Policísticos

A Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) representa um dos distúrbios endócrinos reprodutivos mais comuns, caracterizada pela presença de oligomenorréia, hiperandrogenismo e morfologia de ovários policísticos (ASUNCION et al., 2000), acometendo cerca de 6 a 14% das mulheres em idade reprodutiva (MARCH et al., 2010; SANCHON et al., 2012). O hiperandrogenismo é a principal característica encontrada na fisiopatologia de anovulação crônica da SOP (AZZIZ et al., 2006).

A infertilidade acomete aproximadamente 74% das mulheres com SOP (VITEK et al., 2016) e muitas destas mulheres recorrem à tratamentos de reprodução assistida (TRA) para obtenção de oócitos capazes de serem fertilizados, porém ainda é questionável se essas técnicas influenciam na qualidade dos oócitos, nas taxas de fertilização e clivagem, na própria qualidade embrionária e até mesmo no sucesso da gravidez. Alguns estudos demonstraram uma similaridade e/ou até mesmo melhores taxas de gravidez em mulheres com SOP em comparação com mulheres sem a doença (HEIJNEN et al., 2006; ASHRAFI et al., 2011; NAHUIS et al., 2011; PERALES-PUCHALT and LEGRO, 2013), porém existem estudos que são contraditórios a isto (QIAO and FENG, 2011; YOUNIS et al., 2011; JUNK and YEAP, 2012; SIGALA et al., 2015). Um recente estudo mostrou que a gravidez e as taxas de natalidade da SOP parecem ser comparáveis às da população em geral (FOURNIER et al., 2017).

Um desafio para as TRA é a síndrome de hiperestimulação ovariana (SHO) frequentemente encontrada na SOP (BROWN et al., 2009; NASTRI et al., 2010). Durante a hiperestimulação ovariana controlada (HOC) as mulheres com SOP apresentam grande número de folículos em crescimento, no entanto esses são frequentemente heterogêneos em tamanho e grau de maturação. Estudos sugerem que os oócitos em metáfase II (MII) são de baixa qualidade (DUMESIC and ABBOTT, 2008; FRANKS et al., 2008; QIAO and FENG, 2011) e que a capacidade reprodutiva do oócito pode ser prejudicada em pacientes com SOP devido a uma interação inadequada entre as células do *cumulus* e o oócito (KENIGSBERG et al., 2009; KWON et al., 2010). Ainda, mais da metade dos oócitos obtidos durante a estimulação ovariana apresentam uma ou mais anormalidades morfológicas (RIENZI et al., 2008; SETTI et al., 2011).

Além das alterações morfológicas, oócitos MII de mulheres com SOP apresentaram um perfil de expressão gênica alterada, especialmente dos genes envolvidos no alinhamento e na separação dos cromossomos durante a meiose e a mitose, nos genes relacionados aos

check-points do ciclo celular, genes que codificam para os receptores de hormônios esteróides, em especial o para receptor de andrógenos e em genes relacionados ao recrutamento de folículos primários (WOOD et al., 2007; KENIGSBERG et al., 2009; KWON et al., 2010; WEI et al., 2011).

Devido as diversas alterações relacionadas a SOP, esta pode ser considerada como uma doença multifatorial, em que fatores genéticos e ambientais estão associados à etiologia dessa doença (JONES et al., 2012), podendo estes fatores variar de acordo com as diferentes populações (TIAN et al., 2006; NORMAN et al., 2007).

1.2 Alterações metabólicas na SOP

Alterações metabólicas são frequentemente observadas na SOP, dentre elas dislipidemia, obesidade, hipertensão, resistência insulínica (RI), dentre outras. A RI possui uma posição de destaque na fisiopatologia da SOP (GOODARZI et al., 2005) com uma prevalência de 50 a 90% nestas mulheres (CARMINA and LOBO, 2004; SALEHI et al., 2004). A RI e a hiperinsulinemia compensatória aumenta a produção dos andrógenos ovarianos e diminui a produção hepática da globulina transportadora de hormônio sexual (SHBG), resultando no hiperandrogenismo (DIAMANTI-KANDARAKIS and DUNAIF, 2012). São inúmeros os estudos que apontam a SOP como um marcador de risco para doença cardiovascular (DCV) (CIBULA et al., 2000; ORIO et al., 2004; ORIO et al., 2004; TALBOTT et al., 2004; TARKUN et al., 2004). Fatores de risco, como obesidade, hipertensão arterial, intolerância a glicose ou diabetes mellitus tipo 2 (DM2), hiperinsulinemia e dislipidemia podem favorecer ainda mais o desenvolvimento de DCV (DUNAIF, 1995; LEGRO et al., 1999; CIBULA et al., 2000; YILDIZ et al., 2002; CARMINA et al., 2005; TEEDE et al., 2006; SALLEY et al., 2007; ORIO et al., 2008). Além disso, alguns biomarcadores de aterosclerose coronária subclínica parecem estar relacionados com a SOP, que incluem a proteína c-reativa (ESCOBAR-MORREALE et al., 2011) e homocisteína (GUZELMERIC et al., 2007).

Os biomarcadores inflamatórios tem papel importante na biologia dos telômeros (FITZPATRICK et al., 2007; RICHARDS et al., 2008; O'DONOVAN et al., 2011; ZHANG et al., 2013; WONG et al., 2014), pois a atividade inflamatória elevada acelera a perda telomérica devido a liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) que por sua vez danifica o DNA via estresse oxidativo (JAISWAL et al., 2000). Em se tratando EROs, um estudo reportou um nível significativamente maior de EROs nas células da granulosa no

grupo de mulheres com SOP em comparação com mulheres controle (LAI et al., 2017) e uma correlação negativa entre os níveis de EROs e a porcentagem de embriões de grau I sugere que, em condições de excesso de EROs, como na SOP, a incidência de anormalidades meióticas pode aumentar o comprometimento da competência oocitária (ZHU et al., 2015).

Em contrapartida, os hormônios sexuais, tais como andrógenos e estrógenos, estão associados com a diminuição da erosão dos telômeros, pois a ação desses hormônios parecem aumentar a expressão e/ou atividade da telomerase (CALADO et al., 2009; NOURBAKHSI et al., 2010). Neste mesmo contexto, Townsley *et al.* (2016) estudaram o uso do hormônio sexual sintético danazol e encontraram um alongamento do telômero em pacientes com doença telomérica (TOWNSLEY et al., 2016).

Na SOP, o número de folículos excessivos presente nos ovários está ligado à distúrbios na foliculogênese, consequência do hiperandrogenismo intraovariano, pode afetar o estado de crescimento das células da granulosa (CANIPARI, 2000; JONARD and DEWAILLY, 2004; DUMESIC et al., 2008; FRANKS et al., 2008; HOMBURG, 2009; CHANG and COOK-ANDERSEN, 2013), o qual pode estar relacionado com a atividade da telomerase e a manutenção do comprimento telomérico (OZTURK et al., 2014).

1.3 Telômero e senescência celular

A capacidade reprodutiva feminina está diretamente relacionada com mecanismos proliferativos levando uma redução/perda da fertilidade como consequência das alterações ovarianas que reduzem o número e a qualidade dos oócitos (HASSOLD and HUNT, 2001). Os telômeros são um dos principais marcadores genéticos de envelhecimento celular, cujo comprimento é reduzido a cada divisão mitótica, o qual limita o crescimento celular, mediando a senescência (HAGELSTROM et al., 2010; LIU and LI, 2010).

O telômero são complexas estruturas que formam as extremidades dos cromossomos de eucariotos, constituída de sequências repetitivas de DNA (TTAGGG, em humanos) associadas a proteínas. Os telômeros desempenham um importante papel na regulação da estabilidade genômica, protegendo contra degradação, permitindo o correto alinhamento dos cromossomos e garantindo eficiente replicação destes (FARR et al., 1991; VAN STEENSEL et al., 1998; O'SULLIVAN and KARLSEDER, 2010). A manutenção dos telômeros é essencial para que uma célula normal desempenhe suas funções biológicas. Na ausência de mecanismos de manutenção do comprimento dos telômeros, as extremidades dos cromossomos são encurtadas a cada divisão celular (BONETTI et al., 2013).

O principal mecanismo envolvido na manutenção dos telômeros é baseado na atividade da telomerase, um complexo enzimático especializado, que é capaz de adicionar repetições TTAGGG nas extremidades dos cromossomos (GREIDER and BLACKBURN, 1985). Na maioria das células somáticas, a telomerase é expressa apenas transitoriamente e em níveis baixos. No entanto, células que estão passando por uma rápida proliferação e crescimento celular, tais como as células embrionárias, células-tronco adultas e células precursoras da medula óssea, apresentam alta atividade da telomerase (CHIU et al., 1996; WRIGHT et al., 1996; COLLINS and MITCHELL, 2002).

A enzima telomerase é uma ribonucleoproteína, que em sua forma ativa consiste de duas principais subunidades, uma transcriptase reversa (TERT) e componente de RNA (TERC) (COHEN et al., 2007; VENTEICHER et al., 2009). A TERT usa a subunidade TERC como um molde de RNA complementar à sequência de DNA telomérico para a síntese da nova sequência repetitiva (GREIDER, 1996; BLASCO et al., 1999). A subunidade TERT é ao mesmo tempo o componente catalítico e o fator determinante para a atividade da telomerase. Sua regulação transcricional é a forma primária de controle da atividade da telomerase (ZHOU et al., 2013). A expressão do gene *TERT*, ou seja, os níveis de RNA mensageiro, bem como os níveis de proteína são considerados um biomarcador confiável para determinar a atividade da telomerase. No entanto, o gene *TERC* não parece ser um bom marcador para esta atividade, pois é transcrito na maioria dos tipos celulares, mesmo em células telomerase negativas (BODNAR et al., 1998).

A perda do DNA telomérico é frequentemente encontrada em doenças relacionadas a idade, ou envelhecimento celular, em que os mecanismos de manutenção parecem estar desativados e a perda da atividade da telomerase é um dos principais eventos relacionados. As doenças reprodutivas, cuja perda ou redução da função ovariana podem estar relacionadas a um mecanismo de atresia folicular impulsionado por alterações teloméricas. Essas modificações podem levar a alterações genéticas no oócito, bem como nas demais células foliculares, reduzindo a qualidade e a capacidade reprodutiva dessas células (KEEFE et al., 2006).

1.4 SOP, comprimento do telômero e atividade da telomerase

No contexto da SOP, Li *et al.* (2014) observaram encurtamento no comprimento do telômero em leucócitos do sangue periférico de mulheres com SOP em comparação com mulheres saudáveis (LI et al., 2014). Em contrapartida, um recente estudo do nosso grupo

analisou o comprimento do telômero em leucócitos de mulheres em idade reprodutiva e não encontrou diferença nas mulheres com SOP em comparação com mulheres controle. No entanto, foi encontrada uma correlação negativa dos biomarcadores proteína c-reativa e homocisteína com o comprimento do telômero (PEDROSO et al., 2015).

Nosso grupo também estudou o treinamento resistido progressivo por um período de quatro meses em mulheres com SOP e controle, e foram encontrados benefícios em todas as mulheres, tanto na composição corporal como hormonal. Entretanto, não houve diferença no comprimento do telômero nos leucócitos entre os grupos SOP e controle. Através de uma análise ajustada, foi observado um encurtamento do telômero em todas as participantes e um aumento da homocisteína após o treinamento. Adicionalmente, foi encontrada também uma correlação entre o comprimento telomérico nos leucócitos e os níveis de androstenediona nas mulheres com SOP (MIRANDA-FURTADO et al., 2016) .

Um recente estudo também investigou o comprimento do telômero nos leucócitos e as relações entre os parâmetros de saúde óssea e de inflamação crônica em mulheres pré-menopáusicas com e sem SOP. Foi observado um aumento dos níveis de proteína c-reativa e na relação proteína c-reativa/albumina no grupo SOP. Entretanto, não foi encontrada uma diferença no comprimento do telômero entre os grupos (KALYAN et al., 2017).

No estudo de Wei et al. (2017) foi realizada análise nos leucócitos e nas células da granulosa de mulheres com SOP e controle e também não encontraram diferença significativa no comprimento do telômero nos leucócitos ($0,99 \pm 0,44$ vs $1,00 \pm 0,38$, $p= 0,93$, respectivamente). Em contrapartida, o comprimento do telômero nas células da granulosa no grupo SOP foi maior do que no grupo controle ($1,00 \pm 0,37$ vs $1,57 \pm 0,67$, $p< 0,0001$) (WEI et al., 2017).

1.5 Comprimento do telômero e atividade da telomerase no complexo *cumulus*-oócito

Os complexos *cumulus*-oócitos (COCs) são uma parte vital da fase folicular e seu processo de desenvolvimento determina a qualidade dos oócitos e a melhora nos resultados de fertilização (OUANDAOGO et al., 2011). As células do *cumulus* são um subgrupo de células da granulosa que circundam o oócito nos folículos antrais e, devido à sua proximidade com o oócito, desempenham um importante papel na regulação da maturação oocitária (DEKEL and BEERS, 1980; LARSEN et al., 1986). As células do *cumulus* e as células da granulosa humanas são considerados marcadores para qualidade e competência do oócito (HAMEL et al., 2008), as quais auxiliam no início do desenvolvimento embrionário (VAN MONTFOORT

et al., 2008), garantindo a qualidade do embrião e o estado de gravidez (ASSOU et al., 2008). As células reprodutivas, tais como as células germinativas primordiais, células proliferativas da granulosa, células tronco de linhagem germinativa e células neoplásicas do ovário apresentam atividade elevada da telomerase durante o crescimento celular, a qual é reduzida após a diferenciação ou quando estas estão envelhecidas (LAVRANOS et al., 1999; YAMAGATA et al., 2002). A atividade da telomerase nas células da granulosa é mais alta no folículo pré-antral e gradualmente diminui durante os estádios de desenvolvimento subsequentes e uma redução desta atividade da telomerase pode resultar em uma diminuição do hormônio folículo estimulante (FSH) e atresia folicular. O comprimento do telômero anormal nestas células da granulosa pode levar a baixa qualidade e um baixo número de oócitos (CANIPARI, 2000; BUTTS et al., 2009; OZTURK et al., 2014).

O comprimento dos telômeros em células da granulosa estão relacionados com melhor qualidade embrionária, em que as células do *cumulus* provenientes de oócitos que após a fertilização resultaram em embriões de boa qualidade apresentaram telômeros mais alongados quando comparados com às células provenientes de oócitos que resultaram em embriões de má qualidade. Ainda, oócitos humanos maduros apresentam maior comprimento do telômero nas células do *cumulus* do que oócitos imaturos (CHENG et al., 2013). Tais achados sugerem que o comprimento do telômero nas células de *cumulus* pode ser um potencial biomarcador de qualidade e competência do oocitário e de qualidade embrionária.

O comprimento do telômero e a atividade da telomerase nas células da granulosa são afetados pelo envelhecimento, mas também alterações hormonais, como os estrogênios influenciam os telômeros (BAYNE et al., 2011; GOTO et al., 2013), os quais desempenham um papel crucial na regulação da atividade da telomerase nas células da granulosa (ENDO et al., 2014). A atividade da telomerase está presente em todos os estádios do desenvolvimento oocitário e embrionário, incluindo oócitos imaturos no estágio de vesícula germinativa (VG), oócitos MII, zigoto, embriões de 2-3 células, de 4-5 células, de 6-7 células, de 8-16 células, mórula e blastocisto. Um estudo relatou que a média do comprimento dos telômeros foram maiores nos oócitos VG (11,12 kb) e blastocistos (12, 22 kb) do que embriões em estágio de clivagem (8,43 kb) (TURNER et al., 2010). Neste contexto, oócitos maduros que não foram fertilizados parecem não apresentar atividade da telomerase, ou a atividade é extremamente baixa (WRIGHT et al., 2001).

Em um recente estudo publicado pelo mesmo grupo citado acima, o comprimento do telômero em oócitos humanos, espermatozoides individuais, e pró-núcleo feminino e masculino foram analisados através do Q-FISH (*Quantitative Fluorescent in situ*

hybridization) para comparar a contribuição parental para o comprimento do telômero no zigoto humano. Os resultados mostraram que o comprimento do telômero em oócitos humanos maduros ($8,79 \pm 0,86$ kb) e pró-núcleo feminino (8,63 kb) foram maiores quando comparados a espermatozoides individuais ($6,32 \pm 2,00$ kb) e pró-núcleo masculino (6,16 kb). Além disso, os telômeros em oócitos imaturos ($11,41 \pm 0,81$) foram significativamente maiores do que oócitos maduros ($8,79 \pm 0,86$) (TURNER and HARTSHORNE, 2013). O comprimento do telômero em oócitos humanos maduros para o procedimento de fertilização *in vitro* já foi descrito com a média de $7,5 \pm 1,17$ kb (KEEFE et al., 2007).

A manutenção e/ou o alongamento do comprimento do telômero durante a foliculogênese, a maturação oocitária e o desenvolvimento embrionário inicial são muito importantes para o sucesso da gravidez. Com isso, a possibilidade da utilização da análise do comprimento do telômero e da atividade da telomerase como ferramentas para o diagnóstico de fertilidade em oócitos e embriões devem ser amplamente investigada (OZTURK et al., 2014). Adicionalmente, o comprimento dos telômeros das células de *cumulus* obtidos no momento da coleta dos oócitos pode ser um potencial biomarcador de qualidade oocitária e embrionária, possibilitando ainda uma maior compreensão dos mecanismos reprodutivos envolvidos na SOP.

1.6 Justificativa

Muitas hipóteses tem sido investigadas a fim de determinar a etiologia da SOP. Dado a variedade de alterações metabólicas relacionadas, diversos fatores em conjunto podem contribuir para o fenótipo da doença, fazendo da SOP uma doença complexa e multifatorial. Dentre as alterações genéticas relacionadas, a biologia dos telômeros tem sido constantemente investigada e relacionada a anovulação crônica observada nesta síndrome que pode estar relacionada a uma acelerada atresia folicular e consequentemente a senescência oocitária. A SOP é uma doença reprodutiva interessante para tal estudo, visto que ao passo que as alterações metabólicas e o estado inflamatório possam favorecer o encurtamento dos telômeros, em contrapartida, os hormônios sexuais, tais como andrógenos e estrógenos, parecem auxiliar na manutenção dos mesmos, favorecendo a expressão e/ou atividade da enzima telomerase (CALADO et al., 2009; NOURBAKHSH et al., 2010). Adicionalmente, o comprimento dos telômeros das células de *cumulus* obtidos no momento da coleta dos oócitos pode ser um potencial biomarcador de qualidade oocitária e embrionária, possibilitando ainda uma maior compreensão dos mecanismos reprodutivos envolvidos na SOP.

2 Objetivos

2.1 Objetivo primário

Avaliar o comprimento dos telômeros e atividade da telomerase nas células do *cumulus* de mulheres com SOP e de mulheres com ciclos menstruais regulares, ambas submetidas ao TRA.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar o comprimento dos telômeros e atividade da telomerase nos oócitos de mulheres com SOP e de mulheres com ciclos menstruais regulares
- Analisar o comprimento dos telômeros nos leucócitos do sangue periférico de mulheres com SOP e de mulheres com ciclos menstruais regulares
- Investigar a relação entre o comprimento dos telômeros das células do *cumulus*, dos oócitos e leucócitos de mulheres com SOP e de mulheres com ciclos menstruais regulares
- Comparar a relação entre a atividade da telomerase das células do *cumulus* e dos oócitos de mulheres com SOP e de mulheres com ciclos menstruais regulares

3 Casuística, Material e Métodos

3.1 Casuística

Este estudo prospectivo caso-controle foi constituído por um grupo de mulheres com SOP e um grupo de mulheres com ciclos menstruais regulares (controle), ambas submetidas ao TRA.

As mulheres foram recrutadas no Ambulatório de Infertilidade Conjugal do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Setor de Reprodução Humana, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), no período de setembro de 2015 a junho de 2017.

Um total de 110 voluntárias foram avaliadas: 43 mulheres com SOP e 67 mulheres controle que foram submetidas à fertilização *in vitro*/injeção intracitoplasmática de espermatozoide (FIV/ICSI). Este estudo foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa através do número Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE 48354915.5.0000.5440) e Parecer número 1.394.014, onde todas as mulheres assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (em anexo).

