

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia

Células-tronco endometriais: isolamento, caracterização e efeitos na viabilidade e capacidade de migração após tratamento com Citrato de Clomifeno

Débora Helena Zanini Gotardi

Porto Alegre, 2022

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia

Células-tronco endometriais: isolamento, caracterização e efeitos na viabilidade e capacidade de migração após tratamento com Citrato de Clomifeno

Débora Helena Zanini Gotardi

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Paula Barros Terraciano

Coorientador: Prof. Dr. Markus Berger Oliveira

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre, 2022

CIP - Catalogação na Publicação

Gotardi, Débora Helena Zanini
Células-tronco endometriais: isolamento,
caracterização e efeitos na viabilidade e capacidade
de migração após tratamento com Citrato de Clomifeno /
Débora Helena Zanini Gotardi. -- 2022.
63 f.
Orientadora: Paula Barros Terraciano.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e
Obstetrícia, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. células-tronco mesenquimais. 2. células-tronco
endometriais. 3. citrato de clomifeno. I. Terraciano,
Paula Barros, orient. II. Título.

“Um cientista no seu laboratório não é apenas um técnico: é, também, uma criança colocada à frente de fenômenos naturais que impressionam como se fosse um conto de fadas.”

Marie Curie

À memória aos meus avôs, Luiz e Genuíno,
pelo incentivo e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, em especial, à Paula, que desde 2014 acompanha a minha trajetória acadêmica, e aceitou participar de mais uma etapa.

À equipe do Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular, que me acolheu tão bem durante esses anos.

Aos meus amigos, por estarem ao meu lado e tornarem tudo mais fácil.

À Raquel, que foi uma companheira de experimentos e se tornou muito mais que colega de iniciação científica e mestrado. Muito obrigada pela parceria, amiga.

Às meninas do setor de assuntos regulatórios do Escritório de Projetos do HCPA, Carol, Paula e Roze. Muito obrigada pela compreensão de vocês principalmente nesses últimos meses. Obrigada pelo apoio emocional e pelo auxílio nas revisões. Vocês se tornaram mais que colegas de trabalho.

À chefia do Escritório de Projetos do HCPA, Rafael, que compreendeu as minhas ausências nos últimos dias e incentivou a minha dedicação ao término deste trabalho.

À minha família, em especial aos meus pais. Vocês sempre me incentivaram a seguir e nunca desistir. Esse trabalho é pra vocês também.

Por fim, a todos os envolvidos na elaboração e na correção deste trabalho. Muito obrigada pela contribuição de vocês.

Muito obrigada a todos que tornaram esse momento possível!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	8
LISTA DE FIGURAS	9
RESUMO	10
ABSTRACT	12
5. INTRODUÇÃO	13
6. REVISÃO DA LITERATURA	15
6.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações	15
6.2 Mapa conceitual	16
6.3 Células-tronco	17
6.4 Células-tronco mesenquimais	20
6.5 Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido endometrial	22
6.6 Infertilidade	24
6.7 Reprodução Assistida	25
6.8 Estimulação Ovariana Controlada	28
6.9 Citrato de Clomifeno	28
7. JUSTIFICATIVA	30
8. HIPÓTESES	31
8.1 Hipótese Alternativa	31
8.2 Hipótese Nula	31
9. OBJETIVOS	32
9.1 Objetivo principal	32
9.2 Objetivos secundários	32

10.	REFERÊNCIAS	33
11.	ARTIGO EM INGLÊS	42
12.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
13.	PERSPECTIVAS	63
14.	ANEXOS	64
14.1	ANEXO I	64
14.2	ANEXO II	65

1. LISTA DE ABREVIATURAS

SC – células-tronco; do inglês, *Stem Cell*

MSC – células-tronco mesenquimais; do inglês *Mesenchymal Stem Cell*

eMSC – células-tronco endometriais; do inglês *Endometrial Stem Cell*

HLA – Antígeno Leucocitário Humano; do inglês, *Human Leucocyte Antigen*

SDF1 – Fator Derivado de Estroma; do inglês, *Stromal Cell-Derived Factor 1*

PDGF – fator de crescimento derivado de plaquetas; do inglês, *Platelet-Derived Growth Factor*

TNF α – Fator de Necrose Tumoral α ; do inglês, *Tumor necrosis factor α*

RA – Reprodução Assistida

IST – Infecção Sexualmente Transmissível

EOC – Estimulação Ovariana Controlada

IIU – Inseminação Intrauterina

FIV – Fertilização *in vitro*

ICSI – Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide; do inglês, *Intracytoplasmic Sperm Injection*

GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofina; do inglês, *Gonadotropin-Releasing Hormone*

hCG – Gonadotrofina Coriônica Humana, do inglês, *Human Chorionic Gonadotropin*

SHO – Síndrome de Hiperestimulação Ovariana

CC – Citrato de Clomifeno

2. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Potencial das células-tronco	17
Figura 2. Característica das células-tronco totipotentes	18
Figura 3. Característica das células-tronco pluripotentes.	19
Figura 4. Característica das células-tronco multipotentes	20
Figura 5. Ciclo do endométrio	23
Figura 6. Técnica de Inseminação Intrauterina	26
Figura 7. Técnica de Fertilização <i>in vitro</i>	27
Figura 8. Técnica de Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide (ICSI)	28

3. RESUMO

Introdução: Muitos casais inférteis buscam ajuda na reprodução assistida para realizar o desejo de uma gestação. Diversas técnicas podem ser utilizadas, devendo ser escolhida de acordo com a causa da infertilidade e das características e condições clínicas da mulher. A estimulação ovariana controlada consiste na administração de hormônios e/ou fármacos capazes de induzir a maturação de diversos folículos. Muito utilizado, o citrato de clomifeno é um agonista parcial, que se liga aos receptores estrogênicos no hipotálamo, resultando em maturação dos folículos e ovulação. **Objetivo:** O objetivo deste trabalho é padronizar a técnica de isolamento e caracterização de células-tronco endometriais. Além disso, observar os efeitos do tratamento com citrato de clomifeno na capacidade de migração e viabilidade das células em cultura. **Metodologia:** As células foram isoladas e mantidas em cultura até atingirem confluência de 80-90%. Foram realizados ensaios de caracterização das células-tronco, como diferenciação em outros tipos celulares, ensaio de clonogenicidade e citometria de fluxo. Após o tratamento com 6 diferentes concentrações de citrato de clomifeno por 24 horas, foi avaliada a capacidade de migração e a viabilidade das células. **Resultados:** Foi possível padronizar a extração e cultivo das eMSC, além de confirmar a capacidade de diferenciação das células em adipócitos, condrócitos e osteócitos. As células em cultura mantiveram sua capacidade de formar colônia e apresentaram os marcadores de superfície específicos de células-tronco mesenquimais (CD73, CD90 e CD105) e negativos para os marcadores de células dendríticas (CD11b) e de células-tronco hematopoiéticas (CD45). Após o tratamento com 5nM, 25nM, 50nM, 250nM, 500nM e 1000nM de citrato de clomifeno as células mantiveram sua capacidade de proliferação e migração e quando receberam o tratamento com 5nM, 25nM, 50nM, 250nM, 500nM apresentaram maior viabilidade quando comparadas com o grupo controle e o grupo que recebeu o tratamento com 1000nM de citrato. **Conclusão:** É possível extrair e manter em cultivo células-tronco mesenquimais do tecido endometrial. Apesar dos resultados favoráveis em relação a viabilidade e capacidade de migração são necessários mais estudos para verificar o efeito do citrato em cultura celular.

Palavras-chave: células-tronco mesenquimais, células-tronco endometriais, citrato de clomifeno, viabilidade celular, migração celular, caracterização de células-tronco

4. ABSTRACT

Introduction: Many infertile couples seek help in assisted reproduction to fulfill their desire for a pregnancy. Several techniques can be used, and should be chosen according to the cause of infertility and the characteristics and clinical conditions of the woman. Controlled ovarian stimulation consists of the administration of hormones and/or drugs capable of inducing the maturation of several follicles. Widely used, clomiphene citrate is a partial agonist, which binds to estrogen receptors in the hypothalamus, resulting in follicle maturation and ovulation.

Objective: The objective of this work is to standardize the technique of isolation and characterization of endometrial stem cells. In addition, to observe the effects of clomiphene citrate treatment on the migration capacity and viability of cells in culture. **Methodology:** Cells were isolated and maintained in culture until reaching 80-90% confluence. Stem cell characterization assays were performed, such as differentiation into other cell types, clonogenicity assay and flow cytometry. After treatment with 6 different concentrations of clomiphene citrate for 24 hours, the migration capacity and cell viability were evaluated.

Results: It was possible to standardize the extraction and cultivation of eMSCs, in addition to confirming the ability of cells to differentiate into adipocytes, chondrocytes and osteocytes. Cells in culture maintained their ability to form colonies and showed surface markers specific for mesenchymal stem cells (CD73, CD90 and CD105) and negative for markers for dendritic cells (CD11b) and hematopoietic stem cells (CD45). After treatment with 5nM, 25nM, 50nM, 250nM, 500nM and 1000nM of clomiphene citrate the cells maintained their ability to proliferate and migrate and when they received treatment with 5nM, 25nM, 50nM, 250nM, 500nM they showed greater viability when compared to the control group and the group that received the treatment with 1000nM of citrate. **Conclusion:** It is possible to extract and maintain in culture mesenchymal stem cells from endometrial tissue. Despite the favorable results regarding viability and migration capacity, further studies are needed to verify the effect of citrate in cell culture.

Keywords: mesenchymal stem cells, endometrial stem cells, clomiphene citrate, cell viability, cell migration, stem cell characterization

5. INTRODUÇÃO

Infertilidade é definida como a incapacidade de gerar uma gestação após 12 meses ou mais de relações sexuais frequentes e sem a utilização de métodos de prevenção (OMS, 2004). As causas da infertilidade são inúmeras: fatores masculinos (BLICKENSTORFER et al., 2018; SCHUPPE; KÖHN, 2018), fatores psicológicos (FARINATI; RIGONI; MÜLLER, 2006), idade da mulher (FARQUHAR et al., 2019), sobrepeso feminino (GASKINS, 2018), disfunções ovulatórias, anormalidades uterinas, obstrução tubária, fatores peritoneais e cervicais (LINDSAY, 2015). As novas tecnologias na área da Reprodução Assistida (RA) têm possibilitado diversas alternativas terapêuticas para a infertilidade, aumentando as chances de gravidez. A estimulação ovariana controlada (EOC) é utilizada em algumas dessas técnicas, como por exemplo, na inseminação intrauterina (IIU) (SOYSAL; OZMEN, 2018), na injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) e na fertilização in vitro (FIV) (COSKUN et al., 2018; RODRÍGUEZ; CARLOS, 2009).

A EOC consiste na administração de hormônios ou fármacos capazes de induzir o amadurecimento de um maior número de folículos possível (KUSHNIR et al., 2018; LEW, 2018). O Citrato de Clomifeno (CC) é uma droga capaz de induzir a ovulação e é muito utilizado nas técnicas de IIU e FIV (DANHOF et al., 2017; DELBOS et al., 2018; FERRARETTI et al., 2015), em pacientes com endometriose (LEUNG; DAHAN, 2016), em casos de infertilidade sem causa definida (COSKUN et al., 2018), em casos de síndrome de ovários policísticos, e também em casos de infertilidade por fatores masculinos (COOLEY et al., 2012).