Foram incluídas neste estudo mulheres com idade entre 20 a 38 anos, independente de raça ou condição social. As mulheres do grupo SOP foram diagnosticadas através do critério estabelecido pela Sociedade de Excesso Androgênico (2006), o qual inclui os sinais clínicos e/ou bioquímicos de hiperandrogenismo com oligo/amenorréia ou ovários policísticos (AZZIZ et al., 2006). Mulheres com ciclos menstruais regulares, sem hiperandrogenismo e FSH <10 UI/ml foram incluídas no grupo controle, cuja causa de infertilidade foi pelo fator masculino ou infertilidade sem causa aparente (ESCA). Os critérios de exclusão foram mulheres tabagistas, com qualquer anormalidade no sistema endócrino que pode interferir no eixo hipotálamo-hipófise, tais como hiperprolactinemia, hiperplasia adrenal congênita tardia e Síndrome de *Cushing*.

3.2 Metodologia

3.2.1 Hiperestimulação Ovariana Controlada

Para a coleta dos oócitos e células do *cumulus*, as pacientes foram submetidas ao processo de HOC. Para a monitorização HOC, as mulheres foram induzidas à menstruação com a administração de anticoncepcional hormonal oral (ACO) de baixa dosagem. Entre o primeiro e o terceiro dia do ciclo menstrual as mulheres passaram pela ultrassonografia

transvaginal para verificar a presença ou não de cistos ovarianos e para contagem de folículos antrais. O FSH recombinante foi administrado na dose de 100 a 225U/dia, de acordo com a contagem de folículos antrais e a monitorização foi realizada por ultrassom transvaginal. Para dessensibilização hipofisária foi utilizado antagonista do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) - *Orgalutran*[®] (Schering-Plough) ou *Cetrotide*[®] (Merck) na dose de 0,25mg/dia, iniciada após os folículos atingirem o diâmetro médio de 14 mm até o dia da administração de gonadotrofina coriônica recombinante (r-hCG) *Ovidrel*[®] (Serono). Na presença de dois folículos maiores ou iguais a 18 mm de diâmetro médio foi realizada a administração do r-hCG na dose de 250 µg. Após 34-36 horas foi realizada a aspiração dos oócitos via ultrassom transvaginal sob sedação. Os oócitos aspirados foram lavados com o meio de cultivo HTF Hepes (Irvine Scientific) para remoção de sangue e *debris*.

3.2.2 Coleta das amostras e dosagens

Foi realizada coleta de sangue periférico (25 ml) para posterior análise do comprimento do telômero e dosagens hormonais. Logo após a coleta, o sangue periférico passou pelo procedimento de separação dos leucócitos. O *pellet* dos leucócitos foi ressuspenso em tampão fosfato-salino (PBS) 1X (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EUA), e assim como o soro, armazenados no freezer a -80°C para posterior dosagens hormonais, extração de DNA e análise do comprimento do telômero.

Após 2 horas da aspiração dos oócitos, foi realizada a coleta de células do *cumulus* de oócitos imaturos (CCI), de células do *cumulus* de oócitos maduros (CCM) e os oócitos VG e oócitos em metáfase I (MI). No isolamento dos COCs, as células do *cumulus* circundante do oócito foram removidas e transferidas para um tubo contendo 60 µl de PBS 1X e os oócitos para um tubo contendo 20 µl de PBS 1X. As células do *cumulus* e os oócitos imaturos foram armazenados no freezer -80°C até a extração do DNA e posterior análise do comprimento do telômero e atividade da telomerase.

Foram avaliados os seguintes dados de cada paciente: idade, peso, altura, índice de massa corporal (IMC), assim como dosagens de hormônio luteinizante (LH), FSH, SHBG, prolactina, estradiol, insulina, testosterona total, androstenediona, homocisteína e proteína c-reativa. O índice de androgênio livre (FAI) foi calculado através da fórmula: Testosterona total (nmol/L)/ SHBG (nmol/L) x 100 (CASCELLA et al., 2006). Para a obtenção da testosterona total em nmol/L multiplicamos o valor obtido em ng/dL pelo fator de conversão 0,0347.

O LH, FSH, SHBG, a insulina, a prolactina, o estradiol, a homocisteína e a proteína c-reativa foram dosados pelo método de quimiluminescência através do aparelho Siemens Immulite® 2000 XPi (Diagnostic Products Corporation Los Angeles, CA, USA®); a testosterona total e a androstenediona pelo método de radioimunoensaio através do cintilador Tri-Carb 2100TR (Packard® Instrument Company, IL, USA).

Foram coletados os dados de contagem de folículos antrais (CFA), quantidade de folículos maiores que 14 mm, de oócitos coletados, de oócitos MII coletados, de oócitos injetados, de oócitos fertilizados e de oócitos clivados, bem como características morfológicas dos oócitos.

A avaliação embrionária foi realizada de acordo com o Consenso de Istanbul (ALPHA SCIENTISTS IN REPRODUCTIVE and EMBRYOLOGY, 2011). O desenvolvimento embrionário foi monitorado do dia 1 (checagem da fertilização) ao dia 5/6 (Estágio de blastocisto). No dia 2 do desenvolvimento embrionário foi avaliada a presença de embriões considerados excelente ou *top*, classificados como 4G1 (Embriões de 4 células grau 1), que são embriões com 4 células, de tamanhos iguais e sem multinucleação, com menos de 10% de fragmentação. Esta mesma avaliação foi realizada no dia 3 do desenvolvimento embrionário, sendo considerados excelente ou *top*, embriões classificados como 8G1 (Embriões de 8 células grau 1), que são embriões com 8 células, de tamanhos iguais e sem multinucleação, com menos de 10% de fragmentação.

No dia 5/6 os blastocistos foram classificados em:

Estágio de desenvolvimento: 1. Precoce, 2. Blastocisto, 3. Expandido, 4. *Hatched/hatching*;

Massa celular interna: 1. Bom: células compactadas e firmemente aderidas, 2. Razoável: algumas células vagamente agrupadas, 3. Ruim: difícil para discernir com algumas células.

Trofoectoderma: 1. Bom: muitas células formando epitélio coeso, 2. Razoável: algumas células formando um epitélio solto, 3. Ruim: pouquíssima células.

No dia da expansão dos blastocistos, dias 5/6 de desenvolvimento, foi avaliada a presença de blastocistos considerados excelente ou *top*, classificados como 3.1.1. (Classificação de blastocisto expandido, com massa celular interna compactada e firmemente aderidas e trofoectoderma com muitas células formando epitélio coeso) e 4.1.1. (Classificação de blastocisto em *hatched/hatching*, com massa celular interna compactada e firmemente aderidas e trofoectoderma com muitas células formando epitélio coeso).

Foram coletados também dados como sexo, peso, altura e idade gestacional dos nascidos vivos gerados destas pacientes do estudo.

3.2.3 Comprimento do telômero em células do *cumulus* e leucócitos

O DNA genômico das CCI, das CCM e dos leucócitos foram extraídos através do *MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit (Epicentre)*, de acordo com as instruções do fabricante. A concentração e integridade de DNA foram determinadas através do espectrofotômetro *Nanodrop 2000c* (Thermo Scientific).

O comprimento dos telômeros foi determinado pelo método quantitativo da reação em cadeia da polimerase (qPCR). Este método determina o comprimento do telômero a partir da abundância de sequência telomérica (TTAGGG) em comparação à abundância da sequência de um gene único [*single gene*; razão T/S (Razão telômero/*single gene*)], como descrito anteriormente (CAWTHON, 2009; SCHEINBERG et al., 2010; CALADO et al., 2011), utilizando as seguintes sequências de *primers* para o telômero: T-Fw, 5'CGGTTTGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTT3' e T-Rv, 5'GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT3'; e para o *single gene* S-FW, 5'CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC3' e S-Rv, 5'CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA3'. As amostras foram analisadas em triplicata e cada reação contém 1,6 ng de DNA genômico, 7,2 pg de cada *primer* (exceto para o *primer* reverso do *single gene*, que conterá 12 pg) e 16 µL de *Rotor-Gene SYBR Green PCR Master Mix*, da Qiagen. O comprimento do telômero de cada amostra (x) foi baseado na razão T/S e baseada no cálculo do ΔCt [$Ct(\text{telômero})/Ct(\text{single gene})$]. O comprimento do telômero foi expresso em razão relativa T/S, normalizada para a média da razão T/S da amostra de referência [$2^{-(\Delta Ct_x - \Delta Ct_r)} = 2^{-\Delta \Delta Ct}$], amostra esta também usada como curva padrão, amostra de referência e amostra de validação.

A reação de telômeros foi realizada utilizando 25 ciclos, por 47 minutos, no instrumento *Rotor-Gene Q Real-Time PCR* utilizando o *Rotor-Gene SYBR Green Kit*, em um volume de reação de 20 µL. As condições de PCR utilizadas para o ensaio foram: 95°C 5min, 98°C 7s, 60°C 10s (25 ciclos). Os discos de 100 poços foram manipulados utilizando o instrumento de manipulação de líquidos *QIAgility*. A reação do *single gene* é realizada em 35 ciclos, por 61 minutos e as condições de PCR foram: 95°C 5 minutos; 98°C 7 segundos, 58°C 10 segundos (35 ciclos).

Master Mix (Qiagen), 0,5 µL de cada *primer forward/reverse* (10 uM Tel ou *Alu*), 5 µL DNA pré-amplificado e purificado e água ultra pura, em um volume final de 20 µL de reação. Em cada placa foi realizada uma curva padrão contendo cinco pontos, com a diluição seriada da amostra de referência em que foi utilizado DNA de células HeLa, partindo de 5 ng/uL. As condições de PCR utilizadas para o telômero e o *Alu* foram: 95°C por 10 min; 95°C por 15 seg, 60°C por 1 min (39x ciclos). Os discos de 100 poços foram manipulados utilizando o instrumento de manipulação de líquidos *QIAgility*. O comprimento do telômero de cada amostra (x) foi baseado na razão T/R (Razão telômero/*Alu*), onde R é o valor da sequência *Alu*, baseada no cálculo do ΔCt [$Ct(\text{telômero})/Ct(\text{Alu})$]. O comprimento do telômero foi expresso em razão relativa T/R, normalizada para a média da razão T/R da amostra de referência HeLa [$2-(\Delta Ctx - \Delta Ctr) = 2-\Delta \Delta Ct$], amostra esta também usada como curva padrão.

3.2.5 Atividade da telomerase em células do *cumulus* e oócitos

A atividade da telomerase das CCI, das CCM e dos oócitos VG e MI foi mensurada pelo protocolo de amplificação de repetições teloméricas (TRAP, do inglês *Telomeric Repeat Amplification Protocol*) com o kit S7707FR *TRAPeze*® XL (Merck Millipore), de acordo com as instruções do fabricante.

As linhagens celulares HeLa e VA13 (ATCC) foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente, para a atividade da telomerase. Para as CCI e CCM, as proteínas foram extraídas através da adição de 40 µL de CHAPS (tampão de lise). Os oócitos estavam armazenados individualmente em 5 µL de PBS 1×, aos quais foram adicionados 5 µL de CHAPS. Posteriormente, as amostras foram incubadas no gelo por 30 min e centrifugadas ($12.000 \times g$ por 20 min a 4°C). Os sobrenadantes das CCI e CCM (30 µL) e de cada oócito (8 µL) foram transferidos para novos microtubos e armazenados em freezer -80°C.

Alíquotas dos extratos de proteínas de cada amostra (exceto dos oócitos) foram usadas para determinar a concentração, através do *Pierce™ BCA Protein Assay kit* (Pierce, Thermo Scientific), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de proteínas de cada amostra foi determinada usando uma curva padrão e a concentração final foi calculada como a média das duplicatas. As amostras de proteínas das CCI e CCM foram diluídas em tampão CHAPS até uma concentração final de 150 ng/µL e armazenadas no freezer -80°C.

Para o ensaio TRAP, reações de PCR foram preparadas com 2 µL das proteínas (300 ng) de CCM, CCI, HeLa ou VA13, 10 µL do 5× *TRAPeze* XL, 0,4 µL de Taq polimerase (*Platinum Taq DNA Polymerase*, Invitrogen) e água ultra pura para o volume final de 50 µL

por reação. Para os oócitos, a mesma reação foi preparada com 4 μ L de extrato de proteínas de cada oócito. Para assegurar que o método seria sensível para uma única célula realizamos, em cada experimento, a medição da atividade da telomerase em extratos de HeLa obtidos a partir de 1, 10, 100, 1.000 e 10.000 células. Os experimentos para detecção da atividade da telomerase em oócitos individuais só foram considerados se a curva resultante das medições seriadas de células tivesse coeficiente de correlação (r^2) $\geq 0,9$.

No ensaio TRAP, as diluições de um molde sintético de telômeros (TSR8) foram preparadas para gerar uma curva padrão. O TSR8 é uma sequência de oligonucleotídeos composta por oito repetições teloméricas. Vários controles foram utilizados neste ensaio: controles positivo e negativo de telomerase (células HeLa e VA13), controles negativos da reação de PCR (substituição das proteínas por CHAPS ou da polimerase por H₂O). As reações foram pipetadas em duplicata e as condições de temperatura dos ciclos foram: 30 °C durante 30 min (para extensão da telomerase) e PCR de 4 passos: 36 ciclos a 94 °C durante 30 seg, 59 °C durante 30 seg e 72 °C durante 1 min, depois um passo de extensão a 72 °C durante 3 min, e 55 °C durante 25 min, concluindo com uma incubação de 4°C.

Após essa etapa, a fluorescência das reações foi capturada. Para isso, foram adicionados 50 μ L do produto de PCR a 150 μ L de solução tampão (TrisHCl 10 mM pH 7,4, NaCl 0,15 M, MgCl₂ 2 mM). A leitura foi feita no fluorômetro SpectraMax e no software SoftMax, utilizando os parâmetros de excitação/emissão da fluoresceína (495 nm/516 nm) e sulforrodamina (600 nm/620 nm).

Para calcular o aumento da emissão de fluorescência, o "controle sem telomerase" foi subtraído da emissão de fluoresceína (Δ FL), e o "controle sem polimerase" foi subtraído da emissão de sulforrodamina (Δ R) em cada reação. O $\log_{10}$ da relação relativa de aumento de fluorescência foi calculado para cada reação: $\log_{10} (\Delta$ FL/ Δ R). Para gerar uma curva padrão, o $\log_{10} (\Delta$ FL/ Δ R) calculado para cada diluição de TSR8 foi traçado no eixo Y contra o valor $\log_{10}$ da concentração correspondente de TSR8 (0,4, 0,08, 0,016 ou 0,0032 amoles) no eixo X. Uma vez que 1 amole de TSR8 corresponde a 1.000 unidades de TPG (que são as unidades para a medição da atividade da telomerase), a equação linear gerada a partir da curva padrão foi aplicada para o cálculo do número de unidades de TPG para cada amostra. Uma unidade TPG (produto total gerado) corresponde ao número de primers (em 10^{-3} amole) estendida com pelo menos 3 repetições teloméricas. Um experimento só foi aceito se a curva padrão tivesse um coeficiente de correlação (valor de r^2) $\geq 0,9$. Para os oócitos, como apenas 40% de proteínas de cada oócito foi utilizado por reação de atividade da telomerase, o valor de

unidades TPG foi ajustado para o correspondente à atividade da telomerase do oócito "inteiro" (100%).

3.3 Análise estatística

Foi realizada uma análise exploratória dos dados através da medida de posição central (média e mediana) e dispersão (desvio padrão, intervalo interquartil, valores mínimo e máximo). As variáveis qualitativas foram descritas através de frequências absolutas e relativas. Foi realizada uma análise univariada para verificar se existe diferença entre os grupos SOP e controle e em relação as variáveis de interesse. O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para testar a hipótese H_0 de que não existe diferença entre as distribuições dos grupos SOP e controle em relação as variáveis quantitativas. O teste de exato de Fisher foi utilizado para testar a hipótese H_0 de que não existe diferença entre as proporções de repostas das variáveis qualitativas em relação aos grupos SOP e controle.

O coeficiente de correlação de Spearman foi utilizado para verificar a relação entre as variáveis quantitativas atividade da telomerase e o comprimento do telômero nas diferentes células (CCI, CCM, oócitos VG e MI, e leucócitos). O coeficiente de correlação varia entre -1 e 1 sendo que valores próximos de -1 evidenciam uma relação perfeita e inversa entre duas variáveis quantitativas. Valores próximos de 0 evidenciam ausência de correlação. Valores próximos de 1 evidenciam uma relação perfeita entre as variáveis.

Modelos de regressão linear múltipla foram utilizados para verificar o efeito das variáveis grupo, idade, IMC, insulina, proteína c-reativa, homocisteína, testosterona, FAI, androstenediona em relação à atividade da telomerase das CCI e das CCM, e ao comprimento do telômero dos leucócitos, das CCI, das CCM e dos oócitos VG. Uma análise de resíduo foi desempenhada para verificar o ajuste dos dados ao modelo.

Os gráficos foram realizados no programa RStudio versão 3.3.3.

Os testes foram implementados no programa SAS versão 9.3 (SAS Institute Inc., University of North Carolina, NC, USA), em que foi considerado um nível de significância de 5%.

4 Resultados

Um total de 833 pacientes submetidas aos TRA foram avaliadas. Dessas, 723 não preencheram os critérios de inclusão estabelecidos no estudo, ou foram excluídas por falta de material genético (DNA ou proteína) para as análises relacionadas. Foram consideradas elegíveis e incluídas no estudo 110 voluntárias recrutadas, sendo 43 pertencentes ao grupo SOP e 67 ao grupo controle (Figura 1).

Figura 1. Fluxograma do estudo.

(+) Gravidez positiva; (-) Gravidez negativa; SOP (Síndrome dos Ovários Policísticos); TEF (Transferência de embriões à fresco); TEC (Transferência de embriões congelados); DESOV (Descongelamento de oócitos); FIV (Fertilização *in vitro*).

A estatística descritiva das variáveis quantitativas avaliadas no estudo estão apresentadas na tabela 1. Foi observado nos índices antropométricos, representadas pela média e desvio padrão, que o grupo SOP apresentou maior peso ($74,94 \pm 14,67$ vs $66,25 \pm 11,82$, $p=0,002$) e IMC ($27,88 \pm 5,09$ vs $24,77 \pm 4,11$, $p=0,001$) em relação ao grupo controle, respectivamente. Em contrapartida, não foi observada diferença entre os grupos nas variáveis idade e altura. Em relação as dosagens hormonais, o LH ($3,55 \pm 3,22$ vs $2,11 \pm 2,31$, $p=0,015$), estradiol ($1749,74 \pm 1326,95$ vs $1034,69 \pm 553,03$, $p=0,004$), insulina ($11,01 \pm 8,61$ vs $6,61 \pm 5,64$, $p=0,002$), testosterona ($257,97 \pm 170,07$ vs $117,68 \pm 67,41$, $p<0,0001$), androstenediona ($184,13 \pm 152,22$ vs $92,73 \pm 61,83$, $p=0,001$), FAI ($8,71 \pm 10,83$ vs $3,50 \pm 3,04$, $p<0,0001$) e proteína c-reativa ($0,88 \pm 0,76$ vs $0,42 \pm 0,33$, $p=0,003$) foram maiores no grupo SOP quando comparadas ao grupo controle, respectivamente. Por outro lado os valores de FSH ($8,55 \pm 3,73$ vs $6,07 \pm 3,19$, $p=0,0002$) foram maiores no grupo controle em relação aos valores observados no grupo SOP, respectivamente. Não foram encontradas diferenças entre os grupos nas variáveis SHBG, prolactina e homocisteína (Tabela 1).

Tabela 1: Dados antropométricos e bioquímicos das mulheres do grupo controle e SOP.