Apesar de muito utilizado, estudos in vivo demonstram que a indução da ovulação com o CC retarda o amadurecimento do endométrio (ALMEIDA et al., 2011; CAETANO et al., 2005; MEHDINEJADIANI et al., 2018; PEERAER et al., 2015), prejudicando a implantação do embrião no ciclo em que o fármaco foi utilizado. Por outro lado, existem poucos estudos in vitro acerca de como o CC atua nas culturas celulares. Quando adicionado CC em cultura de células tumorais mamárias (HCC1937, receptores de estrogênio negativa e com mutação no gene BRCA 1), observou-se uma redução significativa ($p < 0,05$) na proliferação celular (COOLEY et al., 2012) porém, em células MCF-7 e LY2 (linhagens de célula tumoral mamária) foi observado um pequeno aumento na proliferação dessas células (HAN et al., 2002). Esses dados demonstram a importância de uma maior compreensão do mecanismo de ação do citrato

de clomifeno a nível celular e, com base nos dados gerados, buscar maneiras de otimizar a utilização do fármaco, trazendo melhores resultados para as pacientes.

6. REVISÃO DA LITERATURA

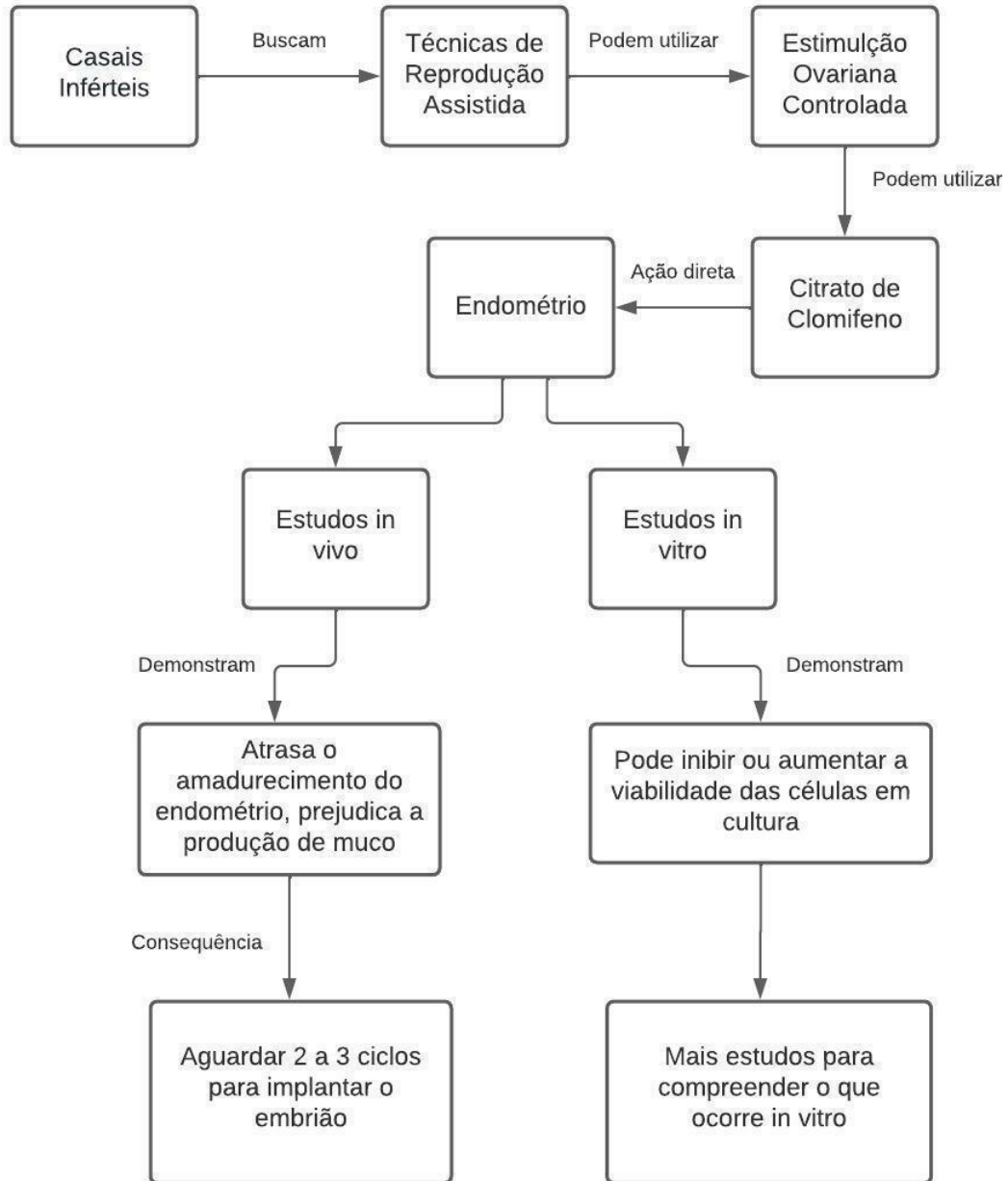
6.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações

Foi realizada uma busca eletrônica de artigos durante os meses de março a julho/2021 e novembro/2021 a fevereiro/2022, indexados em 02 (duas) bases de dados: PubMed e Scielo. Utilizaram-se os seguintes descritores: 1) *stem cells* 2) *endometrial stem cells* 3) *infertility* 4) *assisted reproductive technology* 5) *citrate clomiphene*.

Ao concluir a busca, os artigos foram selecionados a partir da leitura prévia de seus resumos. Aqueles que não contemplavam o propósito do estudo foram excluídos. Foram selecionadas as publicações que iam ao encontro dos objetivos propostos pelo estudo. Deu-se preferência para artigos publicados nos últimos 15 anos, assim como livros em meio físico e virtual com o objetivo de sustentar a questão de pesquisa. No total, foram utilizadas 79 publicações, entre artigos (74), teses (3) e dissertações (2). Também foram utilizados os sites oficiais da Sociedade Brasileira de Reprodução Assistida (SBRA), da Sociedade Europeia de Reprodução Humana e Embriologia (ESHRE), da Organização Mundial da Saúde (OMS) e da Associação Brasileira de Terapia Celular e Gênica (ABT Cel-Gen).

Descritor	PubMed	SciELO	Total de artigos utilizados
<i>stem cells</i>	178.644	701	23
<i>endometrial stem cells</i>	643	2	10
<i>infertility</i>	25.274	839	14
<i>assisted reproductive technology</i>	13.712	79	12
<i>citrate clomiphene</i>	677	21	15

6.2 Mapa conceitual

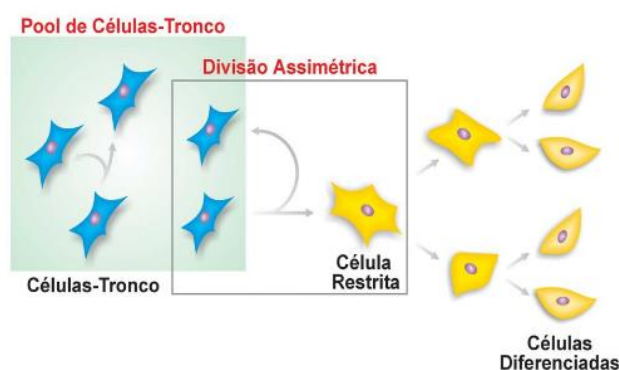


Muitos casais diagnosticados com infertilidade buscam na reprodução assistida a oportunidade de gerar filhos. Ao longo dos anos as técnicas de RA foram aprimoradas e o número de nascimentos é cada vez maior. Algumas dessas técnicas necessitam da utilização de fármacos para a estimulação ovariana controlada. Apesar de muito utilizado, estudos demonstram que o citrato de clomifeno possui efeitos deletérios no endométrio e na produção de muco, impossibilitando a implantação do embrião no mesmo ciclo da estimulação. Por outro lado, estudos *in vitro* demonstram que o citrato atua de formas diferentes em culturas celulares, dependendo da dose utilizada e do tipo celular. É de grande importância compreender como o citrato atua nas células-tronco endometriais para que possamos trazer benefícios às pacientes que utilizam o fármaco.

6.3 Células-tronco

Células-tronco (SC, do inglês *stem cells*) são células indiferenciadas que possuem capacidade de multiplicação mantendo seu estado indiferenciado ou podem ser capazes de se diferenciar em diferentes tipos celulares (WANG et al., 2019; YANG et al., 2018; ZAKRZEWSKI et al., 2019).

Figura 1 – Potencial das células-tronco. As células-tronco possuem a característica de divisão assimétrica, podendo originar células indiferenciadas e células com capacidade de diferenciação em diversos tipos celulares.

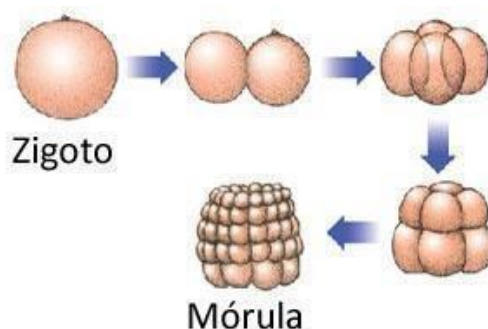


Fonte: ZAGO; COVAS, 2006.

As SC são classificadas de acordo com a sua origem de obtenção: (a) células-tronco embrionárias, que são isoladas de estágios iniciais do desenvolvimento embrionário (YAMANAKA, 2020) ou (b) células-tronco adultas, obtidas a partir de tecidos adultos (CIRNE-LIMA, 2007). Também podem ser classificadas de acordo com seu potencial de diferenciação (CIRNE-LIMA, 2007; DESIDERIO, 2017; LANCE, 2013; YAMANAKA, 2020), podendo ser:

- (a) Células-tronco totipotentes, que originam todos os tipos de células, inclusive tecidos embrionários e extraembrionários. Essa característica é exclusiva de células extraídas do zigoto e do embrião até o estágio de mórula (DESIDERIO, 2017; LANCE, 2013; ZAKRZEWISK et al., 2019);

Figura 2 – Característica das células-tronco totipotentes. As células-tronco totipotentes podem ser obtidas do zigoto ou do embrião até o estágio de mórula e são capazes de originar tecidos embrionários e extraembrionários.



Fonte: AGNES, 2014.

- (b) Células-tronco pluripotentes, que são encontradas no embrião, no estágio de blastocisto, e possuem a capacidade de gerar células dos três folhetos embrionários (endoderma, mesoderma e ectoderma), podendo originar todos os tipos de tecido, exceto os extraembrionários, como por exemplo a placenta (CIRNE-LIMA, 2007; COUSINS et al., 2021; DESIDERIO, 2017; LANCE, 2013; ZAKRZEWISK et al., 2019);

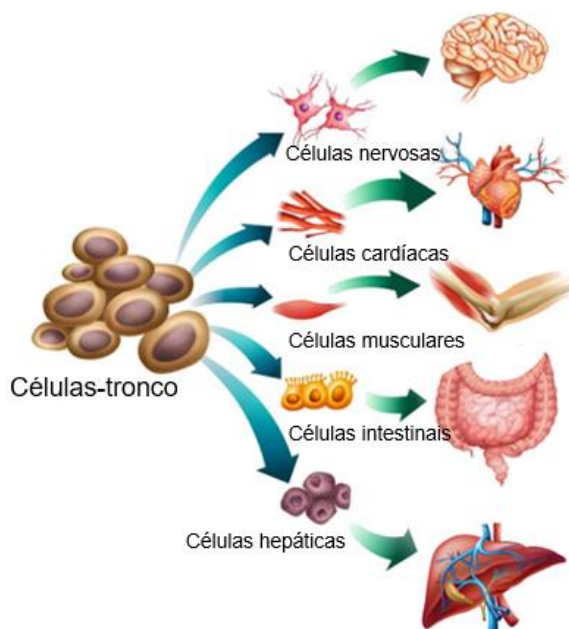
Figura 3 - Característica das células-tronco pluripotentes. Células-tronco pluripotentes são originadas da massa celular interna do blastocisto e possuem a capacidade de originar quase todos os tipos celulares, exceto os extraembrionários.