Variável	Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mediana	Q1	Q3	Min	Max	P-valor
Idade (anos)	Controle	67	34,3	3,6	35,0	32,0	37,0	25,0	40,0	0,509
	SOP	43	33,7	4,1	34,0	30,0	38,0	25,0	40,0	
Peso (kg)	Controle	67	66,3	11,8	66,0	58,0	73,0	43,0	96,0	0,002
	SOP	42	74,9	14,7	74,0	67,0	81,8	51,0	127,0	
Altura (m)	Controle	67	1,6	0,1	1,7	1,6	1,7	1,5	1,8	0,985
	SOP	42	1,6	0,1	1,7	1,6	1,7	1,5	1,8	
IMC (kg/m ²)	Controle	67	24,8	4,1	24,2	21,3	27,3	18,4	35,0	0,001
	SOP	42	27,9	5,1	28,0	24,1	30,5	18,7	47,2	
SHBG (nmol/L)	Controle	61	158,8	79,7	145,0	98,7	225,0	22,3	358,0	0,418
	SOP	39	145,6	76,4	133,0	86,8	193,0	30,2	364,0	
Prolactina (ng/mL)	Controle	61	22,9	14,3	20,8	12,4	29,9	2,2	74,9	0,241
	SOP	39	24,7	30,2	16,4	5,5	31,0	0,5	150,0	
LH (mIU/mL)	Controle	61	2,1	2,3	1,2	0,7	2,6	0,2	9,8	0,015
	SOP	39	3,6	3,2	2,6	1,1	5,3	0,2	11,8	
FSH (mUI/ml)	Controle	61	8,6	3,7	8,1	5,7	10,6	2,4	19,8	0,0002
	SOP	39	6,1	3,2	5,3	4,0	6,9	2,3	16,8	
Estradiol (pg/mL)	Controle	61	1034,7	553,0	948,0	634,0	1333,0	193,0	2708,0	0,004
	SOP	39	1749,7	1327,0	1481,0	826,0	2276,0	40,6	6362,0	
Insulina (μIU/mL)	Controle	58	6,6	5,6	4,9	2,4	7,2	2,0	26,2	0,002
	SOP	38	11,0	8,6	8,7	4,8	14,5	2,0	39,0	
Testosterona (ng/dL)	Controle	60	117,7	67,4	99,0	70,0	157,5	21,0	320,0	<0,0001
	SOP	39	258,0	170,1	231,0	142,0	330,0	27,0	810,0	
Androstenediona (ng/dL)	Controle	60	92,7	61,8	85,0	41,0	123,8	8,0	235,0	0,001
	SOP	39	184,1	152,2	122,5	80,0	220,0	43,7	610,0	
FAI	Controle	60	3,5	3,0	2,4	1,5	4,2	0,4	14,8	<0,0001
	SOP	39	8,7	10,8	5,6	3,2	8,9	0,8	52,4	
Proteína c-reativa (mg/L)	Controle	60	0,4	0,3	0,3	0,2	0,6	0,1	1,4	0,003
	SOP	27	0,9	0,8	0,7	0,3	1,2	0,1	2,8	
Homocisteína (ng/dL)	Controle	54	6,4	2,2	5,9	5,0	7,2	3,2	17,5	0,632
	SOP	39	6,6	2,4	6,0	5,3	7,4	3,8	13,6	

*P-valor referente ao teste de Mann-Whitney. Q1 (Primeiro Quartil); Q3 (Terceiro Quartil); SOP (Síndrome dos Ovários Policísticos); IMC (Índice de Massa Corporal); SHBG (globulina de ligação de hormônio sexual); LH (Hormônio Luteinizante); FSH (Hormônio Folículo-Estimulante); FAI (Índice de androgênio livre). Em negrito: $p < 0,05$.

Quando realizada a distribuição das frequências das variáveis qualitativas entre os grupos controle e SOP em relação as diferentes causas de infertilidade, tais como, ESCA, ooforoplastia, fator tubáreo, adesiólise, salpingectomia, hidrossalpinge, hidrossalpinge, leiomiomatose uterina, adenomiose, pólio endometrial, útero didelfo, útero unicorno e útero bicorno e fator masculino, foi observada diferença somente em relação ao fator masculino, o qual foi mais frequente no grupo controle (86,57%) do que no grupo SOP (58,14%) ($p=0,001$) (Tabela 2).

Tabela 2: Distribuição das frequências das causas de infertilidade entre os grupos controle e SOP.

Variável		Controle	SOP	P-valor
ESCA	0	63 (94,03)	43 (100)	0,154
	1	4 (5,97)	0 (0)	
Oooforoplastia	0	66 (98,51)	43 (100)	0,999
	1	1 (1,49)	0 (0)	
Fator tubáreo	0	60 (89,55)	35 (81,40)	0,262
	1	7 (10,45)	8 (18,60)	
Adesiólise	0	66 (98,51)	43 (100)	0,999
	1	1 (1,49)	0 (0)	
Salpingectomia	0	66 (98,51)	43 (100)	0,999
	1	1 (1,49)	0 (0)	
Hidrossalpinge	0	65 (97,01)	43 (100)	0,519
	1	2 (2,99)	0 (0)	
Leiomiomatose uterina	0	62 (92,54)	42 (97,67)	0,401
	1	5 (7,46)	1 (2,33)	
Adenomiose	0	61 (91,04)	43 (100)	0,080
	1	6 (8,96)	0 (0)	
Pólio endometrial	0	63 (94,03)	42 (97,67)	0,647
	1	4 (5,97)	1 (2,33)	
Útero didelfo	0	66 (98,51)	43 (100)	0,999
	1	1 (1,49)	0 (0)	
Útero unicorno	0	66 (98,51)	43 (100)	0,999
	1	1 (1,49)	0 (0)	
Útero bicorno	0	65 (97,01)	43 (100)	0,519
	1	2 (2,99)	0 (0)	
Fator masculino	0	9 (13,43)	18 (41,86)	0,001
	1	58 (86,57)	25 (58,14)	

Teste de exato de Fisher. ESCA (Esterilidade sem causa aparente); SOP (Síndrome dos Ovários Policísticos). Em negrito: $p<0,05$.

Através da análise da distribuição das frequências de outras comorbidades, como hipertensão arterial sistêmica (HAS), intolerância à glicose e hipotireoidismo, não foi encontrada diferença entre os grupos estudados (Tabela 3).

Tabela 3: Distribuição das frequências de outras comorbidades entre os grupos controle e SOP.

Variável		Controle	SOP	P-valor
HAS	0	64 (95,52)	40 (93,02)	0,677
	1	3 (4,48)	3 (6,98)	
Intolerância à glicose	0	67 (100)	41 (95,35)	0,151
	1	0 (0)	2 (4,65)	
Hipotireoidismo	0	59 (88,06)	40 (93,02)	0,523
	1	8 (11,94)	3 (6,98)	

Teste de exato de Fisher. HAS (Hipertensão arterial sistêmica); SOP (Síndrome dos Ovários Policísticos). Em negrito: $p < 0,05$.

Em relação à resposta da HOC, foi observada maior frequência de mulheres com resposta normal no grupo controle (72,58%) em comparação com o grupo SOP (30,23%) ($p < 0,0001$). Em contrapartida, a frequência de mulheres com risco de SHO foi maior no grupo SOP (69,77%) do que no grupo controle (20,97%) ($p < 0,0001$) (Tabela 4).

Tabela 4: Distribuição das frequências em relação à resposta esperada da HOC nas mulheres controle e SOP.

Variável		Controle	SOP	P-valor
Resposta normal	0	17 (27,42)	30 (69,77)	<0,0001
	1	45 (72,58)	13 (30,23)	
Resposta SHO	0	49 (79,03)	13 (30,23)	<0,0001
	1	13 (20,97)	30 (69,77)	
Resposta Baixa reserva ovariana (CFA $\leq$ 7)	0	58 (93,55)	43 (100)	0,1425
	1	4 (6,45)	0 (0)	

Teste de exato de Fisher. HOC (Hiperestimulação ovariana controlada); SOP (Síndrome dos Ovários Policísticos); SHO (risco de síndrome de hiperestimulação ovariana); CFA (contagem de folículos antrais). Em negrito: $p < 0,05$.

O comprimento do telômero dos leucócitos foi menor no grupo SOP ($1,33 \pm 0,66$) quando comparado ao grupo controle ($1,64 \pm 0,57$) ($p = 0,025$). Por outro lado, o comprimento

do telômero nas CCI, CCM e oócitos VG e MI não foi observada diferença entre os grupos controle e SOP (Tabela 5) (Figura 2, 3 e 4).

Tabela 5: Comprimento dos telômeros nos leucócitos, nas células do *cumulus* e nos oócitos imaturos das mulheres do grupo controle e SOP.

Variável	Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mediana	Q1	Q3	Min	Máx	P-valor
TEL CCI (razão T/S)	Controle	23	1,58	0,33	1,62	1,39	1,81	0,98	2,18	0,649
	SOP	19	1,6	0,56	1,52	1,18	1,91	0,89	2,83	
TEL CCM (razão T/S)	Controle	47	1,7	0,43	1,64	1,41	1,97	0,95	2,57	0,378
	SOP	24	1,61	0,47	1,61	1,17	1,91	0,94	2,5	
TEL oócitos VG (razão T/S)	Controle	14	0,17	0,19	0,08	0,04	0,27	0,02	0,65	0,106
	SOP	11	0,32	0,27	0,27	0,1	0,6	0,03	0,85	
TEL oócitos MI (razão T/S)	Controle	6	0,19	0,19	0,1	0,07	0,32	0,03	0,51	0,345
	SOP	9	0,37	0,34	0,34	0,09	0,47	0,05	1	
TEL leucócitos (razão T/S)	Controle	61	1,64	0,57	1,71	1,4	2,01	0,43	3	0,025
	SOP	38	1,33	0,66	1,17	0,75	1,75	0,44	2,62	

*P-valor referente ao teste de Mann-Whitney. Q1 (Primeiro Quartil); Q3 (Terceiro Quartil); SOP (Síndrome dos Ovários Policísticos); TEL (comprimento do telômero); razão T/S (Razão telômero/*single gene*); CCI (Células do *cumulus* de oócitos imaturos); CCM (Células do *cumulus* de oócitos maduros); VG (oócitos imaturos no estágio de vesícula germinativa); MI (oócito imaturo em metáfase I). Em negrito: $p < 0,05$.

Figura 2: Gráfico *Box Plot* do comprimento do telômero nas CCI e nas CCM em relação aos grupos SOP e controle. SOP (Síndrome dos ovários policísticos); razão T/S (Razão telômero/*single gene*); CCI (Células do *cumulus* de oócitos imaturos); CCM (Células do *cumulus* de oócitos maduros).

Figura 3: Gráfico *Box Plot* do comprimento do telômero nos oócitos VG e MI em relação aos grupos SOP e controle. SOP (Síndrome dos ovários policísticos); razão T/S (Razão telômero/*single gene*); VG (oócitos imaturos no estágio de vesícula germinativa); MI (oócito imaturo em metáfase I).

Figura 4: Gráfico *Box Plot* do comprimento do telômero nas leucócitos em relação aos grupos SOP e controle. SOP (Síndrome dos ovários policísticos); razão T/S (Razão telômero/*single gene*).

A atividade da telomerase nas CCI foi maior no grupo SOP ($1,62 \pm 1,49$) quando comparado ao grupo controle ($0,30 \pm 0,42$) ($p=0,003$). Assim como, a atividade da telomerase nas CCM foi maior no grupo SOP ($1,39 \pm 1,63$) quando comparado ao grupo controle ($0,55 \pm 0,84$) ($p=0,022$). Em contrapartida, a atividade da telomerase nos oócitos VG e MI não foi diferente entre os grupos (Tabela 6) (Figura 5 e 6).

Tabela 6: Atividade da telomerase nas células do *cumulus* e nos oócitos imaturos das mulheres do grupo controle e SOP.

Variável	Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mediana	Q1	Q3	Min	Max	P-valor
Telomerase CCI (Unidades TPG)	Controle	17	0,3	0,42	0,17	0	0,48	0	1,61	0,003
	SOP	15	1,62	1,49	1,37	0,3	2,39	0	4,64	
Telomerase CCM (Unidades TPG)	Controle	29	0,55	0,84	0,34	0,1	0,55	0	4,05	0,022
	SOP	14	1,39	1,63	1,08	0,46	1,66	0	6,38	
Telomerase oócitos VG (Unidades TPG)	Controle	8	13,66	10,61	13,66	6,56	16,01	0,76	36,03	0,361
	SOP	9	10,56	11,01	8,11	2,4	10,88	1,71	34,5	
Telomerase oócitos MI (Unidades TPG)	Controle	5	7,04	6,41	5,46	2,36	9,9	0,82	16,68	0,144
	SOP	5	1,71	1,06	2,12	1,01	2,32	0,23	2,85	

*P-valor referente ao teste de Mann-Whitney. Q1 (Primeiro Quartil); Q3 (Terceiro Quartil); SOP (Síndrome dos Ovários Policísticos); Unidades TPG (Produto total gerado); CCI (Células do *cumulus* de oócitos imaturos); CCM (Células do *cumulus* de oócitos maduros); VG (oócitos imaturos no estágio de vesícula germinativa); MI (oócito imaturo em metáfase I). Em negrito: $p<0,05$.

Figura 5: Gráfico *Box Plot* da atividade da telomerase nas CCI e nas CCM em relação aos grupos SOP e controle. SOP (Síndrome dos ovários policísticos); Unidades TPG (Produto total gerado); CCI (Células do *cumulus* de oócitos imaturos); CCM (Células do *cumulus* de oócitos maduros).

Figura 6: Gráfico *Box Plot* da atividade da telomerase nos oócitos VG e MI em relação aos grupos SOP e controle. SOP (Síndrome dos ovários policísticos); Unidades TPG (Produto total gerado); VG (oócitos imaturos no estágio de vesícula germinativa); MI (oócito imaturo em metáfase I).

O grupo SOP apresentou valores mais altos de CFA ($26,02 \pm 14,62$ vs $13,68 \pm 6,65$) ($p < 0,001$), folículos ≥ 14 mm ($11,26 \pm 7,34$ vs $7,52 \pm 3,93$) ($p = 0,010$), oócitos coletados ($12,07 \pm 6,29$ vs $8,61 \pm 4,38$) ($p = 0,006$) e oócitos MII coletados ($9,12 \pm 5,00$ vs $6,97 \pm 3,78$) ($p = 0,044$), em relação ao grupo controle, respectivamente. Com relação as variáveis oócitos injetados, oócitos fertilizados e oócitos clivados não foram observadas diferenças entre os grupos (Tabela 7).

Tabela 7: Dados sobre CFA, folículos ≥ 14 mm, oócitos coletados, injetados, fertilizados e clivados das mulheres do grupo controle e SOP.

Variável	Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mediana	Q1	Q3	Min	Max	P-valor
CFA	Controle	66	13,68	6,65	12,5	9	18	4	32	<0,001
	SOP	43	26,02	14,62	25	16	29	3	69	
Folículos ≥ 14 mm	Controle	67	7,52	3,93	7	5	10	2	18	0,01
	SOP	42	11,26	7,34	10,5	5	15	2	38	
Oócitos coletados	Controle	67	8,61	4,38	9	5	11	1	20	0,006
	SOP	43	12,07	6,29	11	7	16	3	30	
Oócitos MII coletados	Controle	67	6,97	3,78	6	5	9	1	18	0,044
	SOP	43	9,12	5	8	5	12	2	20	
Oócitos injetados	Controle	63	6,97	3,4	6	5	9	0	18	0,156
	SOP	42	7,67	3,36	8	5	10	2	15	
Oócitos fertilizados	Controle	58	5,4	3,13	5	3	8	1	14	0,244
	SOP	42	6,19	3,21	6	4	9	1	15	
Oócitos clivados	Controle	58	5,12	3,04	4	3	8	1	13	0,254
	SOP	42	5,83	3,07	6	3	8	1	15	

*P-valor referente ao teste de Mann-Whitney. Q1 (Primeiro Quartil); Q3 (Terceiro Quartil); SOP (Síndrome dos Ovários Policísticos); CFA (Contagem de folículos antrais); MII (Oócitos maduros em metáfase II). Em negrito: $p < 0,05$.

No grupo SOP foram encontrados maiores quantidades de oócitos VG ($1,42 \pm 1,79$ vs $0,70 \pm 0,98$, $p < 0,039$), MI ($0,95 \pm 1,29$ vs $0,42 \pm 0,96$, $p = 0,009$) e MII ($9,14 \pm 4,97$ vs $7,00 \pm 3,81$, $p = 0,043$) em relação ao grupo controle, respectivamente. Com relação as variáveis oócitos degenerados e oócitos vitrificados não foram observadas diferenças entre os grupos (Tabela 8).

Tabela 8: Captação de oócitos após HOC nas mulheres dos grupos controle e SOP.

Variável	Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mediana	Q1	Q3	Min	Max	P-valor
Oócitos VG	Controle	67	0,7	0,98	0	0	1	0	4	0,039
	SOP	43	1,42	1,79	1	0	2	0	7	
Oócitos MI	Controle	67	0,42	0,96	0	0	0	0	6	0,009
	SOP	43	0,95	1,29	0	0	2	0	4	
Oócitos MII	Controle	67	7	3,81	6	5	9	1	18	0,043
	SOP	43	9,14	4,97	8	5	12	2	20	
Oócitos degenerados	Controle	67	0,51	0,96	0	0	1	0	5	0,87
	SOP	43	0,49	0,8	0	0	1	0	3	
Oócitos vitrificados	Controle	67	0,7	2,15	0	0	0	0	9	0,272
	SOP	43	1,63	3,58	0	0	0	0	14	

*P-valor referente ao teste de Mann-Whitney. Q1 (Primeiro Quartil); Q3 (Terceiro Quartil); HOC (Hiperestimulação ovariana controlada); SOP (Síndrome dos Ovários Policísticos); VG (oócito imaturo no estágio de vesícula germinativa); MI (oócito imaturo em metáfase I); MII (oócito maduro em metáfase II). Em negrito: $p < 0,05$.

Na avaliação das características morfológicas dos oócitos não foram observadas diferenças entre os grupos nas variáveis granulação homogênea, granulação central, ausência de vacúolos, presença de grandes vacúolos, presença de pequenos vacúolos, corpúsculo polar íntegro, corpúsculo polar fragmentado, corpúsculo polar bipartido e corpúsculo polar aumentado (Tabela 9).

Tabela 9: Características morfológicas oocitárias das mulheres do grupo controle e SOP.

Variável	Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mediana	Q1	Q3	Min	Max	P-valor
Granulação homogênea	Controle	62	4,11	3,4	4	1	6	0	12	0,104
	SOP	42	5,38	3,79	5	2	9	0	13	
Granulação central	Controle	62	2,66	3,02	1,5	0	5	0	10	0,689
	SOP	42	2,07	2,08	2	0	3	0	8	
Ausência de vacúolos	Controle	62	6,6	3,27	6	5	8	1	18	0,162
	SOP	42	7,52	3,3	8	5	9	2	15	
Presença de grandes vacúolos	Controle	62	0,1	0,35	0	0	0	0	2	0,532
	SOP	42	0,07	0,34	0	0	0	0	2	
Presença de pequenos vacúolos	Controle	62	0,05	0,22	0	0	0	0	1	0,999
	SOP	42	0,07	0,34	0	0	0	0	2	
CP íntegro	Controle	62	3,31	2,68	3	1	5	0	11	0,202
	SOP	42	3,98	2,76	4	1	6	0	9	
CP fragmentado	Controle	62	2,98	2,63	2	1	4	0	13	0,498
	SOP	42	3,36	2,86	3	1	5	0	11	
CP bipartido	Controle	62	0,44	0,82	0	0	1	0	3	0,233
	SOP	42	0,29	0,71	0	0	0	0	3	
CP aumentado	Controle	62	0,05	0,22	0	0	0	0	1	0,551
	SOP	42	0,05	0,31	0	0	0	0	2	
ZP normal	Controle	62	6,66	3,27	6	5	9	1	17	0,165
	SOP	42	7,62	3,38	8	4	10	2	15	
ZP aumentada	Controle	62	0,11	0,37	0	0	0	0	2	0,355
	SOP	42	0,05	0,22	0	0	0	0	1	
EP aumentado	Controle	62	0,73	1,38	0	0	1	0	7	0,103
	SOP	42	0,36	0,85	0	0	0	0	3	

*P-valor referente ao teste de Mann-Whitney. Q1(Primeiro Quartil); Q3 (Terceiro Quartil); SOP(Síndrome dos Ovários Policísticos); CP (Corpúsculo Polar); ZP (Zona Pelúcida); EP (Espaço Perivitelino). Em negrito: $p < 0,05$.

Na avaliação das características do dia 1 - checagem de fertilização (D1) não foram observadas diferenças entre os grupos nas variáveis D1 (1 corpúsculo polar), D1 (2 corpúsculos polares), D1 (3 corpúsculos polares), D1 (1 prónucleo), D1 (2 prónucleos), D1 (3 prónucleos), simétrico e assimétrico (Tabela 10).