Fonte: BELAN, 2014.

- (c) Células-tronco multipotentes, que são capazes de originar vários tipos de células, são encontradas em todo o corpo, sendo a medula óssea, o cordão umbilical e o tecido adiposo alguns exemplos de fontes de extração dessas células (CIRNE-LIMA, 2007; DESIDERIO, 2017; LANCE, 2013; ZAKRZEWSKI et al., 2019).

Figura 4 - Característica das células-tronco multipotentes. Células-tronco multipotentes podem ser extraídas de diversas fontes (tecido adiposo, medula óssea polpa dentária e etc.), e são capazes de originar diversos tipos celulares, que formam diferentes tecidos.



Fonte: adaptado de SORDELLI, 2017.

6.4 Células-tronco mesenquimais

As células-tronco mesenquimais (MSC, do inglês *mesenchymal stem cells*) foram descritas pela primeira vez por Friedenstein et al. em 1966 (AFANASYEV; ELSTNER; ZANDER, 2009) e são células multipotentes que se destacam devido a sua aderência seletiva (BYDLOWSKI et al., 2009; MUSHAHARY et al., 2018; WEISS; DAHLKE, 2019) e a sua alta plasticidade, podendo se diferenciar em diversos tipos celulares, como osteoblastos, condrócitos, adipócitos, neurônios, células epiteliais e outras, dependendo das condições de cultivo (ALVES et al., 2017; BLAU et al., 2001; CHEN; HE; LU, 2018; FU et al., 2019; MAZINI et al., 2019; MIANA; GONZÁLEZ, 2018).

Podemos isolar células-tronco mesenquimais de diversas fontes (LIN et al., 2019), em maior ou menor quantidade, como por exemplo: medula óssea (MORRISON; SCADDEN, 2014), pele, sangue periférico, fígado, pâncreas, vasos sanguíneos, pulmão, líquido amniótico (BOBIS; JAROCHA; MAJKA, 2006), sangue do cordão umbilical (DING et al., 2015; URANIO et al., 2011). As MSC possuem a capacidade de se expandir diversas vezes em

cultura, mantendo seu potencial de crescimento e pluripotencialidade (BYDLOWSKI et al., 2009); porém, conforme o aumento do tempo de cultivo, pode-se observar a diminuição da proliferação das células-tronco mesenquimais.

Segundo a *International Society for Cellular Therapy*, as MSC devem expressar os marcadores CD73, CD90 e CD105 (GÓMEZ et al., 2020), e não devem expressar CD34 (marcador de células-tronco hematopoiética) (SEITA; WEISSMAN, 2010; YU; SCADDEN, 2016), CD11b, CD14, CD19 ou CD79 (marcadores de célula imune) (COSTA et al., 2020; KORKOLOPOULOU et al., 1994) e HLA classe II em mais de 95% das células em cultura (BYDLOWSKI et al., 2009; VIDOR, 2015).

Muitos sinais químicos e biológicos são responsáveis pela indução da diferenciação *in vitro* das células-tronco mesenquimais. O TGF- β (do inglês *Transforming Growth Factor* beta) é o principal fator indutor da diferenciação de MSC em condrócitos (XU, 2020); várias vias de sinalização intracelular são ativadas e induzem fatores de transcrição (SOX9, SOX5 e SOX6) que levam à produção de proteínas de matriz celular, incluindo colágeno do tipo II, importante na formação de cartilagem (BYDLOWSKI et al., 2009; NARDI, 2010). Meio suplementado com β -glicerolfosfato pode induzir a diferenciação osteogênica. Dexametasona, insulina e indometacina estimulam, por sua vez, o potencial de diferenciação adipogênico (NARDI, 2010).

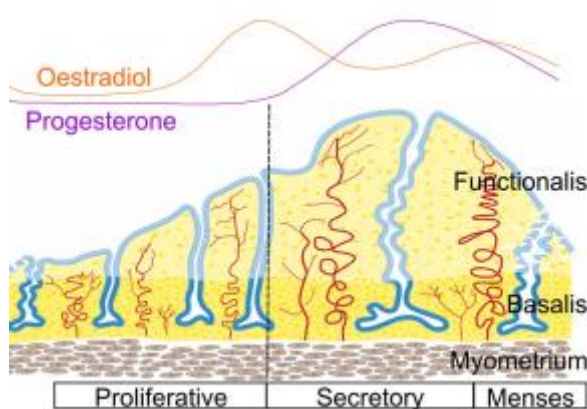
Quando expostas a outros tipos celulares ou a condições que mimetizam ambientes de tecidos que sofreram lesões, as MSC são capazes de responder e modular suas funções. Demonstram quimiotaxia *in vitro* pelo fator derivado de estroma (SDF1), PDGF (*platelet-derived growth factor*), *insulin-like growth factor-1*, interleucina-8 e fator de necrose tumoral α (TNF α) (VIDOR, 2015). Os mecanismos terapêuticos das MSC ainda estão sendo estudados, mas observa-se alguns principais mecanismos (YAO et al., 2020): a migração celular, que consiste no deslocamento das MSCs migrarem para a região lesionada (LIESVELD; SHARMA; ALJITAWI, 2020); a sinalização autócrina/parácrina e a imunorregulação, onde as MSCs secretam uma série de fatores de crescimento, citocinas e enzimas, que desempenham papel importante para a migração celular e regulação imunológica (LING et al., 2019). Esses fatores podem desencadear mecanismos intracelulares ou atuam diretamente promovendo a secreção de moléculas bioativas nas células vizinhas, que podem atenuar o dano, inibir a

apoptose e fibrose e podem promover também a angiogênese e modular as respostas imunes (TAKEHARA et al., 2013).