Tabela 10: Características do desenvolvimento embrionário no dia 1 das mulheres do grupo controle e SOP.

Variável	Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mediana	Q1	Q3	Min	Max	P-valor
D1 (CP1)	Controle	58	0	0	0	0	0	0	0	0,248
	SOP	42	0,02	0,15	0	0	0			
D1 (CP2)	Controle	58	5,31	3,02	5	3	8	1	14	0,472
	SOP	42	5,81	3,27	5	3	9			
D1 (CP3)	Controle	58	0	0	0	0	0	0	0	0,999
	SOP	42	0	0	0	0	0			
D1 (PN1)	Controle	58	0,12	0,46	0	0	0	0	3	0,778
	SOP	42	0,07	0,26	0	0	0			
D1 (PN2)	Controle	58	5,24	3,09	5	3	8	0	14	0,4
	SOP	42	5,81	3,24	5	3	9			
D1 (PN3)	Controle	58	0,28	1,23	0	0	0	0	9	0,685
	SOP	42	0,12	0,4	0	0	0			
D1 (Simétrico)	Controle	58	5,29	3,03	5	3	8	1	14	0,469
	SOP	42	5,79	3,27	5	3	9			
D1 (Assimétrico)	Controle	58	0	0	0	0	0	0	0	0,248
	SOP	42	0,02	0,15	0	0	0			

*P-valor referente ao teste de Mann-Whitney. Q1(Primeiro Quartil); Q3 (Terceiro Quartil); SOP(Síndrome dos Ovários Policísticos); D1 (Dia 1 – Checagem de fertilização); CP1 (Um corpúsculo polar); CP2 (Dois corpúsculos polares); CP3 (Três corpúsculos polares); PN1 (Um prónucleo); PN2 (Dois prónucleos); PN3 (Três prónucleos). Em negrito: $p < 0,05$.

Em relação do estágio de qualidade e desenvolvimento embrionário no dia 2 de cultivo, o grupo SOP apresentou mais assimetria nos embriões ($2,52 \pm 2,02$) em relação ao grupo controle ($1,59 \pm 1,51$) ($p < 0,005$). Entretanto, não foram observadas diferenças entre os grupos nas variáveis D2 embriões total, D2 embriões TOP 4G1, D2 2 células, D2 3 células, D2 4 células, D2 5 células, D2 6 células, D2 8 células, D2 (simétrico), D2 GF0, D2 GF1 e D2 GF2 (Tabela 11).

Tabela 11: Características do estágio de desenvolvimento embrionário no dia 2 das mulheres do grupo controle e SOP.

Variável	Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mediana	Q1	Q3	Min	Max	P-valor
D2 embriões total	Controle	58	4,98	3,11	4	3	7	0	13	0,159
	SOP	42	5,83	3,07	6	3	8	1	15	
D2 embriões TOP 4G1	Controle	58	2,45	1,91	2	1	3	0	7	0,663
	SOP	42	2,45	2,37	2	1	4	0	9	
D2 2 células	Controle	58	0,66	1,04	0	0	1	0	5	0,771
	SOP	42	0,9	1,49	0	0	2	0	6	
D2 3 células	Controle	58	0,33	0,78	0	0	0	0	3	0,061
	SOP	42	0,48	0,67	0	0	1	0	2	
D2 4 células	Controle	58	2,84	2,08	3	1	4	0	8	0,385
	SOP	42	3,43	2,57	3	2	5	0	9	
D2 5 células	Controle	58	0,83	1,27	0	0	1	0	6	0,697
	SOP	42	0,76	1,16	0	0	1	0	4	
D2 6 células	Controle	58	0,29	0,53	0	0	1	0	2	0,802
	SOP	42	0,26	0,5	0	0	0	0	2	
D2 8 células	Controle	58	0,03	0,18	0	0	0	0	1	0,232
	SOP	42	0	0	0	0	0	0	0	
D2 (Simétrico)	Controle	58	3,38	2,64	3	1	4	0	10	0,877
	SOP	42	3,31	2,68	3	1	5	0	10	
D2 (Assimétrico)	Controle	58	1,59	1,51	1	1	2	0	7	0,005
	SOP	42	2,52	2,02	2	1	3	0	10	
D2 GF0	Controle	58	4,64	3,07	4	2	6	0	12	0,668
	SOP	42	5,07	3,47	4	2	8	0	15	
D2 GF1	Controle	58	0,26	0,69	0	0	0	0	3	0,091
	SOP	42	0,71	1,45	0	0	1	0	6	
D2 GF2	Controle	58	0,03	0,26	0	0	0	0	2	0,829
	SOP	42	0,05	0,31	0	0	0	0	2	

*P-valor referente ao teste de Mann-Whitney. Q1(Primeiro Quartil); Q3 (Terceiro Quartil); SOP(Síndrome dos Ovários Policísticos); D2 (Dia 2); TOP 4G1 (Embriões grau 1 com boa classificação quanto à quantidade de 4 células, < 10% de fragmentação, células de tamanhos iguais e sem multinucleação); GF0 (Grau de fragmentação leve <10%); GF1 (Grau de fragmentação moderada 10-25%); GF2 (Grau de fragmentação grave >25%). Em negrito: $p < 0,05$.

Na avaliação das características do estágio de desenvolvimento embrionário no dia 3 não foram observadas diferenças entre os grupos nas variáveis D3 embriões total, D3 embriões TOP 8G1, D3 4 células, D3 5 células, D3 6 células, D3 8 células, D3 10 células, D3 12 células, D3 (simétrico), D3 (assimétrico), D3 GF0, D3 GF1 e D3 GF2 (Tabela 12).

Tabela 12: Características do estágio de desenvolvimento embrionário no dia 3 das mulheres do grupo controle e SOP.

Variável	Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mediana	Q1	Q3	Min	Max	P-valor
D3 embriões total	Controle	36	5,81	2,62	5	4	7,5	1	12	0,284
	SOP	32	5,25	3,09	4	2,5	7	1	14	
D3 embriões TOP 8G1	Controle	36	2,58	1,98	2	1	4	0	7	0,444
	SOP	32	2,47	2,53	2	1	3	0	9	
D3 4 células	Controle	36	0,28	0,7	0	0	0	0	3	0,17
	SOP	32	0,06	0,25	0	0	0	0	1	
D3 5 células	Controle	36	0,19	0,4	0	0	0	0	1	0,99
	SOP	32	0,25	0,62	0	0	0	0	3	
D3 6 células	Controle	36	0,72	0,94	0,5	0	1	0	4	0,851
	SOP	32	0,81	1,03	0	0	1,5	0	3	
D3 8 células	Controle	36	3,92	2,3	3	2	6	1	8	0,731
	SOP	32	3,72	2,49	3	2	4,5	0	10	
D3 10 células	Controle	36	0,56	0,61	0,5	0	1	0	2	0,129
	SOP	32	0,41	0,76	0	0	0,5	0	2	
D3 12 células	Controle	36	0,14	0,54	0	0	0	0	3	0,101
	SOP	32	0	0	0	0	0	0	0	
D3 (Simétrico)	Controle	36	3,44	2,24	3	1,5	5	0	8	0,083
	SOP	32	2,69	2,64	2	1	4	0	10	
D3 (Assimétrico)	Controle	36	2,36	1,57	2,5	1	3,5	0	6	0,741
	SOP	32	2,53	1,8	2	1	4	0	6	
D3 GF0	Controle	36	5,19	2,62	5	3	7	1	10	0,433
	SOP	32	4,84	3,31	4	2	7	0	13	
D3 GF1	Controle	36	0,56	0,91	0	0	1	0	3	0,158
	SOP	32	0,38	0,91	0	0	0	0	3	
D3 GF2	Controle	36	0	0	0	0	0	0	0	0,302
	SOP	32	0,03	0,18	0	0	0	0	1	

*P-valor referente ao teste de Mann-Whitney. Q1(Primeiro Quartil); Q3 (Terceiro Quartil); SOP(Síndrome dos Ovários Policísticos); D3 (Dia 3); TOP 8G1 (Embriões grau 1 com boa classificação quanto à quantidade de 8 células, < 10% de fragmentação, células de tamanhos iguais e sem multinucleação); GF0 (Grau de fragmentação leve <10%); GF1 (Grau de fragmentação moderada 10-25%); GF2 (Grau de fragmentação grave >25%). Em negrito: $p < 0,05$.

Nos dias 2 e 3 do desenvolvimento embrionário foi avaliada a presença de embriões considerados excelente ou *top*, classificados como 4G1 e 8G1, porém não foi observada diferença entre os grupos SOP e controle (Figura 7).

Figura 7: Box Plot dos embriões 4G1 e 8G1 em relação aos grupos SOP e controle. SOP (Síndrome dos ovários policísticos); 4G1 (Embriões de grau 1 com boa classificação quanto à quantidade de 4 células, menor que 10% de fragmentação, células de tamanhos iguais e sem multinucleação); 8G1 (Embriões grau 1 com boa classificação quanto à quantidade de 8 células, <10% de fragmentação, células de tamanhos iguais e sem multinucleação).

Na avaliação das características do estágio de desenvolvimento embrionário no dia 5/6 não foram observadas diferenças entre os grupos nas variáveis total de blastocistos, blastocistos 3.1.1., blastocistos 3.2.1., blastocistos 3.2.2. e blastocistos 4.1.1. (Tabela 13).

Tabela 13: Características do estágio de desenvolvimento embrionário no dia 5/6 das mulheres do grupo controle e SOP.

Variável	Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mediana	Q1	Q3	Min	Max	P-valor
Total blastocistos	Controle	8	3,25	2,76	2	2	4	1	9	0,204
	SOP	4	5	3,56	4	2,5	7,5	2	10	
Blastocisto 3.1.1.	Controle	8	1,5	1,69	1,5	0	2	0	5	0,385
	SOP	4	2,75	2,06	2,5	1	4,5	1	5	
Blastocisto 3.2.1.	Controle	8	0,75	1,39	0	0	1	0	4	0,774
	SOP	4	1	1,41	0,5	0	2	0	3	
Blastocisto 3.2.2.	Controle	8	0,63	0,92	0	0	1,5	0	2	0,504
	SOP	4	1,25	1,5	1	0	2,5	0	3	
Blastocisto 4.1.1.	Controle	8	0,38	0,52	0	0	1	0	1	0,215
	SOP	4	0	0	0	0	0	0	0	

*P-valor referente ao teste de Mann-Whitney. Q1(Primeiro Quartil); Q3 (Terceiro Quartil); SOP(Síndrome dos Ovários Policísticos); 3.1.1. (Classificação de blastocisto expandido, com massa celular interna compactada e firmemente aderidas e trofoectoderma com muitas células formando epitélio coeso); 3.2.1. (Classificação de blastocisto expandido, com massa celular interna com algumas células vagamente agrupadas e trofoectoderma com muitas células formando epitélio coeso); 3.2.2. (Classificação de blastocisto expandido com massa celular interna com algumas células vagamente agrupadas e trofoectoderma com algumas células formando um epitélio solto); 4.1.1. (Classificação de blastocisto em *hatched/hatching*, com massa celular interna compactada e firmemente aderidas e trofoectoderma com muitas células formando epitélio coeso). Em negrito: $p < 0,05$.

No dia 5/6 do desenvolvimento embrionário foi avaliada a presença de blastocistos considerados excelente ou *top*, classificados como 3.1.1. e 4.1.1., porém não foram encontradas diferença entre os grupos (Figura 8).

Figura 8: Gráfico *Box Plot* dos blastocistos 3.1.1. e 4.1.1. em relação aos grupos SOP e controle. SOP (Síndrome dos ovários policísticos); 3.1.1. (Classificação de blastocisto expandido, com massa celular interna compactada e firmemente aderidas e trofoectoderma com muitas células formando epitélio coeso); 4.1.1. (Classificação de blastocisto em *hatched/hatching*, com massa celular interna compactada e firmemente aderidas e trofoectoderma com muitas células formando epitélio coeso).

Através da distribuição das frequências das variáveis qualitativas entres os grupos controle e SOP com relação à transferência embrionária, foi observado que a TEF foi mais frequente no grupo controle (70,15%) do que no grupo SOP (46,51%) ($p=0,017$) (Tabela 14).

Tabela 14: Distribuição das frequências de transferências de embriões considerando um ciclo de TEF e um ciclo de TEC entre os grupos controle e SOP.

Variável		Controle	SOP	P-valor
TEF	0	20 (29,85)	23 (53,49)	0,017
	1	47 (70,15)	20 (46,51)	
TEC	0	40 (59,70)	18 (41,86)	0,080
	1	27 (40,30)	25 (58,14)	

Teste de exato de Fisher. SOP (Síndrome dos Ovários Policísticos); TEF (Transferência de embriões à fresco); TEC (Transferência de embriões congelados). Em negrito: $p < 0,05$.

Através da distribuição das frequências das variáveis qualitativas entres os grupos controle e SOP com relação à TEF, não foram encontradas diferenças entre os grupos nas variáveis TEF gravidez positiva, TEF ectópica, TEF aborto e TEF em andamento (Tabela 15).

Tabela 15: Distribuição das frequências das taxas de gravidez por TEF entre os grupos controle e SOP.

Variável		Controle	SOP	P-valor
TEF gravidez positiva	0	46 (68,66)	32 (74,42)	0,668
	1	21 (31,34)	11 (25,58)	
TEF ectópica	0	67 (100)	42 (97,67)	0,391
	1	0	1 (2,33)	
TEF aborto	0	64 (95,52)	40 (93,02)	0,677
	1	3 (4,48)	3 (6,98)	
TEF em andamento	0	49 (73,13)	36 (83,72)	0,247
	1	18 (26,87)	7 (16,28)	

Teste de exato de Fisher. SOP (Síndrome dos Ovários Policísticos); TEF (Transferência de embriões à fresco). Em negrito: $p < 0,05$.

Através da distribuição das frequências das variáveis qualitativas entres os grupos controle e SOP com relação à TEC, não foram encontradas diferenças entre os grupos nas variáveis qualitativas TEC gravidez positiva, TEC ectópica, TEC aborto e TEC em andamento (Tabela 16).

Tabela 16: Distribuição das frequências das taxas de gravidez por TEC entre os grupos controle e SOP.

Variável		Controle N (%)	SOP N (%)	P-valor
TEC gravidez positiva	0	59 (88,06)	34 (79,07)	0,280
	1	8 (11,94)	9 (20,93)	
TEC ectópica	0	67 (100)	43 (100)	0,999
	1			
TEC aborto	0	65 (97,01)	42 (97,67)	0,999
	1	2 (2,99)	1 (2,33)	
TEC em andamento	0	61 (91,04)	35 (81,40)	0,154
	1	6 (8,96)	8 (18,60)	

Teste de exato de Fisher. SOP (Síndrome dos Ovários Policísticos); TEC (Transferência de embriões congelados). Em negrito: $p < 0,05$.

Não foram encontradas diferenças entre os grupos na taxa de gravidez acumulativa, representada pela variável gravidez positiva total (TEF e TEC), ectópica total (TEF e TEC), aborto total (TEF e TEC), gravidez em andamento total (TEF e TEC), gravidez negativa total (TEF e TEC) (Tabela 17).

Tabela 17: Distribuição das frequências das taxas de gravidez, considerando um ciclo de TEF e um ciclo de TEC, entre os grupos controle e SOP.

Variável		Controle	SOP	P-valor
Gravidez positiva total	0	39 (58,21)	23 (53,49)	0,695
	1	28 (41,79)	20 (46,51)	
Ectópica total	0	67 (100)	42 (97,67)	0,391
	1	0 (0)	1 (2,33)	
Aborto total	0	62 (92,54)	39 (90,70)	0,735
	1	5 (7,46)	4 (9,30)	
Gravidez em andamento total	0	43 (64,18)	28 (65,12)	0,999
	1	24 (35,82)	15 (34,88)	
Gravidez negativa total	0	28 (41,79)	14 (32,56)	0,422
	1	39 (58,21)	29 (67,44)	

Teste de exato de Fisher. SOP (Síndrome dos Ovários Policísticos); TEF (Transferência de embriões à fresco); TEC (Transferência de embriões congelados). Em negrito: $p < 0,05$.

Em relação às características dos nascidos vivos, não foram encontradas diferenças entre os grupos nas variáveis sexo feminino, sexo masculino, peso, altura e idade gestacional (Tabela 18).

Tabela 18: Características dos nascidos vivos das mulheres do grupo controle e SOP.

Variável	Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mediana	Q1	Q3	Min	Max	P-valor
Sexo feminino	Controle	18	0,56	0,51	1	0	1	0	1	0,979
	SOP	11	0,55	0,52	1	0	1	0	1	
Sexo Masculino	Controle	18	0,72	0,46	1	0	1	0	1	0,578
	SOP	11	0,64	0,67	1	0	1	0	2	
Peso (g)	Controle	18	2829,33	653,59	2955	2435	3320	1555	4035	0,964
	SOP	11	2702,64	919,85	3060	1906	3390	1200	3890	
Altura (cm)	Controle	18	46,94	3,07	47	45	49	40,75	52	0,982
	SOP	11	46,73	3,95	48	43	49	39	52,5	
Idade gestacional (semanas)	Controle	18	33,25	2,18	34,14	34,86	28,57	28,57	35,71	0,805
	SOP	11	33,58	5,6	33,57	33	36,14	24,57	45,43	

*P-valor referente ao teste de Mann-Whitney. Q1 (Primeiro Quartil); Q3 (Terceiro Quartil); SOP (Síndrome dos Ovários Policísticos). Em negrito: $p < 0,05$.

No modelo de regressão linear múltipla para o comprimento do telômero nos leucócitos foi encontrada uma diferença entre os grupos SOP e controle ($\beta=-0,57854$)($p=0,001$). As variáveis idade, IMC, insulina, proteína c-reativa, homocisteína, testosterona, FAI e androstenediona não influenciaram no telômero dessas células (Tabela 19).

Tabela 19: Modelo de regressão linear múltipla ajustado para comprimento do telômero dos leucócitos.

Variável	Estimativa do Parâmetro	Erro Padrão	Estatística t	P-valor
Grupo	-0,57854	0,16584	-3,49	0,001
Idade	-0,00650	0,01819	-0,36	0,722
IMC	0,01687	0,01900	0,89	0,378
Insulina	0,00603	0,01235	0,49	0,627
Proteína c-reativa	-0,17632	0,19173	-0,92	0,361
Homocisteína	-0,00497	0,31970	-0,16	0,877
Testosterona	0,00083	0,00112	0,74	0,461
FAI	-0,02591	0,01920	-1,33	0,189
Androstenediona	0,00021	0,00111	0,19	0,849

Modelo de regressão linear múltipla. SOP (Síndrome dos Ovários Policísticos); IMC (Índice de massa corporal); FAI (Índice de androgênio livre). Em negrito: $p<0,05$.

Através da estimativa do parâmetro do modelo de regressão linear múltipla ajustada por grupo, IMC, insulina, proteína c-reativa, homocisteína, testosterona, FAI, androstenediona e idade, foi demonstrado que a idade neste estudo parece não influenciar no comprimento do telômero nos leucócitos (Figura 9).

Figura 9: Gráfico de dispersão do comprimento do telômero nos leucócitos em relação com a idade nos grupos SOP e controle. SOP (Síndrome dos ovários policísticos); razão T/S (Razão telômero/single gene).

O comprimento do telômero nas CCI (Tabela 20) e nas CCM (Tabela 21) não sofreu influência de nenhuma variável analisada: grupo, idade, IMC, insulina, proteína c-reativa, homocisteína, testosterona, FAI e androstenediona.

Tabela 20: Modelo de regressão linear múltipla ajustado para o comprimento do telômero das CCI.

Variável	Estimativa do Parâmetro	Erro Padrão	Estatística t	P-valor
Grupo	-0,18106	0,15314	-1,18	0,250
Idade	-0,00889	0,01890	-0,47	0,643
IMC	-0,01547	0,02311	-0,67	0,510
Insulina	-0,00841	0,01530	-0,55	0,588
Proteína c-reativa	-0,13607	0,23062	-0,59	0,561
Homocisteína	-0,03497	0,04707	-0,74	0,465
Testosterona	0,00052	0,00117	0,44	0,664
FAI	0,04630	0,03542	1,31	0,205
Androstenediona	0,00166	0,00098	1,70	0,104

Modelo de regressão linear múltipla. SOP (Síndrome dos Ovários Policísticos); IMC (Índice de massa corporal); FAI (Índice de androgênio livre). Em negrito: $p < 0,05$.

Tabela 21: Modelo de regressão linear múltipla ajustado para o comprimento do telômero das CCM.

Variável	Estimativa do Parâmetro	Erro Padrão	Estatística t	P-valor
Grupo	-0,25460	0,16638	-1,53	0,133
Idade	-0,02067	0,01726	-1,20	0,238
IMC	0,00562	0,02265	0,25	0,805
Insulina	0,00071	0,01353	0,05	0,959
Proteína c-reativa	-0,09542	0,21379	-0,45	0,658
Homocisteína	-0,06310	0,04704	-1,34	0,187
Testosterona	0,00024	0,00101	0,24	0,810
FAI	0,00992	0,03245	0,31	0,761
Androstenediona	-0,00038	0,00088	-0,43	0,670

Modelo de regressão linear múltipla. SOP (Síndrome dos Ovários Policísticos); IMC (Índice de massa corporal); FAI (Índice de androgênio livre). Em negrito: $p < 0,05$.

O comprimento do telômero nos oócitos imaturos VG não sofreu influência de nenhuma variável analisada: grupo, idade, IMC, insulina, proteína c-reativa, homocisteína, testosterona, FAI e androstenediona (Tabela 22).

Tabela 22: Modelo de regressão linear múltipla ajustado para o comprimento do telômero dos oócitos imaturos VG.

Variável	Estimativa do Parâmetro	Erro Padrão	Estatística t	P-valor
Grupo	0,23742	0,18634	1,27	0,235
Idade	0,01205	0,02196	0,55	0,597
IMC	0,04646	0,03222	1,44	0,183
Insulina	-0,00136	0,01676	-0,08	0,937
Proteína c-reativa	-0,34766	0,21433	-1,62	0,139
Homocisteína	-0,02629	0,04493	-0,59	0,573
Testosterona	0,00047	0,00160	0,29	0,777
FAI	-0,06954	0,07381	-0,94	0,371
Androstenediona	0,00068	0,00084	0,81	0,441

Modelo de regressão linear múltipla. SOP (Síndrome dos Ovários Policísticos); IMC (Índice de massa corporal); FAI (Índice de androgênio livre). Em negrito: $p < 0,05$.

Através da regressão linear múltipla foi encontrada influência negativa da insulina com a atividade da telomerase nas CCI ($\beta = -0,13018$) ($p = 0,006$). E considerando este modelo, foi encontrada uma diferença entre os grupos SOP e controle ($\beta = 1,69565$) ($p = 0,001$) e uma influência positiva da androstenediona ($\beta = 0,00789$) ($p = 0,002$) com a atividade da telomerase desta mesma linhagem celular. Não foi encontrada influência das variáveis idade, IMC, proteína c-reativa, homocisteína, testosterona e FAI (Tabela 23).

Tabela 23: Modelo de regressão linear múltipla ajustado para a atividade da telomerase das CCI.

Variável	Estimativa do Parâmetro	Erro Padrão	Estatística t	P-valor
Grupo	1,69565	0,39636	4,28	0,001
Idade	0,04994	0,04263	1,17	0,260
IMC	0,10197	0,05732	1,78	0,096
Insulina	-0,13018	0,04067	-3,20	0,006
Proteína c-reativa	-0,84616	0,68913	-1,23	0,238
Homocisteína	0,26602	0,13238	2,01	0,063
Testosterona	-0,00042	0,00317	-0,13	0,897
FAI	-0,08258	0,12603	-0,66	0,522
Androstenediona	0,00789	0,00214	3,69	0,002

Modelo de regressão linear múltipla. SOP (Síndrome dos Ovários Policísticos); IMC (Índice de massa corporal); FAI (Índice de androgênio livre). Em negrito: $p < 0,05$.

A atividade da telomerase nas CCM apresentou somente uma influência positiva do FAI ($\beta=0,25168$)($p=0,051$). As variáveis grupo, idade, IMC, insulina, proteína c-reativa, homocisteína, testosterona e androstenediona não influenciaram nesta linhagem (Tabela 24).

Tabela 24: Modelo de regressão linear múltipla ajustado para a atividade da telomerase das CCM.

Variável	Estimativa do Parâmetro	Erro Padrão	Estatística t	P-valor
Grupo	1,14770	0,58442	1,96	0,061
Idade	-0,07873	0,05731	-1,37	0,182
IMC	-0,10392	0,07357	-1,41	0,171
Insulina	-0,03243	0,04369	-0,74	0,465
Proteína c-reativa	0,26142	0,74650	0,35	0,729
Homocisteína	0,18397	0,16213	1,13	0,268
Testosterona	-0,00300	0,00375	-0,80	0,433
FAI	0,25168	0,12255	2,05	0,051
Androstenediona	-0,00106	0,00290	-0,37	0,718

Modelo de regressão linear múltipla. SOP (Síndrome dos Ovários Policísticos); IMC (Índice de massa corporal); FAI (Índice de androgênio livre). Em negrito: $p<0,05$.

Através da análise de correlação de Spearman foi observado no comprimento do telômero dos leucócitos uma correlação positiva com o comprimento do telômero das CCI no grupo controle ($r=0,57616$)($p=0,006$) e no grupo SOP ($r=0,61176$)($p=0,012$). E o comprimento do telômero nesta mesma linhagem celular apresentou correlação positiva com o comprimento do telômero das CCM no grupo controle ($r=0,45437$)($p=0,002$) e no grupo SOP ($r=0,7138$)($p=0,0004$) (Tabela 25).

Tabela 25: Correlação do comprimento do telômero nos leucócitos.

Variável	Controle		SOP	
	<i>r</i>	P-valor	<i>r</i>	P-valor
Telomerase CCI	0,33998	0,182	-0,3193	0,312
Telomerase CCM	-0,28539	0,149	-0,13927	0,683
Telomerase VG	-0,11905	0,779	-0,09524	0,823
Telomerase MI	-0,3000	0,624	-0,8000	0,200
TEL CCI	0,57616	0,006	0,61176	0,012
TEL CCM	0,45437	0,002	0,7138	0,0004
TEL VG	-0,14345	0,6400	-0,2395	0,535
TEL MI	0,4000	0,6000	-0,48333	0,188

Coefficiente de correlação de Spearman. SOP (Síndrome dos Ovários Policísticos); TEL (comprimento do telômero); CCI (Células do *cumulus* de oócitos imaturos); CCM (Células do *cumulus* de oócitos maduros); VG (oócito imaturo no estágio de vesícula germinativa); MI (oócito imaturo em metáfase I). Em negrito: $p<0,05$.

O comprimento do telômero das CCI teve correlação positiva com o comprimento do telômero dos leucócitos no grupo controle ($r=0,57616$)($p=0,006$) e no grupo SOP ($r=0,61176$)($p=0,012$). E o comprimento do telômero nesta mesma linhagem celular teve correlação positiva com o comprimento do telômero das CCM no grupo controle ($r=0,64837$)($p=0,001$) e no grupo SOP ($r=0,8652$)($p<0,0001$) (Tabela 26).

Tabela 26: Correlação do comprimento do telômero das CCI.

Variável	Controle		SOP	
	<i>r</i>	P-valor	<i>r</i>	P-valor
Telomerase CCI	0,51309	0,051	-0,21319	0,464
Telomerase CCM	0,36515	0,22	0,49451	0,086
Telomerase VG	-0,42857	0,337	0,35714	0,432
Telomerase MI	0,6000	0,4000	0,4000	0,600
TEL leucócitos	0,57616	0,006	0,61176	0,012
TEL CCM	0,64837	0,001	0,8652	<0,0001
TEL VG	-0,47699	0,194	-0,30952	0,456
TEL MI	0,0000	1,000	-0,02857	0,957

Coefficiente de correlação de Spearman. SOP (Síndrome dos Ovários Policísticos); TEL (comprimento do telômero); CCI (Células do *cumulus* de oócitos imaturos); CCM (Células do *cumulus* de oócitos maduros); VG (oócito imaturo no estágio de vesícula germinativa); MI (oócito imaturo em metáfase I). Em negrito: $p<0,05$.

O comprimento do telômero das CCM teve correlação positiva com o comprimento do telômero dos leucócitos no grupo controle ($r=0,45437$)($p=0,002$) e no grupo SOP ($r=0,7138$)($p=0,0004$). E o comprimento do telômero nesta mesma linhagem celular teve correlação positiva com o comprimento do telômero das CCI no grupo controle ($r=0,64837$)($p=0,001$) e no grupo SOP ($r=0,8652$)($p<0,0001$). Entretanto, o comprimento do telômero das CCM teve correlação negativa com o comprimento do telômero dos oócitos VG no grupo controle ($r=-0,88333$)($p=0,002$) (Tabela 27).

Tabela 27: Correlação do comprimento do telômero das CCM.

Variável	Controle		SOP	
	<i>r</i>	P-valor	<i>r</i>	P-valor
Telomerase CCI	0,26553	0,303	-0,29848	0,280
Telomerase CCM	-0,30296	0,110	0,53685	0,048
Telomerase VG	-0,57143	0,180	0,08571	0,872
Telomerase MI	-0,30000	0,624	0,4000	0,600
TEL leucócitos	0,45437	0,002	0,7138	0,0004
TEL CCI	0,64837	0,001	0,8652	<0,0001
TEL VG	-0,88333	0,002	-0,52381	0,183
TEL MI	-0,8000	0,200	-0,42857	0,397

Coefficiente de correlação de Spearman. SOP (Síndrome dos Ovários Policísticos); TEL (comprimento do telômero); CCI (Células do *cumulus* de oócitos imaturos); CCM (Células do *cumulus* de oócitos maduros); VG (oócito imaturo no estágio de vesícula germinativa); MI (oócito imaturo em metáfase I). Em negrito: $p<0,05$.

O comprimento do telômero dos oócitos VG teve correlação negativa com o comprimento do telômero das CCM no grupo controle ($r=-0,8833$)($p=0,0020$) (Tabela 28).

Tabela 28: Correlação do comprimento do telômero nos oócitos imaturos VG.

Variável	Controle		SOP	
	<i>r</i>	P-valor	<i>r</i>	P-valor
Telomerase CCI	0,5188	0,1520	0,3929	0,3830
Telomerase CCM	0,2052	0,7410	-0,5357	0,2150
Telomerase VG	0,6957	0,1250	-0,5000	0,3910
TEL leucócitos	-0,1435	0,6400	-0,2395	0,5350
TEL CCI	-0,4770	0,1940	-0,3095	0,4560
TEL CCM	-0,8833	0,0020	-0,5238	0,1830

Coefficiente de correlação de Spearman. SOP (Síndrome dos Ovários Policísticos); TEL (comprimento do telômero); CCI (Células do *cumulus* de oócitos imaturos); CCM (Células do *cumulus* de oócitos maduros); VG (oócito imaturo no estágio de vesícula germinativa). Em negrito: $p<0,05$.

O comprimento do telômero dos oócitos MI teve correlação negativa com a atividade da telomerase das CCM no grupo controle ($r=-1,000$)($p<0,0001$) (Tabela 29).

Tabela 29: Correlação do comprimento do telômero nos oócitos imaturos MI.

Variável	Controle		SOP	
	<i>r</i>	P-valor	<i>r</i>	P-valor
Telomerase CCM	-1,000	<0,0001	0,25714	0,623
TEL leucócitos	0,400	0,600	-0,48333	0,188
TEL CCI	0,000	1,000	-0,02857	0,957
TEL CCM	-0,800	0,200	-0,42857	0,397

Coefficiente de correlação de Spearman. SOP (Síndrome dos Ovários Policísticos); TEL (comprimento do telômero); CCI (Células do *cumulus* de oócitos imaturos); CCM (Células do *cumulus* de oócitos maduros). Em negrito: $p<0,05$.

A atividade da telomerase e o comprimento do telômero nas CCI apresentaram correlação positiva no grupo controle ($r=0,51309$)($p=0,051$) (Tabela 30).

Tabela 30: Correlação da atividade da telomerase nas CCI.

Variável	Controle		SOP	
	<i>r</i>	P-valor	<i>r</i>	P-valor
Telomerase CCM	0,42771	0,291	-0,04736	0,872
Telomerase VG	0,02899	0,957	-0,08571	0,872
Telomerase MI	0,22361	0,718	0,8000	0,200
TEL leucócitos	0,33998	0,182	-0,3193	0,312
TEL CCI	0,51309	0,051	-0,21319	0,464
TEL CCM	0,26553	0,303	-0,29848	0,28
TEL VG	0,51883	0,152	0,39286	0,383

Coefficiente de correlação de Spearman. SOP (Síndrome dos Ovários Policísticos); TEL (comprimento do telômero); CCI (Células do *cumulus* de oócitos imaturos); CCM (Células do *cumulus* de oócitos maduros); VG (oócito imaturo no estágio de vesícula germinativa); MI (oócito imaturo em metáfase I). Em negrito: $p<0,05$.

Com relação as CCM foi observada uma correlação positiva entre atividade da telomerase com o comprimento do telômero no grupo SOP ($r=0,53685$)($p=0,048$) e correlação negativa com o comprimento do telômero dos oócitos MI no grupo controle ($r=-1,0000$)($p<0,0001$) (Tabela 31).

Tabela 31: Correlação da atividade da telomerase nas CCM

Variável	Controle		SOP	
	<i>r</i>	P-valor	<i>r</i>	P-valor
Telomerase CCI	0,42771	0,291	-0,04736	0,872
Telomerase VG	0,46382	0,354	-0,25714	0,623
TEL leucócitos	-0,28539	0,149	-0,13927	0,683
TEL CCI	0,36515	0,22	0,49451	0,086
TEL CCM	-0,30296	0,11	0,53685	0,048
TEL VG	0,2052	0,741	-0,53571	0,215
TEL MI	-1,0000	<0,0001	0,25714	0,623

Coeficiente de correlação de Spearman. SOP (Síndrome dos Ovários Policísticos); TEL (comprimento do telômero); CCI (Células do *cumulus* de oócitos imaturos); CCM (Células do *cumulus* de oócitos maduros); VG (oócito imaturo no estágio de vesícula germinativa); MI (oócito imaturo em metáfase I). Em negrito: $p<0,05$.

A atividade da telomerase dos oócitos VG não apresentou nenhuma correlação com as variáveis analisadas (Tabela 32).

Tabela 32: Correlação da atividade da telomerase nas oócitos imaturos VG.

Variável	Controle		SOP	
	<i>r</i>	P-valor	<i>r</i>	P-valor
Telomerase CCI	0,02899	0,957	-0,08571	0,872
Telomerase CCM	0,46382	0,354	-0,25714	0,623
TEL leucócitos	-0,11905	0,779	-0,09524	0,823
TEL CCI	-0,42857	0,337	0,35714	0,432
TEL CCM	-0,57143	0,18	0,08571	0,872
TEL VG	0,69573	0,125	-0,5000	0,391

Coeficiente de correlação de Spearman. SOP (Síndrome dos Ovários Policísticos); TEL (comprimento do telômero); CCI (Células do *cumulus* de oócitos imaturos); CCM (Células do *cumulus* de oócitos maduros); VG (oócito imaturo no estágio de vesícula germinativa). Em negrito: $p<0,05$.

A atividade da telomerase dos oócitos MI não apresentou nenhuma correlação com as variáveis analisadas (Tabela 33).

Tabela 33: Correlação da atividade da telomerase nos oócitos imaturos MI.

Variável	Controle		SOP	
	<i>r</i>	P-valor	<i>r</i>	P-valor
Telomerase CCI	0,22361	0,718	0,800	0,200
TEL leucócitos	-0,3000	0,6240	-0,800	0,200
TEL CCI	0,6000	0,4000	0,400	0,600
TEL CCM	-0,3000	0,6240	0,400	0,600

Coeficiente de correlação de Spearman. SOP (Síndrome dos Ovários Policísticos); TEL (comprimento do telômero); CCI (Células do *cumulus* de oócitos imaturos); CCM (Células do *cumulus* de oócitos maduros). Em negrito: $p < 0,05$.

5 Discussão

No presente estudo, o comprimento do telômero nas CCI e nas CCM não diferiu entre os grupos SOP e controle. No entanto, a atividade da telomerase nas CCI ($p=0,003$) e nas CCM ($p=0,022$) foi maior no grupo SOP. Com relação aos leucócitos, foi observado um reduzido comprimento do telômero no grupo SOP ($p=0,025$). O comprimento do telômero e a atividade da telomerase nos oócitos imaturos VG e MI não diferiram entre os grupos. Uma correlação positiva entre a atividade da telomerase e o comprimento do telômero nas CCI foi observada no grupo controle ($p=0,051$). A SOP também apresentou uma correlação positiva entre a atividade da telomerase e o comprimento do telômero, porém nas CCM ($p=0,048$). Adicionalmente, foi encontrada uma correlação positiva entre o comprimento do telômero das células (leucócitos, CCI e CCM) em ambos os grupos.

No contexto da análise do comprimento do telômero em mulheres com SOP, pode-se destacar na literatura vários estudos, porém estes são contraditórios. Desde um encurtamento no comprimento do telômero nos leucócitos de mulheres na população chinesa (LI et al., 2014), assim como sem diferença no comprimento do telômero; porém, com uma correlação negativa dos biomarcadores inflamatórios, proteína c-reativa e homocisteína, com o comprimento do telômero (PEDROSO et al., 2015). Recentemente, Wang et al. (2017) relataram que o comprimento do telômero nos leucócitos na SOP foi maior em relação ao grupo controle. Os autores também observaram reduzida expressão do gene *TERRA* (*Telomeric repeat-containing RNA*) no grupo SOP. Além disso, a testosterona foi positivamente correlacionada com o comprimento do telômero e negativamente correlacionada com os níveis de *TERRA* no grupo SOP (WANG et al., 2017). O gene *TERRA*, um longo RNA não codificador, é conhecido por promover o encurtamento do telômero por inibir a atividade da telomerase *in vitro* pela ligação no componente de RNA (TERC) (SCHOEFTNER and BLASCO, 2008) e na porção enzimática transcriptase reversa (TERT) da telomerase (REDON et al., 2010).

O encurtamento do telômero nos leucócitos encontrado nas mulheres com SOP no presente estudo pode ser explicado pelo fato desta síndrome ser considerada uma doença multifatorial, com a presença de várias alterações metabólicas, como a dislipidemia, obesidade, hipertensão, RI, dentre outras, (GOODARZI et al., 2005) que podem contribuir para uma perda telomérica progressiva. Neste estudo, as mulheres do grupo SOP apresentaram maior IMC, hiperinsulinemia e aumento do marcador inflamatório proteína c-reativa, que retrata um estado de estresse oxidativo. Esta condição ocorre quando EROs, que são intermediários de um metabolismo de oxigênio normal, são produzidas mais rapidamente do que os antioxidantes endógenos (DONA et al., 2012; MURRI et al., 2013). Autores já

evidenciaram que o estresse oxidativo presente na SOP tem correlação positiva com o IMC, nível de insulina e pressão arterial (SABUNCU et al., 2001). Complementar a um aumento do estresse oxidativo, as mulheres com SOP também têm antioxidante total reduzido (FENKCI et al., 2003). No contexto do estresse oxidativo e da RI, tem sido proposto que a geração de EROs por células mononucleares em resposta a hiperglicemia é maior nas mulheres com SOP comparada com mulheres saudáveis (DULEBA and DOKRAS, 2012). Na população geral, não fazendo distinção de gênero, raça ou etnia, a HAS, a RI e o estresse oxidativo foram associados ao encurtamento do comprimento do telômero nos leucócitos (GARDNER et al., 2005). Em contrapartida, na população do presente estudo, não foi observado influência dessas características no comprimento do telômero; diferentemente do nosso estudo prévio onde esta correlação foi evidenciada (PEDROSO et al., 2015). Uma hipótese para esses dados discordantes poderia ser atribuída ao tamanho da amostra. Outra suposição seria a influência da HOC, com repercussão nos níveis dos hormônios esteróides, que poderiam modular o comprimento do telômero nos leucócitos, visto que a avaliação do telômero foi realizada apenas no dia da coleta dos oócitos com níveis hormonais suprafisiológicos.