6.5 Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido endometrial

O endométrio é a camada mucosa que reveste a parede interna do útero. É um tecido altamente vascularizado e com um grande número de glândulas especializadas, além de células musculares lisas, células endoteliais e leucócitos (COUSINS et al., 2021). Pode ser dividido em duas camadas: a camada funcional (superficial) e a camada basal. É na camada superficial que estão presentes o epitélio superficial e a porção mais superior das glândulas endométrio. É constituído por um tecido conjuntivo frouxo, ricamente vascularizado (SASSO et al., 2017). Durante o ciclo menstrual a camada externa funcional é eliminada e, paralelamente, as células da superfície do tecido já iniciam sua fase proliferativa (MONTENEGRO, 2018) para reepitelização. Já a camada basal, localiza-se ao lado do miométrio, parte intermediária do útero, e abaixo da camada funcional. Nessa camada encontram-se a região basal das glândulas endometriais e um estroma denso. Não sofre descamação e serve como compartimento proliferativo para restauração do tecido (SASSO et al., 2017).

Figura 5: Ciclo do endométrio. O endométrio é um tecido de remodelação dinâmica e sofre ciclos de regeneração, diferenciação e descamação. Na fase proliferativa, que ocorre logo após a menstruação, o estrogênio estimula a proliferação de células da camada funcional. Já na fase secretora, a progesterona e o estrogênio preparam o endométrio tornando um ambiente favorável a uma possível nidação do embrião. E é na fase menstrual que ocorre a descamação do tecido devido a redução dos níveis séricos hormonais.



Fonte: SASSO et al., 2017.

Desde o século 20 observa-se a possibilidade do tecido endometrial humano possuir células-tronco, mas somente em 2004 publicou-se a primeira evidência da existência dessas células (CHAN; SCHWAB; GARGETT, 2004). Chan et al. Descreveu pela primeira vez a clonogenicidade do epitélio, ou seja, a capacidade de formação de colônias em células plaqueadas em concentrações pequenas (BOZORGMEHR et al., 2020; CHAN; SCHWAB; GARGETT, 2004), importante característica para identificação de células-tronco. As células-tronco mesenquimais do endométrio (eMSC) são células multipotentes que podem ser facilmente isoladas a partir do tecido endometrial, sendo obtidas de forma não invasiva e sem necessidade de anestesia, através de uma biópsia simples (CHAN; SCHWAB; GARGETT, 2004; GARGETT; SCHWAB; DEANE, 2016; SASSO et al., 2017; YANG et al., 2018) ou então isoladas a partir de histerectomia, sangue menstrual e também da decídua no primeiro trimestre de gestação (SASSO et al., 2017).

Uma análise fenotípica mostrou que as células-tronco isoladas do fluxo menstrual apresentaram marcações diferentes das células derivadas da medula óssea, expressando tanto os marcadores de células hematopoiéticas (CD34, CD35, CD38, CD45 ou HLA-DR) como marcadores de células tronco-mesenquimais (CD29, CD44, CD73, CD90 e CD105) (LING et al., 2019; RUNGSIWIWUT; VIRUTAMASEN; PRUKSANANONDA, 2020; WASILEWSKI et al., 2020). Também apresentou marcação para Oct-4, SSEA-4, Nanog e CD117, explicando sua alta capacidade proliferativa e plasticidade celular (DING et al., 2015).

Não se sabe ao certo a origem das eMSC. Várias teorias sobre sua origem têm sido propostas, como a derivação de células-tronco fetais residuais e o recrutamento de células-tronco perivasculares ou da medula óssea (CHAN; SCHWAB; GARGETT, 2004; (TEMPEST; MACLEAN; HAPANGAMA, 2018). Apesar disso, as eMSC têm sido alvo de diversos estudos devido suas propriedades antiinflamatórias e imunossupressoras, e a sua potencial utilização na terapia regenerativa, promovendo angiogênese e prevenindo fibrose (TEMPEST; MACLEAN; HAPANGAMA, 2018; YANG et al., 2018).

6.6 Infertilidade

A infertilidade é definida pela incapacidade de engravidar após 12 meses de relações sexuais regulares e sem a utilização de métodos contraceptivos (LINDSAY; VITRIKAS, 2015; OMS, 2021; SBRA, 2019) e estima-se que afeta cerca de 8 a 12% dos casais em idade reprodutiva, podendo chegar a 30% em algumas regiões do mundo, como na Europa Central e

oriental, na Ásia Central e do Sul e na África Subsaariana (WASILEWSKI et al., 2020). A infertilidade é um problema sério do ponto de vista psicológico, uma vez que está associada com o aumento do nível de estresse e diminuição do humor, além da diminuição da autoestima e sensação de insegurança (MALINA; BŁASZKIEWICZ; OWCZARZ, 2016), causando um impacto negativo na satisfação da relação entre os parceiros.

Existem diversos fatores associados a infertilidade, sendo cerca de 25 a 39% por fatores masculinos, de 33 a 41% por fatores femininos e de 9 a 39% dos casos fatores mistos, ou seja, uma combinação de fatores masculinos e femininos (LINDSAY; VITRIKAS, 2015; TANBO; FEDORCSAK, 2017). Dentre os fatores masculinos podemos citar a varicocele, infecções sexualmente transmissíveis (ISTs), a exposição a toxinas, variações anatômicas que podem impedir o fluxo natural dos espermatozoides, disfunções hormonais e anormalidades cromossômicas (SHARMA; SAXENA; SINGH, 2018; STARC et al., 2019). Já as causas etiológicas da infertilidade feminina podem ser disfunções ovulatórias (síndrome do ovário policístico), disfunções hipotalâmicas, insuficiência ovariana, endometriose, obstrução tubária, infecções virais e ISTs e o histórico menstrual (ESTEVES et al., 2019; TANBO; FEDORCSAK, 2017). Adicionalmente ainda existem diversos fatores de risco que podem contribuir com a infertilidade, dentre elas estão o fumo, o uso de álcool, a obesidade e a idade paterna e materna.