As alterações metabólicas relacionadas a SOP parecem não interferir no comprimento do telômero nas células reprodutivas, CCI e CCM, visto que não encontramos diferença no comprimento do telômero nessas células entre os grupos. E com relação às células germinativas, oócitos VG e MI, também não foi encontrada diferença no comprimento do telômero. Wei et al. (2017) avaliaram o comprimento do telômero nos leucócitos e nas células da granulosa de mulheres com SOP e controle, e diferentemente do presente estudo, não encontraram diferença no comprimento do telômero nos leucócitos. Em contrapartida, o comprimento do telômero nas células da granulosa no grupo SOP foi maior do que no grupo controle (WEI et al., 2017).

No presente estudo foi observado também um aumento da atividade da telomerase nas CCI e nas CCM no grupo SOP, o que pode ser demonstrado pelo fato de que a atividade da telomerase pode estar aumentada em decorrência do hiperandrogenismo presente nestas mulheres, pois sabe-se que os andrógenos desempenham um papel importante no aumento da expressão e da atividade da telomerase (CALADO et al., 2009; NOURBAKHSH et al., 2010). Neste estudo, o grupo SOP foi bem caracterizado, onde as mulheres apresentaram maiores níveis de FAI, testosterona total, androstenediona e estradiol. Possivelmente o aumento da atividade da telomerase esteja exercendo uma proteção no telômero somente a nível reprodutivo, como no caso das células do *cumulus* e dos oócitos. Um recente estudo verificou a associação da atividade da telomerase e do comprimento de telômero nas células da

granulosa de mulheres com SOP e controle, que foram submetidas à FIV, e os efeitos do pré-tratamento ACO. Foi evidenciado um aumento do comprimento do telômero nas células da granulosa no grupo controle em comparação com o grupo SOP, mas não foram observadas diferenças na atividade da telomerase e no comprimento do telômero entre o grupo com pré-tratamento de ACO e o grupo sem o uso desta medicação em pacientes com SOP (LI et al., 2017).

Neste estudo, foi observada uma influência positiva dos andrógenos na atividade da telomerase das células do *cumulus*. Através da regressão linear múltipla, a androstenediona apresentou uma influência positiva na atividade da telomerase nas CCI, e o FAI apresentou uma influência positiva na atividade da telomerase nas CCM, demonstrando mais uma vez que a atividade da telomerase nesta linhagem celular pode ser influenciada positivamente pelo hiperandrogenismo. No comprimento do telômero nos leucócitos, nas CCI, nas CCM e nos oócitos VG não foi observada influência dessas variáveis, o que demonstra que o hiperandrogenismo influencia diretamente na atividade da telomerase e não no comprimento do telômero. Em contrapartida, a insulina apresentou uma influência negativa na atividade da telomerase nas CCI e embora não tenhamos encontrado um encurtamento do comprimento telomérico nas CCI, na literatura já foi evidenciado um encurtamento do telômero em decorrência da RI (SALPEA and HUMPHRIES, 2010). Este achado pode explicar a influência negativa da insulina na atividade da telomerase, mecanismo este responsável pela manutenção do telômero, que influenciada pela ação positiva do hiperandrogenismo nestas células, modulou esta atividade da telomerase. No entanto, não foi observada influência da insulina no comprimento do telômero nos leucócitos, CCI e CCM.

Nas CCI, foi encontrada uma correlação positiva entre a atividade da telomerase e o comprimento do telômero no grupo controle. Nas CCM, foi encontrada uma correlação positiva entre a atividade da telomerase e o comprimento do telômero no grupo SOP. Entretanto, o comprimento do telômero entre as diferentes células, tais como, leucócitos, CCI e CCM tiveram uma correlação positiva entre elas, independente de grupos. Com isso, podemos deduzir que existe uma influência do comprimento do telômero das células somáticas com as células reprodutivas, à nível sistêmico, independente de grupo, pois elas se correlacionam. Desta forma, o comprimento do telômero nos leucócitos poderia ser considerado um marcador e um indicativo da capacidade reprodutiva, não fosse a influência da ação da telomerase nas células reprodutivas. Embora, na análise das variáveis descritivas, as pacientes com SOP apresentarem um encurtamento nos leucócitos e não nas células reprodutivas, isso pode ser explicado pela atividade da telomerase estar aumentada nas células

reprodutivas destas mulheres, possivelmente pela presença do hiperandrogenismo, diminuindo o efeito deletério no comprimento do telômero à nível reprodutivo.

Embora a resposta à HOC tenha sido distinta em relação à CFA, folículos maiores que 14 mm, oócitos coletados nos diferentes graus de maturidade, como oócitos VG, MI e MII nas mulheres com SOP, o número de oócitos injetados, fertilizados e clivados, foram semelhantes entre os grupos. E não foi encontrada diferença na comparação da morfologia oocitária entre os grupos. Com isso, entra-se em contradição a ideia de que as mulheres com SOP possuem maiores taxas de oócitos morfologicamente anormais e que a capacidade reprodutiva do oócito pode ser prejudicada em pacientes com SOP (KENIGSBERG et al., 2009; KWON et al., 2010) (RIENZI et al., 2008; SETTI et al., 2011). No desenvolvimento embrionário desde o dia 1 (checagem de fertilização) até o dia 5/6, não foi encontrada diferença nos embriões, com exceção no dia 2 que apresentou mais embriões assimétricos no grupo SOP. Ainda no desenvolvimento embrionário, pode-se dizer também que não foi encontrada diferença entre os grupos em relação à presença de embriões considerados excelentes, mais especificamente no dia 2 (4G1), no dia 3 (8G1) e no dia 5/6 (Blastocistos 3.1.1. ou 4.1.1.). A taxa de gravidez foi similar entre os grupos, presumindo que as mulheres com SOP possuem as mesmas taxas de sucesso de gravidez em comparação com mulheres sem a doença, corroborando com alguns estudos da literatura (HEIJNEN et al., 2006; ASHRAFI et al., 2011; NAHUIS et al., 2011; PERALES-PUCHALT and LEGRO, 2013; FOURNIER et al., 2017). Uma resposta exagerada após HOC é frequentemente encontrada nas mulheres com SOP, aumentando o risco de desenvolverem a SHO. Neste estudo as taxas de TEF foram menores no grupo SOP, pois esta é uma estratégia preventiva e terapêutica, no qual é realizado o congelamento dos embriões para posteriormente, em um outro momento, ocorrer a TEC. As taxas de gravidezes positivas entre as TEF e TEC foram similares entre os grupos deste estudo, e devido a isso pode-se dizer que esta medida preventiva não atrapalha estas mulheres de engravidarem. Adicionalmente, as taxas de nascidos vivos após a TRA em mulheres com SOP são similares às das mulheres com outras causas de infertilidade, como a endometriose, a ESCA ou a infertilidade por fator masculino (SIGALA et al., 2015).

Há evidências que a restrição de crescimento intrauterino está relacionado com a presença da SOP, que resulta em recém-nascidos pequenos para a idade gestacional (PIG). Em nossa população, a prevalência de SOP em mulheres com PIG é duas vezes maior do que nas mulheres nascidas com peso adequado para idade gestacional (AGA) (MELO et al., 2010). No entanto, no presente estudo não foi observado diferença quanto ao peso, altura, sexo e idade gestacional dos nascidos vivos.

Um dado relevante deste estudo é que o grupo SOP foi bem caracterizado, pois estas mulheres apresentaram hiperandrogenismo, alterações metabólicas como aumento do IMC e hiperinsulinemia, bem como aumento do biomarcador inflamatório proteína c-reativa, e mesmo sob influência de HOC, como resposta exagerada às medicações indutoras da ovulação com grande número de folículos recrutados e obtidos, manteve-se presentes as características da síndrome. No entanto, a análise do comprimento do telômero e da atividade da telomerase nas mulheres com SOP em diferentes tipos celulares precisam ser estudadas mais a fundo para concluir realmente o que acontece à nível de células somáticas e reprodutivas. Uma limitação deste estudo foi ter realizada a avaliação do comprimento do telômero apenas no dia da coleta dos oócitos, não tendo sido realizado avaliação desta variável antes do TRA. Estudos com um número maior de casos, com diferentes protocolos de HOC, diferentes meios de cultivo, bem como diferentes populações são necessários para tornar os dados mais robustos, confirmar essas alterações no comprimento do telômero e na atividade da telomerase para buscar entender o que ocorre mais especificamente nestas células e o que este desfecho implicaria nos TRA.

6 Conclusão

Nossos achados sugerem que a SOP parece não afetar o comprimento do telômero nas CCI e CCM, apenas nos leucócitos. Por outro lado, uma maior atividade da telomerase nas CCI e CCM pode ser necessária para a manutenção do comprimento telomérico à nível reprodutivo nas mulheres com SOP.

Referências

ALPHA SCIENTISTS IN REPRODUCTIVE, M and EMBRYOLOGY, ESIGO. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod.* 2011;26(6):1270-1283.

ASHRAFI, M; KIANI, K; GHASEMI, A; RASTEGAR, F and NABAVI, M. The effect of low dose human chorionic gonadotropin on follicular response and oocyte maturation in PCOS patients undergoing IVF cycles: a randomized clinical trial of efficacy and safety. *Arch Gynecol Obstet.* 2011;284(6):1431-1438.

ASSOU, S; HAOUZI, D; MAHMOUD, K; AOUACHERIA, A; GUILLEMIN, Y; PANTESCO, V; REME, T; DECHAUD, H; DE VOS, J and HAMAMAH, S. A non-invasive test for assessing embryo potential by gene expression profiles of human cumulus cells: a proof of concept study. *Mol Hum Reprod.* 2008;14(12):711-719.

ASUNCION, M; CALVO, RM; SAN MILLAN, JL; SANCHO, J; AVILA, S and ESCOBAR-MORREALE, HF. A prospective study of the prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected Caucasian women from Spain. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(7):2434-2438.

AZZIZ, R; CARMINA, E; DEWAILLY, D; DIAMANTI-KANDARAKIS, E; ESCOBAR-MORREALE, HF; FUTTERWEIT, W; JANSSEN, OE; LEGRO, RS; NORMAN, RJ; TAYLOR, AE; WITCHEL, SF and ANDROGEN EXCESS, S. Positions statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(11):4237-4245.

BAYNE, S; LI, H; JONES, ME; PINTO, AR; VAN SINDEREN, M; DRUMMOND, A; SIMPSON, ER and LIU, JP. Estrogen deficiency reversibly induces telomere shortening in mouse granulosa cells and ovarian aging in vivo. *Protein Cell.* 2011;2(4):333-346.

BLASCO, MA; GASSER, SM and LINGNER, J. Telomeres and telomerase. *Genes Dev.* 1999;13(18):2353-2359.

BODNAR, AG; OUELLETTE, M; FROLKIS, M; HOLT, SE; CHIU, CP; MORIN, GB; HARLEY, CB; SHAY, JW; LICHTSTEINER, S and WRIGHT, WE. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science.* 1998;279(5349):349-352.

BONETTI, D; MARTINA, M; FALCETTONI, M and LONGHESE, MP. Telomere-end processing: mechanisms and regulation. *Chromosoma.* 2013.

BROWN, J; FARQUHAR, C; BECK, J; BOOTHROYD, C and HUGHES, E. Clomiphene and anti-oestrogens for ovulation induction in PCOS. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009;4):CD002249.

BUTTS, S; RIETHMAN, H; RATCLIFFE, S; SHAUNIK, A; COUTIFARIS, C and BARNHART, K. Correlation of telomere length and telomerase activity with occult ovarian insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(12):4835-4843.

CALADO, RT; BRUDNO, J; MEHTA, P; KOVACS, JJ; WU, C; ZAGO, MA; CHANOCK, SJ; BOYER, TD and YOUNG, NS. Constitutional telomerase mutations are genetic risk factors for cirrhosis. *Hepatology.* 2011;53(5):1600-1607.

CALADO, RT; YEWDELL, WT; WILKERSON, KL; REGAL, JA; KAJIGAYA, S; STRATAKIS, CA and YOUNG, NS. Sex hormones, acting on the TERT gene, increase telomerase activity in human primary hematopoietic cells. *Blood.* 2009;114(11):2236-2243.

CANIPARI, R. Oocyte--granulosa cell interactions. *Hum Reprod Update.* 2000;6(3):279-289.

CARMINA, E; CHU, MC; LONGO, RA; RINI, GB and LOBO, RA. Phenotypic variation in hyperandrogenic women influences the findings of abnormal metabolic and cardiovascular risk parameters. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(5):2545-2549.

CARMINA, E and LOBO, RA. Use of fasting blood to assess the prevalence of insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2004;82(3):661-665.

CASCELLA, T; PALOMBA, S; TAUCHMANOVA, L; MANGUSO, F; DI BIASE, S; LABELLA, D; GIALLAURIA, F; VIGORITO, C; COLAO, A; LOMBARDI, G and ORIO, F. Serum aldosterone concentration and cardiovascular risk in women with polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(11):4395-4400.

CAWTHON, RM. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(3):e21.

CHANG, RJ and COOK-ANDERSEN, H. Disordered follicle development. *Mol Cell Endocrinol.* 2013;373(1-2):51-60.

CHENG, EH; CHEN, SU; LEE, TH; PAI, YP; HUANG, LS; HUANG, CC and LEE, MS. Evaluation of telomere length in cumulus cells as a potential biomarker of oocyte and embryo quality. *Hum Reprod.* 2013;28(4):929-936.

CHIU, CP; DRAGOWSKA, W; KIM, NW; VAZIRI, H; YUI, J; THOMAS, TE; HARLEY, CB and LANSDORP, PM. Differential expression of telomerase activity in hematopoietic progenitors from adult human bone marrow. *Stem Cells.* 1996;14(2):239-248.

CIBULA, D; CIFKOVA, R; FANTA, M; POLEDNE, R; ZIVNY, J and SKIBOVA, J. Increased risk of non-insulin dependent diabetes mellitus, arterial hypertension and coronary artery disease in perimenopausal women with a history of the polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 2000;15(4):785-789.

COHEN, SB; GRAHAM, ME; LOVRECZ, GO; BACHE, N; ROBINSON, PJ and REDDEL, RR. Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells. *Science*. 2007;315(5820):1850-1853.

COLLINS, K and MITCHELL, JR. Telomerase in the human organism. *Oncogene*. 2002;21(4):564-579.

DEKEL, N and BEERS, WH. Development of the rat oocyte in vitro: inhibition and induction of maturation in the presence or absence of the cumulus oophorus. *Dev Biol*. 1980;75(2):247-254.

DIAMANTI-KANDARAKIS, E and DUNAIF, A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome revisited: an update on mechanisms and implications. *Endocr Rev*. 2012;33(6):981-1030.

DONA, G; SABBADIN, C; FIORE, C; BRAGADIN, M; GIORGINO, FL; RAGAZZI, E; CLARI, G; BORDIN, L and ARMANINI, D. Inositol administration reduces oxidative stress in erythrocytes of patients with polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol*. 2012;166(4):703-710.

DULEBA, AJ and DOKRAS, A. Is PCOS an inflammatory process? *Fertil Steril*. 2012;97(1):7-12.

DUMESIC, DA and ABBOTT, DH. Implications of polycystic ovary syndrome on oocyte development. *Semin Reprod Med*. 2008;26(1):53-61.

DUMESIC, DA; PADMANABHAN, V and ABBOTT, DH. Polycystic ovary syndrome and oocyte developmental competence. *Obstet Gynecol Surv*. 2008;63(1):39-48.

DUNAIF, A. Hyperandrogenic anovulation (PCOS): a unique disorder of insulin action associated with an increased risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Med*. 1995;98(1A):33S-39S.

ENDO, M; KIMURA, K; KUWAYAMA, T; MONJI, Y and IWATA, H. Effect of estradiol during culture of bovine oocyte-granulosa cell complexes on the mitochondrial DNA copies of oocytes and telomere length of granulosa cells. *Zygote*. 2014;22(4):431-439.

ESCOBAR-MORREALE, HF; LUQUE-RAMIREZ, M and GONZALEZ, F. Circulating inflammatory markers in polycystic ovary syndrome: a systematic review and metaanalysis. *Fertil Steril*. 2011;95(3):1048-1058 e1041-1042.

FARR, C; FANTES, J; GOODFELLOW, P and COOKE, H. Functional reintroduction of human telomeres into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(16):7006-7010.

FENKCI, V; FENKCI, S; YILMAZER, M and SERTESER, M. Decreased total antioxidant status and increased oxidative stress in women with polycystic ovary syndrome may contribute to the risk of cardiovascular disease. *Fertil Steril*. 2003;80(1):123-127.

FITZPATRICK, AL; KRONMAL, RA; GARDNER, JP; PSATY, BM; JENNY, NS; TRACY, RP; WALSTON, J; KIMURA, M and AVIV, A. Leukocyte telomere length and cardiovascular disease in the cardiovascular health study. *Am J Epidemiol*. 2007;165(1):14-21.

FOURNIER, A; TORRE, A; DELAROCHE, L; GALA, A; MULLET, T; FERRIERES, A and HAMAMAH, S. [Quality of oocytes and embryos from women with polycystic ovaries syndrome: State of the art]. *Gynecol Obstet Fertil Senol*. 2017;45(7-8):429-438.

FRANKS, S; STARK, J and HARDY, K. Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update*. 2008;14(4):367-378.

GARDNER, JP; LI, S; SRINIVASAN, SR; CHEN, W; KIMURA, M; LU, X; BERENSON, GS and AVIV, A. Rise in insulin resistance is associated with escalated telomere attrition. *Circulation*. 2005;111(17):2171-2177.

GOODARZI, MO; ERICKSON, S; PORT, SC; JENNRICH, RI and KORENMAN, SG. beta-Cell function: a key pathological determinant in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(1):310-315.

GOTO, H; IWATA, H; TAKEO, S; NISINOSONO, K; MURAKAMI, S; MONJI, Y and KUWAYAMA, T. Effect of bovine age on the proliferative activity, global DNA methylation, relative telomere length and telomerase activity of granulosa cells. *Zygote*. 2013;21(3):256-264.

GREIDER, CW. Telomere length regulation. *Annu Rev Biochem*. 1996;65(337-365).

GREIDER, CW and BLACKBURN, EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell*. 1985;43(2 Pt 1):405-413.

GUZELMERIC, K; ALKAN, N; PRIMOGLU, M; UNAL, O and TURAN, C. Chronic inflammation and elevated homocysteine levels are associated with increased body mass index in women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol*. 2007;23(9):505-510.

HAGELSTROM, RT; BLAGOEV, KB; NIEDERNHOFER, LJ; GOODWIN, EH and BAILEY, SM. Hyper telomere recombination accelerates replicative senescence and may promote premature aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(36):15768-15773.

HAMEL, M; DUFORT, I; ROBERT, C; GRAVEL, C; LEVEILLE, MC; LEADER, A and SIRARD, MA. Identification of differentially expressed markers in human follicular cells associated with competent oocytes. *Hum Reprod*. 2008;23(5):1118-1127.

HASSOLD, T and HUNT, P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet*. 2001;2(4):280-291.

HEIJNEN, EM; EIJKEMANS, MJ; HUGHES, EG; LAVEN, JS; MACKLON, NS and FAUSER, BC. A meta-analysis of outcomes of conventional IVF in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update*. 2006;12(1):13-21.

HOMBURG, R. Androgen circle of polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*. 2009;24(7):1548-1555.

JAISWAL, M; LARUSSO, NF; BURGART, LJ and GORES, GJ. Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism. *Cancer Res*. 2000;60(1):184-190.

JONARD, S and DEWAILLY, D. The follicular excess in polycystic ovaries, due to intra-ovarian hyperandrogenism, may be the main culprit for the follicular arrest. *Hum Reprod Update*. 2004;10(2):107-117.

JONES, MR; CHUA, AK; MENGESHA, EA; TAYLOR, KD; CHEN, YD; LI, X; KRAUSS, RM; ROTTER, JI; REPRODUCTIVE MEDICINE, N; LEGRO, RS; AZZIZ, R and GOODARZI, MO. Metabolic and cardiovascular genes in polycystic ovary syndrome: a candidate-wide association study (CWAS). *Steroids*. 2012;77(4):317-322.

JUNK, SM and YEAP, D. Improved implantation and ongoing pregnancy rates after single-embryo transfer with an optimized protocol for in vitro oocyte maturation in women with polycystic ovaries and polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2012;98(4):888-892.

KALYAN, S; PATEL, MS; KINGWELL, E; COTE, HCF; LIU, D and PRIOR, JC. Competing Factors Link to Bone Health in Polycystic Ovary Syndrome: Chronic Low-Grade Inflammation Takes a Toll. *Sci Rep*. 2017;7(1):3432.

KEEFE, DL; LIU, L and MARQUARD, K. Telomeres and aging-related meiotic dysfunction in women. *Cell Mol Life Sci*. 2007;64(2):139-143.

KEEFE, DL; MARQUARD, K and LIU, L. The telomere theory of reproductive senescence in women. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2006;18(3):280-285.

KENIGSBERG, S; BENTOV, Y; CHALIFA-CASPI, V; POTASHNIK, G; OFIR, R and BIRK, OS. Gene expression microarray profiles of cumulus cells in lean and overweight-obese polycystic ovary syndrome patients. *Mol Hum Reprod*. 2009;15(2):89-103.

KWON, H; CHOI, DH; BAE, JH; KIM, JH and KIM, YS. mRNA expression pattern of insulin-like growth factor components of granulosa cells and cumulus cells in women with and without polycystic ovary syndrome according to oocyte maturity. *Fertil Steril*. 2010;94(6):2417-2420.

LAI, Q; XIANG, W; LI, Q; ZHANG, H; LI, Y; ZHU, G; XIONG, C and JIN, L. Oxidative stress in granulosa cells contributes to poor oocyte quality and IVF-ET outcomes in women with polycystic ovary syndrome. *Front Med*. 2017.

LARSEN, WJ; WERT, SE and BRUNNER, GD. A dramatic loss of cumulus cell gap junctions is correlated with germinal vesicle breakdown in rat oocytes. *Dev Biol*. 1986;113(2):517-521.

LAVRANOS, TC; MATHIS, JM; LATHAM, SE; KALIONIS, B; SHAY, JW and RODGERS, RJ. Evidence for ovarian granulosa stem cells: telomerase activity and localization of the telomerase ribonucleic acid component in bovine ovarian follicles. *Biol Reprod*. 1999;61(2):358-366.

LEGRO, RS; KUNSELMAN, AR; DODSON, WC and DUNAIF, A. Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: a prospective, controlled study in 254 affected women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(1):165-169.

LI, Q; DU, J; FENG, R; XU, Y; WANG, H; SANG, Q; XING, Q; ZHAO, X; JIN, L; HE, L and WANG, L. A possible new mechanism in the pathophysiology of polycystic ovary syndrome (PCOS): the discovery that leukocyte telomere length is strongly associated with PCOS. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(2):E234-240.

LI, Y; DENG, B; OUYANG, N; YUAN, P; ZHENG, L and WANG, W. Telomere length is short in PCOS and oral contraceptive does not affect the telomerase activity in granulosa cells of patients with PCOS. *J Assist Reprod Genet*. 2017;34(7):849-859.

LIU, JP and LI, H. Telomerase in the ovary. *Reproduction*. 2010;140(2):215-222.

MARCH, WA; MOORE, VM; WILLSON, KJ; PHILLIPS, DI; NORMAN, RJ and DAVIES, MJ. The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting diagnostic criteria. *Hum Reprod*. 2010;25(2):544-551.

MELO, AS; VIEIRA, CS; BARBIERI, MA; ROSA, ESAC; SILVA, AA; CARDOSO, VC; REIS, RM; FERRIANI, RA; SILVA-DE-SA, MF and BETTIOL, H. High prevalence of polycystic ovary syndrome in women born small for gestational age. *Hum Reprod*. 2010;25(8):2124-2131.

MIRANDA-FURTADO, CL; RAMOS, FK; KOGURE, GS; SANTANA-LEMONS, BA; FERRIANI, RA; CALADO, RT and DOS REIS, RM. A Nonrandomized Trial of Progressive Resistance Training Intervention in Women With Polycystic Ovary Syndrome and Its Implications in Telomere Content. *Reprod Sci*. 2016;23(5):644-654.

MURRI, M; LUQUE-RAMIREZ, M; INSENSER, M; OJEDA-OJEDA, M and ESCOBAR-MORREALE, HF. Circulating markers of oxidative stress and polycystic ovary syndrome (PCOS): a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2013;19(3):268-288.

NAHUIS, MJ; KOSE, N; BAYRAM, N; VAN DESSEL, HJ; BRAAT, DD; HAMILTON, CJ; HOMPE, PG; BOSSUYT, PM; MOL, BW; VAN DER VEEN, F and VAN WELY, M. Long-term outcomes in women with polycystic ovary syndrome initially randomized to receive laparoscopic electrocautery of the ovaries or ovulation induction with gonadotrophins. *Hum Reprod*. 2011;26(7):1899-1904.

NASTRI, CO; FERRIANI, RA; ROCHA, IA and MARTINS, WP. Ovarian hyperstimulation syndrome: pathophysiology and prevention. *J Assist Reprod Genet*. 2010;27(2-3):121-128.

NORMAN, RJ; DEWAILLY, D; LEGRO, RS and HICKEY, TE. Polycystic ovary syndrome. *Lancet*. 2007;370(9588):685-697.

NOURBAKHS, M; GOLESTANI, A; ZAHRAI, M; MODARRESSI, MH; MALEKPOUR, Z and KARAMI-TEHRANI, F. Androgens stimulate telomerase expression, activity and phosphorylation in ovarian adenocarcinoma cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;330(1-2):10-16.

O'DONOVAN, A; PANTELL, MS; PUTERMAN, E; DHABHAR, FS; BLACKBURN, EH; YAFFE, K; CAWTHON, RM; OPRESKO, PL; HSUEH, WC; SATTERFIELD, S; NEWMAN, AB; AYONAYON, HN; RUBIN, SM; HARRIS, TB; EPEL, ES; HEALTH, A and BODY COMPOSITION, S. Cumulative inflammatory load is associated with short leukocyte telomere length in the Health, Aging and Body Composition Study. *PLoS One*. 2011;6(5):e19687.

O'SULLIVAN, RJ and KARLSEDER, J. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(3):171-181.

ORIO, F, JR.; PALOMBA, S; CASCELLA, T; DE SIMONE, B; DI BIASE, S; RUSSO, T; LABELLA, D; ZULLO, F; LOMBARDI, G and COLAO, A. Early impairment of endothelial structure and function in young normal-weight women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(9):4588-4593.

ORIO, F, JR.; PALOMBA, S; SPINELLI, L; CASCELLA, T; TAUCHMANOVA, L; ZULLO, F; LOMBARDI, G and COLAO, A. The cardiovascular risk of young women with polycystic ovary syndrome: an observational, analytical, prospective case-control study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(8):3696-3701.

ORIO, F; VUOLO, L; PALOMBA, S; LOMBARDI, G and COLAO, A. Metabolic and cardiovascular consequences of polycystic ovary syndrome. *Minerva Ginecol.* 2008;60(1):39-51.

OUANDAOGO, ZG; HAOUZI, D; ASSOU, S; DECHAUD, H; KADOCH, IJ; DE VOS, J and HAMAMAH, S. Human cumulus cells molecular signature in relation to oocyte nuclear maturity stage. *PLoS One.* 2011;6(11):e27179.

OZTURK, S; SOZEN, B and DEMIR, N. Telomere length and telomerase activity during oocyte maturation and early embryo development in mammalian species. *Mol Hum Reprod.* 2014;20(1):15-30.

PEDROSO, DC; MIRANDA-FURTADO, CL; KOGURE, GS; MEOLA, J; OKUKA, M; SILVA, C; CALADO, RT; FERRIANI, RA; KEEFE, DL and DOS REIS, RM. Inflammatory biomarkers and telomere length in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2015;103(2):542-547 e542.

PERALES-PUCHALT, A and LEGRO, RS. Ovulation induction in women with polycystic ovary syndrome. *Steroids.* 2013;78(8):767-772.

QIAO, J and FENG, HL. Extra- and intra-ovarian factors in polycystic ovary syndrome: impact on oocyte maturation and embryo developmental competence. *Hum Reprod Update.* 2011;17(1):17-33.

REDON, S; REICHENBACH, P and LINGNER, J. The non-coding RNA TERRA is a natural ligand and direct inhibitor of human telomerase. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(17):5797-5806.

RICHARDS, JB; VALDES, AM; GARDNER, JP; KATO, BS; SIVA, A; KIMURA, M; LU, X; BROWN, MJ; AVIV, A and SPECTOR, TD. Homocysteine levels and leukocyte telomere length. *Atherosclerosis.* 2008;200(2):271-277.

RIENZI, L; UBALDI, FM; IACOBELLI, M; MINASI, MG; ROMANO, S; FERRERO, S; SAPIENZA, F; BARONI, E; LITWICKA, K and GRECO, E. Significance of metaphase II human oocyte morphology on ICSI outcome. *Fertil Steril*. 2008;90(5):1692-1700.

SABUNCU, T; VURAL, H; HARMA, M and HARMA, M. Oxidative stress in polycystic ovary syndrome and its contribution to the risk of cardiovascular disease. *Clin Biochem*. 2001;34(5):407-413.

SALEHI, M; BRAVO-VERA, R; SHEIKH, A; GOULLER, A and PORETSKY, L. Pathogenesis of polycystic ovary syndrome: what is the role of obesity? *Metabolism*. 2004;53(3):358-376.

SALLEY, KE; WICKHAM, EP; CHEANG, KI; ESSAH, PA; KARJANE, NW and NESTLER, JE. Glucose intolerance in polycystic ovary syndrome--a position statement of the Androgen Excess Society. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(12):4546-4556.

SALPEA, KD and HUMPHRIES, SE. Telomere length in atherosclerosis and diabetes. *Atherosclerosis*. 2010;209(1):35-38.

SANCHON, R; GAMBINERI, A; ALPANES, M; MARTINEZ-GARCIA, MA; PASQUALI, R and ESCOBAR-MORREALE, HF. Prevalence of functional disorders of androgen excess in unselected premenopausal women: a study in blood donors. *Hum Reprod*. 2012;27(4):1209-1216.

SCHEINBERG, P; COOPER, JN; SLOAND, EM; WU, CO; CALADO, RT and YOUNG, NS. Association of telomere length of peripheral blood leukocytes with hematopoietic relapse, malignant transformation, and survival in severe aplastic anemia. *JAMA*. 2010;304(12):1358-1364.

SCHOEFTNER, S and BLASCO, MA. Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. *Nat Cell Biol*. 2008;10(2):228-236.

SETTI, AS; FIGUEIRA, RC; BRAGA, DP; COLTURATO, SS; IACONELLI, A, JR. and BORGES, E, JR. Relationship between oocyte abnormal morphology and intracytoplasmic sperm injection outcomes: a meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2011;159(2):364-370.

SIGALA, J; SIFER, C; DEWAILLY, D; ROBIN, G; BRUYNEEL, A; RAMDANE, N; LEFEBVRE-KHALIL, V; MITCHELL, V and DECANter, C. Is polycystic ovarian morphology related to a poor oocyte quality after controlled ovarian hyperstimulation for intracytoplasmic sperm injection? Results from a prospective, comparative study. *Fertil Steril*. 2015;103(1):112-118.

TALBOTT, EO; ZBOROWSKI, JV; BOUDREAUX, MY; MCHUGH-PEMU, KP; SUTTON-TYRRELL, K and GUZICK, DS. The relationship between C-reactive protein and carotid intima-media wall thickness in middle-aged women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(12):6061-6067.

TARKUN, I; ARSLAN, BC; CANTURK, Z; TUREMEN, E; SAHIN, T and DUMAN, C. Endothelial dysfunction in young women with polycystic ovary syndrome: relationship with insulin resistance and low-grade chronic inflammation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(11):5592-5596.

TEEDE, HJ; HUTCHISON, S; ZOUNGAS, S and MEYER, C. Insulin resistance, the metabolic syndrome, diabetes, and cardiovascular disease risk in women with PCOS. *Endocrine.* 2006;30(1):45-53.

TIAN, JY; CHENG, Q; SONG, XM; LI, G; JIANG, GX; GU, YY and LUO, M. Birth weight and risk of type 2 diabetes, abdominal obesity and hypertension among Chinese adults. *Eur J Endocrinol.* 2006;155(4):601-607.

TOWNSLEY, DM; DUMITRIU, B; LIU, D; BIANCOTTO, A; WEINSTEIN, B; CHEN, C; HARDY, N; MIHALEK, AD; LINGALA, S; KIM, YJ; YAO, J; JONES, E; GOCHUICO, BR; HELLER, T; WU, CO; CALADO, RT; SCHEINBERG, P and YOUNG, NS. Danazol Treatment for Telomere Diseases. *N Engl J Med.* 2016;374(20):1922-1931.

TURNER, S and HARTSHORNE, GM. Telomere lengths in human pronuclei, oocytes and spermatozoa. *Mol Hum Reprod.* 2013;19(8):510-518.

TURNER, S; WONG, HP; RAI, J and HARTSHORNE, GM. Telomere lengths in human oocytes, cleavage stage embryos and blastocysts. *Mol Hum Reprod.* 2010;16(9):685-694.

VAN MONTFOORT, AP; GERAEDTS, JP; DUMOULIN, JC; STASSEN, AP; EVERS, JL and AYOUBI, TA. Differential gene expression in cumulus cells as a prognostic indicator of embryo viability: a microarray analysis. *Mol Hum Reprod.* 2008;14(3):157-168.

VAN STEENSEL, B; SMOGORZEWSKA, A and DE LANGE, T. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell.* 1998;92(3):401-413.

VENTEICHER, AS; ABREU, EB; MENG, Z; MCCANN, KE; TERNS, RM; VEENSTRA, TD; TERNS, MP and ARTANDI, SE. A human telomerase holoenzyme protein required for Cajal body localization and telomere synthesis. *Science.* 2009;323(5914):644-648.

VITEK, W; HOEGER, K and LEGRO, RS. Treatment strategies for infertile women with polycystic ovary syndrome. *Minerva Ginecol.* 2016;68(4):450-457.

WANG, C; SHEN, F; ZHU, Y; FANG, Y and LU, S. Telomeric repeat-containing RNA (TERRA) related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2017;86(4):552-559.

WANG, F; PAN, X; KALMBACH, K; SETH-SMITH, ML; YE, X; ANTUMES, DM; YIN, Y; LIU, L; KEEFE, DL and WEISSMAN, SM. Robust measurement of telomere length in single cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(21):E1906-1912.

WEI, D; XIE, J; YIN, B; HAO, H; SONG, X; LIU, Q; ZHANG, C and SUN, Y. Significantly lengthened telomere in granulosa cells from women with polycystic ovarian syndrome (PCOS). *J Assist Reprod Genet*. 2017;34(7):861-866.

WEI, LN; LIANG, XY; FANG, C and ZHANG, MF. Abnormal expression of growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 in stimulated oocytes during maturation from women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2011;96(2):464-468.

WONG, JY; DE VIVO, I; LIN, X; FANG, SC and CHRISTIANI, DC. The relationship between inflammatory biomarkers and telomere length in an occupational prospective cohort study. *PLoS One*. 2014;9(1):e87348.

WOOD, JR; DUMESIC, DA; ABBOTT, DH and STRAUSS, JF, 3RD. Molecular abnormalities in oocytes from women with polycystic ovary syndrome revealed by microarray analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(2):705-713.

WRIGHT, DL; JONES, EL; MAYER, JF; OEHNINGER, S; GIBBONS, WE and LANZENDORF, SE. Characterization of telomerase activity in the human oocyte and preimplantation embryo. *Mol Hum Reprod*. 2001;7(10):947-955.

WRIGHT, WE; PIATYSZEK, MA; RAINEY, WE; BYRD, W and SHAY, JW. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet*. 1996;18(2):173-179.

YAMAGATA, Y; NAKAMURA, Y; Umayahara, K; HARADA, A; TAKAYAMA, H; SUGINO, N and KATO, H. Changes in telomerase activity in experimentally induced atretic follicles of immature rats. *Endocr J*. 2002;49(6):589-595.

YILDIZ, BO; HAZNEDAROGLU, IC; KIRAZLI, S and BAYRAKTAR, M. Global fibrinolytic capacity is decreased in polycystic ovary syndrome, suggesting a prothrombotic state. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(8):3871-3875.

YOUNIS, JS; JADAON, JE; HADDAD, S; IZHAKI, I and BEN-AMI, M. Prospective evaluation of basal stromal Doppler studies in women with good ovarian reserve and infertility undergoing in vitro fertilization-embryo transfer treatment: patients with polycystic ovary syndrome versus ovulatory patients. *Fertil Steril*. 2011;95(5):1754-1758.

ZHANG, D; WEN, X; WU, W; XU, E; ZHANG, Y and CUI, W. Homocysteine-related hTERT DNA demethylation contributes to shortened leukocyte telomere length in atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2013;231(1):173-179.

ZHOU, L; CHEN, B; HUA, X; ZHOU, P; GUO, L; PENG, Y and QIU, K. Effect of newly identified hTERT-interacting proteins on telomerase activity. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2013;45(8):674-682.

ZHU, L; HAN, CS; CAO, ZL; WANG, ZB; HAN, RG; WANG, B and SUN, QY. Confocal Microscopic Analysis of the Spindle and Chromosome Configurations of in vitro-Matured Oocytes from Different Types of Polycystic Ovary Syndrome Patients. *Gynecol Obstet Invest*. 2015;80(3):179-186.

Anexo I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Mulheres com Síndrome dos Ovários Policísticos

Título do estudo: “Comprimento do telômero e atividade da telomerase em células do *cumulus* de mulheres com Síndrome dos Ovários Policísticos”.

Investigadores principais:

Profa. Dra. Rosana Maria dos Reis

Daiana Cristina Chielli Pedroso

INFORMAÇÃO AO PACIENTE

Você está sendo convidado a participar voluntariamente de um estudo chamado “Comprimento do telômero e atividade da telomerase em células do *cumulus* de mulheres com Síndrome dos Ovários Policísticos”. Antes de decidir participar deste estudo, é importante que você leia e compreenda os procedimentos envolvidos. Este termo de consentimento informado descreve o motivo, os procedimentos, os benefícios e os riscos do estudo. Por favor, sinta-se à vontade para fazer quantas perguntas quiser. É necessário ler e assinar este termo de consentimento antes que você possa participar. Sua decisão de participar ou não participar neste estudo não terá qualquer interferência sobre o seu atendimento clínico.

POR QUE VOCÊ ESTÁ SENDO CONVIDADO A PARTICIPAR?

A Síndrome dos Ovários Policísticos é uma causa bastante comum de irregularidade menstrual e de dificuldade para engravidar (denominada infertilidade). Questiona-se um dos motivos responsáveis tanto pela maior dificuldade em engravidar, como pela chance aumentada de abortamento nas mulheres portadoras desta síndrome, o qual pode ser ocasionado devido a inadequada qualidade dos óvulos (células femininas responsáveis pela reprodução), que poderão produzir embriões de má qualidade.

A identificação da presença de alterações nos óvulos de pacientes portadoras desta síndrome e de outras causas de infertilidade, não somente ajudaria a elucidar o mecanismo causador da infertilidade e da maior chance de abortamento, como também abriria perspectivas futuras de tratamento para este grupo de pacientes.

Uma forma indireta de avaliarmos a qualidade dos seus óvulos, sem lhe causar qualquer risco adicional ou prejuízo do sucesso de você engravidar durante este procedimento de reprodução assistida seria utilizar as células que envolvem os óvulos (denominadas células do *cumulus*), os óvulos que não amadureceram o suficiente para serem inseminados (denominados óvulos imaturos) e os óvulos excedentes para fertilização estabelecida pelo Departamento de Reprodução Assistida que, portanto, serão descartados, não sendo úteis para o seu tratamento. As células do *cumulus* e os óvulos serão utilizados para estudar o comprimento do telômero e a atividade da enzima telomerase no desenvolvimento dos seus óvulos.

Os telômeros são estruturas especializadas presentes nas extremidades dos cromossomos que desempenham um importante papel na regulação da estabilidade genômica. A enzima telomerase, por sua vez, recebe este nome, pois atua nos telômeros, impedindo que se encurtem.

Um controle rigoroso no comprimento dos telômeros é essencial para que uma célula normal desempenhe suas funções.

OBJETIVO DO ESTUDO

Avaliar nas mulheres com SOP e nas mulheres com ciclos menstruais regulares submetidas ao tratamento de Reprodução Assistida:

- 1) o comprimento dos telômeros no sangue periférico, nas células do *cumulus* e nos óvulos
- 2) a atividade da telomerase nas células do *cumulus* e nos óvulos

O QUE ENVOLVE A SUA PARTICIPAÇÃO?