6.7 Reprodução Assistida

A história da reprodução assistida teve seus primeiros registros em 1890, quando Walter Heape, professor da Universidade de Cambridge (Reino Unido), relatou o transplante de embriões em coelhos (KAMEL, 2013; SHARMA; SAXENA; SINGH, 2018). Em 1934, Gregório Pincus, implantou um embrião em desenvolvimento em uma coelha, mas somente em 1959, Min Chueh Chang, obteve evidências de sucesso da técnica de fertilização *in vitro* (FIV) ao conseguir coelhos nascidos vivos a partir de oócitos e espermatozoides de coelhos de pelagem preta (KAMEL, 2013).

A primeira gravidez humana por FIV foi relatada em 1973, em Melbourne (Austrália), mas infelizmente resultou em morte embrionária precoce (SOUZA; ALVES, 2016). Em 1977, os pesquisadores e especialistas em reprodução humana, Robert Goeffrey Edwards e Patrick Steptoe, fertilizaram um oócito e implantaram o embrião no útero de sua paciente. Em 25 de julho de 1978, Louise Brown nasceu pesando cerca de 2500 gramas (SHARMA; SAXENA;

SINGH, 2018). Com o nascimento de Louise o mundo comemorou o início de uma nova era na RA.

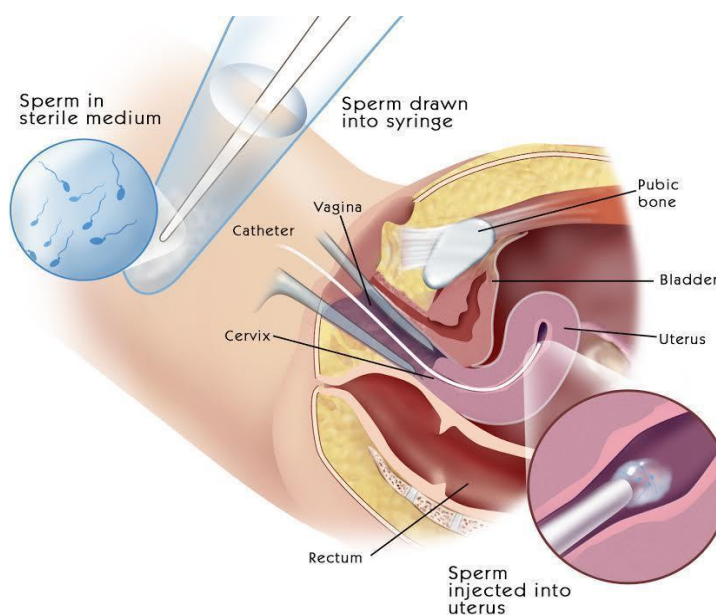
Em 2012 o Comitê Internacional de Monitoramento de Tecnologias de Reprodução Assistida (DE MOUZON et al., 2020) revelou que cerca de 1,5 milhões de procedimentos de RA são realizados em todo o mundo, e, segundo dados divulgados em 2018, no 34º Congresso da Sociedade Europeia de Reprodução Humana e Embriologia, desde 1978, cerca de 8 milhões crianças já vieram ao mundo com o auxílio da RA, sendo a ICSI e a FIV as técnicas mais utilizadas como método de fertilização.

As técnicas de RA englobam uma variedade de tratamentos clínicos e procedimentos laboratoriais com a intenção de estabelecer uma gestação (MONTENEGRO, 2018). Dentre os procedimentos, podemos incluir:

(a) Inseminação Intrauterina (IIU)

Um dos métodos mais utilizados por ser uma técnica de baixa complexidade e menos invasiva. Ocorre o processamento dos espermatozoides em laboratório e logo após, ocorre a introdução do material no útero da paciente durante a fase de ovulação (SOUZA; ALVES, 2016).

Figura 6: Técnica de Inseminação Intrauterina.

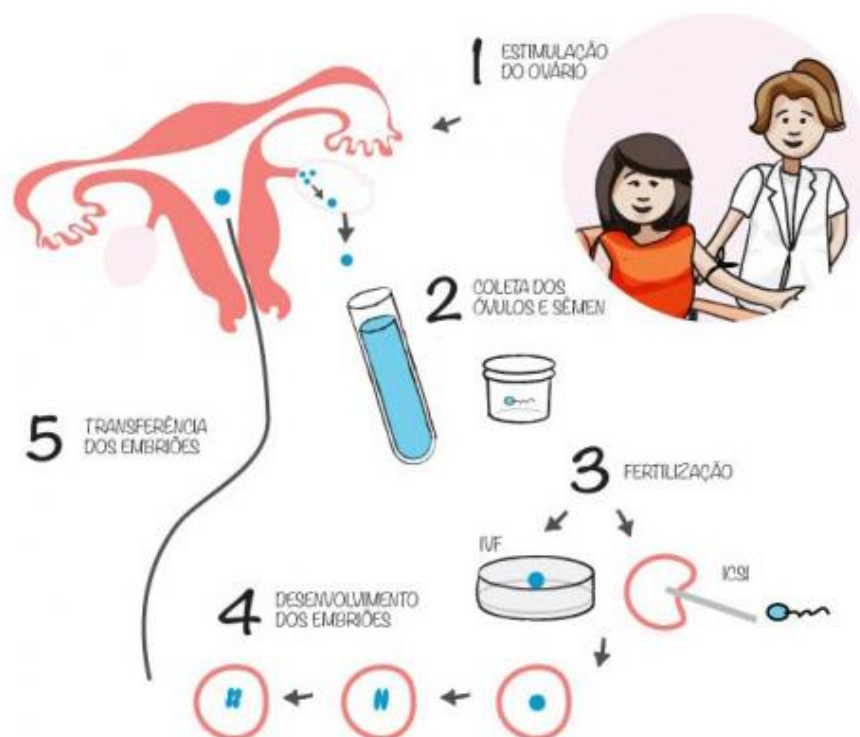


Fonte: <https://redrockfertility.com/intrauterine-insemination-iii/> // acesso em 20/02/2022 às 15h51.