Você passará pelo procedimento de coleta de óvulos, no qual serão colhidos os óvulos imaturos e/ou maduros que poderão ser utilizados para o desenvolvimento do embrião. Os óvulos que forem fornecidos voluntariamente para pesquisa poderão ser utilizados para este estudo. Além disso, será colhida uma amostra de sangue periférico (total de 20 ml) para análise do comprimento do telômero e para dosagens hormonais. As amostras serão armazenadas apenas durante o período de sua realização, em local apropriado e seguro (freezer -80°C do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia), e não haverá armazenamento para trabalhos posteriores.

O QUE MAIS SERÁ REALIZADO?

No sangue periférico serão realizadas dosagens hormonais e extração do DNA das células sanguíneas para avaliar o comprimento do telômero. Esta análise será realizada através de um método denominado qPCR.

As células do *cumulus* e os óvulos também serão utilizados para estudar o comprimento do telômero através da mesma técnica citada acima e nestas mesmas células será analisada também a atividade da enzima telomerase através de um método chamado TRAPeze para buscar um melhor entendimento da sua qualidade reprodutiva.

POSSÍVEIS RISCOS AO PARTICIPAR DESTE ESTUDO

Devemos ressaltar que as células do *cumulus* e os óvulos que forem cedidas para pesquisa não irão interferir no seu tratamento para engravidar, assim como não causarão prejuízo algum para a sua saúde, nem para a do futuro bebê. Todos os óvulos cedidos para pesquisa serão utilizados exclusivamente para a avaliação do comprimento do telômero e da atividade da enzima telomerase e não para outros fins que não a pesquisa. A coleta dos óvulos é totalmente indolor, porém após o procedimento, eventualmente pode ser observado sonolência devido ao efeito anestésico e um pequeno desconforto abdominal.

Na coleta de sangue periférico pode ser observado um pequeno desconforto no local da punção, como por exemplo, dor e/ou hematoma.

Em relação ao seu estado emocional e psicológico, momentos antes e/ou após o procedimento podem ser observados sentimentos de ansiedade, incertezas, dúvidas e medo.

Não será necessário nenhum tipo de procedimento extra ou qualquer outro tipo de exame além dos habituais para o procedimento de reprodução assistida, que o casal já irá realizar.

POSSÍVEIS BENEFÍCIOS

Os resultados deste estudo poderão trazer conhecimento adicional para os casos de infertilidade associada à Síndrome dos Ovários Policísticos, no sentido de propiciar um tratamento mais eficaz.

O QUE ACONTECE SE VOCÊ NÃO QUISE PARTICIPAR?

Sua participação neste estudo é totalmente voluntária. Se você decidir não participar, não haverá penalidade, perda de benefícios ou redução na qualidade dos cuidados médicos. Se forem disponíveis novas informações que possam afetar a sua vontade de continuar nesta pesquisa, você terá conhecimento destas informações.

E SE VOCÊ QUISER SAIR DO ESTUDO APÓS TER ACEITADO PARTICIPAR?

Você pode descontinuar sua participação neste estudo a qualquer momento sem penalidade ou perda dos benefícios que de outra forma você teria direito. Caso você deseje retirar o seu consentimento, favor notificar o investigador, através do número de telefone listado neste termo de consentimento livre e esclarecido. Você tem o direito de se retirar do estudo completamente (isto significa que você não deseja ser contatado por qualquer pessoa do estudo depois da sua retirada).

Você será informado de forma oportuna sobre qualquer nova informação relacionada à sua segurança que possa influenciar sua disposição em continuar participando do estudo.

SIGILO E DIVULGAÇÃO DE INFORMAÇÕES PESSOAIS

Você será identificado por um número em toda documentação e avaliação, estando seu nome em segredo absoluto.

Todas as informações coletadas durante este estudo, incluindo o acesso ao seu prontuário médico, dados pessoais, dados de pesquisa (por exemplo, idade, peso, altura, pressão arterial, hábitos e medicamentos em uso), datas de consultas e procedimentos, relatórios médicos e resultados de exames, serão mantidas em sigilo e somente os pesquisadores responsáveis pela pesquisa poderão ter acesso às suas informações.

ARMAZENAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO – BIORREPOSITÓRIO

As amostras biológicas cedidas para pesquisa serão armazenadas no Biorrepositório identificado como “Amostras de células do *cumulus*, oócitos e sangue periférico de mulheres com Síndrome dos Ovários Policísticos e de mulheres com ciclos menstruais regulares para análise do comprimento do telômero e atividade da telomerase” e tem como objetivo, como o próprio nome diz, armazenar amostras de células do *cumulus*, oócitos e sangue periférico das voluntárias participantes da pesquisa.

Você terá toda garantia da possibilidade de acesso gratuito aos resultados obtidos com a utilização do seu material biológico (Resolução CNS nº 441 de 2011, item II.b): informações de armazenamento, incluindo as garantias de qualidade da conservação e integridade de seu material biológico; informações genéticas associadas ao seu material biológico humano armazenado; bem como as medidas para garantir a privacidade e a confidencialidade; a designação das pessoas que poderão ter acesso à sua informação genética, em caso de óbito ou condição incapacitante (Portaria MS 2201 de 2011, artigo 8).

Todos os resultados de exames e testes somente serão acessíveis aos pesquisadores responsáveis pela pesquisa e não será permitido o acesso a terceiros (Resolução nº 340 item V.1.f).

Com a finalização do estudo, o material biológico continuará sendo armazenado no prazo máximo de dez anos para qualquer necessidade de replicação dos resultados. Após este período, o material será devidamente descartado de forma sigilosa.

REGISTRO DO ESTUDO PESQUISA

A pesquisa não será registrada.

CUSTOS E REMUNERAÇÃO

Como as amostras para o estudo serão coletadas no mesmo dia da coleta de óvulos, não haverá necessidade da sua vinda ao laboratório apenas para a coleta de material de pesquisa, não sendo necessário o ressarcimento quanto à alimentação/transporte. Caso o voluntário da pesquisa sinta-se lesado de alguma forma, pode recorrer aos dispositivos legais para eventuais indenizações, lembrando-se que não haverá quebra de sigilo e que os óvulos ou sangue coletados não serão utilizados de forma alguma para qualquer outro tipo de procedimento que não fora proposto por esta pesquisa.

NO CASO DE DANO RELACIONADO À PESQUISA

Caso você sofra algum dano como resultado de qualquer atividade da pesquisa, os pesquisadores responsáveis e a própria instituição irão proporcionar assistência imediata, bem como se responsabilizarem pela assistência integral pelo tempo que for necessário no que se refere a complicações e danos decorrentes da pesquisa (Resolução CNS nº 466 de 2012, item V.6).

De forma alguma, o presente termo renuncia os direitos legais do participante ou isenta o investigador, a instituição, o patrocinador ou seus representantes das responsabilidades legais caso haja algum dano.

CONTATO PARA MAIS INFORMAÇÕES

Os pesquisadores estarão disponíveis para responder a quaisquer perguntas que você possa ter em relação ao tratamento descrito ou os procedimentos do estudo. Se você tiver alguma dúvida sobre esta pesquisa, você pode entrar em contato com Daiana Cristina Chielli Pedroso, no

Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP – Fone: (16) 3602-2926 / (16) 996091861 – daia.pedroso@hotmail.com.

Se você tem alguma dúvida sobre seus direitos como um participante de pesquisa, entre em contato com o médico do estudo ou o seu médico de confiança. Caso você quiser falar com alguém não diretamente envolvido neste estudo sobre os seus direitos, preocupações, você pode se comunicar com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo no Campus Universitário, S/N, Monte Alegre, Prédio Central, Subsolo - 14048-900 – Ribeirão Preto/SP, em 16 3602 2228 com horário de funcionamento de Segunda a Sexta-feira das 08hrs00min às 17hrs00min.

Você também poderá entrar em contato, caso se sentir coagido para aceitar ou continuar a participar da pesquisa.

CONSENTIMENTO

Ao assinar e datar este formulário, você irá confirmar que foi suficiente informado sobre a natureza, a finalidade, a duração e os riscos deste estudo. Confirma também que foi capaz de discutir dúvidas em detalhes com o pesquisador, e que estas, foram completamente e satisfatoriamente respondidas.

Você receberá uma via assinada deste formulário e a outra via ficará com o pesquisador.

Nome da Participante

Assinatura

Data e horário

Nome do Pesquisador

Assinatura

Data e horário

Nome da Testemunha
(se necessário)

Assinatura

Data e horário

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Mulheres com Ciclos menstruais regulares – Grupo controle

Título do estudo: “Comprimento do telômero e atividade da telomerase em células do *cumulus* de mulheres com Síndrome dos Ovários Policísticos”.

Investigadores principais:

Profª. Dra. Rosana Maria dos Reis

Daiana Cristina Chielli Pedroso

INFORMAÇÃO AO PACIENTE

Você está sendo convidado a participar voluntariamente de um estudo chamado “Comprimento do telômero e atividade da telomerase em células do *cumulus* de mulheres com Síndrome dos Ovários Policísticos”. Antes de decidir participar deste estudo, é importante que você leia e compreenda os procedimentos envolvidos. Este termo de consentimento informado descreve o motivo, os procedimentos, os benefícios e os riscos do estudo. Por favor, sinta-se à vontade para fazer quantas perguntas quiser. É necessário ler e assinar este termo de consentimento antes que você possa participar. Sua decisão de participar ou não participar neste estudo não terá qualquer interferência sobre o seu atendimento clínico.

POR QUE VOCÊ ESTÁ SENDO CONVIDADO A PARTICIPAR?

A Síndrome dos Ovários Policísticos é uma causa bastante comum de irregularidade menstrual e de dificuldade para engravidar (denominada infertilidade). Questiona-se um dos motivos responsáveis tanto pela maior dificuldade em engravidar, como pela chance aumentada de abortamento nas mulheres portadoras desta síndrome, o qual pode ser ocasionado devido a inadequada qualidade dos óvulos (células femininas responsáveis pela reprodução), que poderão produzir embriões de má qualidade.

A identificação da presença de alterações nos óvulos de pacientes portadoras desta síndrome e de outras causas de infertilidade, não somente ajudaria a elucidar o mecanismo causador da infertilidade e da maior chance de abortamento, como também abriria perspectivas futuras de tratamento para este grupo de pacientes. Por isso, é muito importante também que nós tenhamos um grupo de pacientes que não possuem a doença (chamado grupo controle). Sua colaboração neste estudo é como voluntária, e os dados de seus exames serão utilizados para comparação com as pacientes que tem esta doença.

Uma forma indireta de avaliarmos a qualidade dos seus óvulos, sem lhe causar qualquer risco adicional ou prejuízo do sucesso de você engravidar durante este procedimento de reprodução assistida seria utilizar as células que envolvem os óvulos (denominadas células do *cumulus*), os óvulos que não amadureceram o suficiente para serem inseminados (denominados óvulos imaturos) e os óvulos excedentes para fertilização estabelecida pelo Departamento de Reprodução Assistida que, portanto, serão descartados, não sendo úteis para o seu tratamento. As células do *cumulus* e os óvulos serão utilizados para estudar o comprimento do telômero e a atividade da enzima telomerase no desenvolvimento dos seus óvulos.

Os telômeros são estruturas especializadas presentes nas extremidades dos cromossomos que desempenham um importante papel na regulação da estabilidade genômica. A enzima telomerase, por sua vez, recebe este nome, pois atua nos telômeros, impedindo que se encurtem.

Um controle rigoroso no comprimento dos telômeros é essencial para que uma célula normal desempenhe suas funções.

OBJETIVO DO ESTUDO

Avaliar nas mulheres com SOP e nas mulheres com ciclos menstruais regulares submetidas ao tratamento de Reprodução Assistida:

- 1) o comprimento dos telômeros no sangue periférico, nas células do *cumulus* e nos óvulos
- 2) a atividade da telomerase nas células do *cumulus* e nos óvulos

O QUE ENVOLVE A SUA PARTICIPAÇÃO?

Você passará pelo procedimento de coleta de óvulos, no qual serão colhidos os óvulos imaturos e/ou maduros que poderão ser utilizados para o desenvolvimento do embrião. Os óvulos que forem fornecidos voluntariamente para pesquisa poderão ser utilizados para este estudo. Além disso, será colhida uma amostra de sangue periférico (total de 20 ml) para análise do comprimento do telômero e para dosagens hormonais. As amostras serão armazenadas apenas durante o período de sua realização, em local apropriado e seguro (freezer -80°C do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia), e não haverá armazenamento para trabalhos posteriores.

O QUE MAIS SERÁ REALIZADO?

No sangue periférico serão realizadas dosagens hormonais e extração do DNA das células sanguíneas para avaliar o comprimento do telômero. Esta análise será realizada através de um método denominado qPCR.

As células do *cumulus* e os óvulos também serão utilizados para estudar o comprimento do telômero através da mesma técnica citada acima e nestas mesmas células será analisada também a atividade da enzima telomerase através de um método chamado TRAPeze para buscar um melhor entendimento da sua qualidade reprodutiva.

POSSÍVEIS RISCOS AO PARTICIPAR DESTE ESTUDO

Devemos ressaltar que as células do *cumulus* e os óvulos que forem cedidas para pesquisa não irão interferir no seu tratamento para engravidar, assim como não causarão prejuízo algum para a sua saúde, nem para a do futuro bebê. Todos os óvulos cedidos para pesquisa serão utilizados exclusivamente para a avaliação do comprimento do telômero e da atividade da enzima telomerase e não para outros fins que não a pesquisa. A coleta dos óvulos é totalmente indolor, porém após o procedimento, eventualmente pode ser observado sonolência devido ao efeito anestésico e um pequeno desconforto abdominal.

Na coleta de sangue periférico pode ser observado um pequeno desconforto no local da punção, como por exemplo, dor e/ou hematoma.

Em relação ao seu estado emocional e psicológico, momentos antes e/ou após o procedimento podem ser observados sentimentos de ansiedade, incertezas, dúvidas e medo.

Não será necessário nenhum tipo de procedimento extra ou qualquer outro tipo de exame além dos habituais para o procedimento de reprodução assistida, que o casal já irá realizar.

POSSÍVEIS BENEFÍCIOS

Os resultados deste estudo poderão trazer conhecimento adicional para os casos de infertilidade associada à Síndrome dos Ovários Policísticos, no sentido de propiciar um tratamento mais eficaz.

O QUE ACONTECE SE VOCÊ NÃO QUISER PARTICIPAR?

Sua participação neste estudo é totalmente voluntária. Se você decidir não participar, não haverá penalidade, perda de benefícios ou redução na qualidade dos cuidados médicos. Se forem disponíveis novas informações que possam afetar a sua vontade de continuar nesta pesquisa, você terá conhecimento destas informações.

E SE VOCÊ QUISER SAIR DO ESTUDO APÓS TER ACEITADO PARTICIPAR?

Você pode descontinuar sua participação neste estudo a qualquer momento sem penalidade ou perda dos benefícios que de outra forma você teria direito. Caso você deseje retirar o seu

consentimento, favor notificar o investigador, através do número de telefone listado neste termo de consentimento livre e esclarecido. Você tem o direito de se retirar do estudo completamente (isto significa que você não deseja ser contatado por qualquer pessoa do estudo depois da sua retirada).

Você será informado de forma oportuna sobre qualquer nova informação relacionada à sua segurança que possa influenciar sua disposição em continuar participando do estudo.

SIGILO E DIVULGAÇÃO DE INFORMAÇÕES PESSOAIS

Você será identificado por um número em toda documentação e avaliação, estando seu nome em segredo absoluto.

Todas as informações coletadas durante este estudo, incluindo o acesso ao seu prontuário médico, dados pessoais, dados de pesquisa (por exemplo, idade, peso, altura, pressão arterial, hábitos e medicamentos em uso), datas de consultas e procedimentos, relatórios médicos e resultados de exames, serão mantidas em sigilo e somente os pesquisadores responsáveis pela pesquisa poderão ter acesso às suas informações.

ARMAZENAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO – BIORREPOSITÓRIO

As amostras biológicas cedidas para pesquisa serão armazenadas no Biorrepositório identificado como “Amostras de células do *cumulus*, oócitos e sangue periférico de mulheres com Síndrome dos Ovários Policísticos e de mulheres com ciclos menstruais regulares para análise do comprimento do telômero e atividade da telomerase” e tem como objetivo, como o próprio nome diz, armazenar amostras de células do *cumulus*, oócitos e sangue periférico das voluntárias participantes da pesquisa.

Você terá toda garantia da possibilidade de acesso gratuito aos resultados obtidos com a utilização do seu material biológico (Resolução CNS nº 441 de 2011, item II.b): informações de armazenamento, incluindo as garantias de qualidade da conservação e integridade de seu material biológico; informações genéticas associadas ao seu material biológico humano armazenado; bem como as medidas para garantir a privacidade e a confidencialidade; a designação das pessoas que poderão ter acesso à sua informação genética, em caso de óbito ou condição incapacitante (Portaria MS 2201 de 2011, artigo 8).

Todos os resultados de exames e testes somente serão acessíveis aos pesquisadores responsáveis pela pesquisa e não será permitido o acesso a terceiros (Resolução nº 340 item V.1.f).

Com a finalização do estudo, o material biológico continuará sendo armazenado no prazo máximo de dez anos para qualquer necessidade de replicação dos resultados. Após este período, o material será devidamente descartado de forma sigilosa.

REGISTRO DO ESTUDO PESQUISA

A pesquisa não será registrada.

CUSTOS E REMUNERAÇÃO

Como as amostras para o estudo serão coletadas no mesmo dia da coleta de óvulos, não haverá necessidade da sua vinda ao laboratório apenas para a coleta de material de pesquisa, não sendo necessário o ressarcimento quanto à alimentação/transporte. Caso o voluntário da pesquisa sintasse lesado de alguma forma, pode recorrer aos dispositivos legais para eventuais indenizações, lembrando-se que não haverá quebra de sigilo e que os óvulos ou sangue coletados não serão utilizados de forma alguma para qualquer outro tipo de procedimento que não fora proposto por esta pesquisa.

NO CASO DE DANO RELACIONADO À PESQUISA

Caso você sofra algum dano como resultado de qualquer atividade da pesquisa, os pesquisadores responsáveis e a própria instituição irão proporcionar assistência imediata, bem como se responsabilizarem pela assistência integral pelo tempo que for necessário no que se refere a complicações e danos decorrentes da pesquisa (Resolução CNS nº 466 de 2012, item V.6).

De forma alguma, o presente termo renuncia os direitos legais do participante ou isenta o investigador, a instituição, o patrocinador ou seus representantes das responsabilidades legais caso haja algum dano.

CONTATO PARA MAIS INFORMAÇÕES

Os pesquisadores estarão disponíveis para responder a quaisquer perguntas que você possa ter em relação ao tratamento descrito ou os procedimentos do estudo. Se você tiver alguma dúvida sobre esta pesquisa, você pode entrar em contato com Daiana Cristina Chielli Pedroso, no Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP – Fone: (16) 3602-2926 / (16) 996091861 – daia.pedroso@hotmail.com.

Se você tem alguma dúvida sobre seus direitos como um participante de pesquisa, entre em contato com o médico do estudo ou o seu médico de confiança. Caso você quiser falar com

alguém não diretamente envolvido neste estudo sobre os seus direitos, preocupações, você pode se comunicar com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo no Campus Universitário, S/N, Monte Alegre, Prédio Central, Subsolo - 14048-900 – Ribeirão Preto/SP, em 16 3602 2228 com horário de funcionamento de Segunda a Sexta-feira das 08hrs00min às 17hrs00min.

Você também poderá entrar em contato, caso se sentir coagido para aceitar ou continuar a participar da pesquisa.

CONSENTIMENTO

Ao assinar e datar este formulário, você irá confirmar que foi suficiente informado sobre a natureza, a finalidade, a duração e os riscos deste estudo. Confirma também que foi capaz de discutir dúvidas em detalhes com o pesquisador, e que estas, foram completamente e satisfatoriamente respondidas.

Você receberá uma via assinada deste formulário e a outra via ficará com o pesquisador.

_____ Nome da Participante	_____ Assinatura	_____ Data e horário
_____ Nome do Pesquisador	_____ Assinatura	_____ Data e horário
_____ Nome da Testemunha (se necessário)	_____ Assinatura	_____ Data e horário