(a) Fertilização *in vitro* (FIV)

Considerada a técnica mais complexa da RA e pode ser utilizada para tratar a infertilidade decorrente de oligospermia, anticorpos espermáticos, disfunções tubárias ou endometriose e também em casos de infertilidade inexplicada (JOHNSON, 2019; SOUZA; ALVES, 2016). Inicialmente realiza-se a EO com CC e/ou gonadotrofinas para aumentar o número de oócitos disponíveis para a fertilização (ESKEW; JUNGHEIM, 2017). O controle do desenvolvimento folicular é acompanhado através de ultrassom. Logo após a punção do folículo, é realizada a fertilização do oócito com o espermatozóide e os embriões são cultivados em ambiente controlado até o momento da transferência. O número de embriões a serem transferidos é determinado pela idade da mulher e pela probabilidade de resposta à FIV (JOHNSON, 2019). Pode-se optar pelo congelamento dos embriões que não forem transferidos.

Figura 7: Técnica de Fertilização *in vitro*.

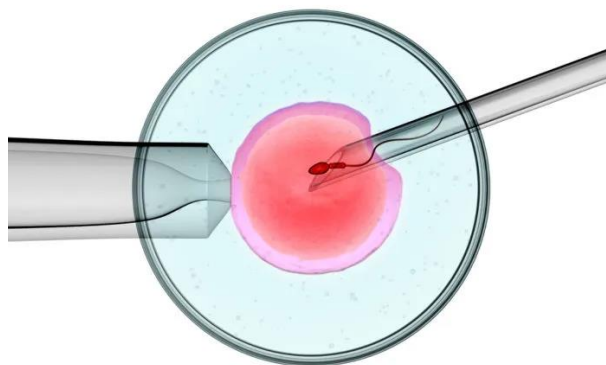


Fonte: <https://www.vivita.com.br/tratamentos/icsi/> // acesso em 19/01/2022 às 13h19.

(c) Injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)

Os oócitos são obtidos como na FIV, porém um único espermatozóide é injetado em cada oócito. O embrião é então cultivado em ambiente controlado até o momento da transferência. Essa técnica pode representar maior risco de problemas de nascimento, pois o próprio procedimento pode danificar o espermatozóide, o óvulo ou o embrião (SOUZA; ALVES, 2016).

Figura 8: Técnica de Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide (ICSI).



Fonte: <https://materprime.com.br/o-que-e-icsi/> // acesso em 19/01/2022 às 13h14.

6.8 Estimulação Ovariana Controlada

Uma etapa importante nas técnicas de RA é a estimulação ovariana controlada (EOC). A EOC normalmente ocorre através da administração de gonadotrofinas exógenas (JOHNSON, 2019; TANBO et al., 2018). Um agonista ou antagonista do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) é utilizado para impedir que ocorra a ovulação antes do amadurecimento dos oócitos. Em seguida, é administrado doses de gonadotrofina coriônica humana (hCG) para estimular a ovulação ou, em casos de alto risco de síndrome de hiperestimulação ovariana (SHO), utiliza-se agonistas de GnRH (DIAMOND et al., 2015). Entretanto, esse tipo de estimulação apresenta alto custo e requer o uso de injeções diárias, contribuindo para tornar o tratamento incômodo e inacessível a muitos pacientes. Desde o final do século 20 estuda-se novos protocolos de EOC que sejam seguros e mais acessíveis.

6.9 Citrato de Clomifeno

O citrato de clomifeno (CC) é utilizado como tratamento para mulheres com ovulação irregular devido a disfunção hipotálamo-hipofisária associada a níveis basais normais de estradiol endógeno, grupo II OMS (FEH; WADHWA, 2021; TANBO; FEDORCSAK, 2017). É um agente não esteróide, com propriedades estrogênicas e antiestrogênicas, que pode induzir a ovulação. Age competindo com o estrogênio endógeno nos receptores estrogênicos hipotalâmicos, aumentando a produção de gonadotrofinas pituitárias, produzindo aumento na secreção de FSH, que por sua vez, estimula o crescimento dos folículos ovarianos (FEH; WADHWA, 2021; HUGHES et al., 2010; YILMAZ et al., 2018). Assim, quando o folículo cresce, há também o aumento do LH, o que resulta em estimulação ovariana, com consequente maturação do folículo ovariano e desenvolvimento do corpo lúteo (MEDLEY SANOFI, 2016).

As vantagens de utilizar o CC são o baixo custo e a via de administração (via oral) (FIEDLER; LUDWIG, 2003). Porém devido a sua ação antiestrogênica, pode ser prejudicial ao endométrio e ao muco cervical, causando a diminuição da proliferação endometrial e retardo do crescimento glandular (CETIN; SIBLINI; AL-HENDY, 2021), além de desenvolver menos folículos, quando comparado às gonadotrofinas injetáveis (BECHTEJEW et al., 2017; DIAMOND et al., 2015). Como o estímulo é maior que o usual, a EOC com a utilização de CC aumenta o risco de gestação múltipla e pode levar à síndrome de hiperestimulação ovariana (FEH; WADHWA, 2021; FIEDLER; LUDWIG, 2003; YILMAZ et al., 2018).

7. JUSTIFICATIVA

As células-tronco endometriais são células imunoprivilegiadas de fácil obtenção e podem ser utilizadas para tratamento de doenças na medicina reprodutiva e na medicina regenerativa. Observar a resposta *in vitro* após o tratamento com o citrato de clomifeno, favorecerá a compreensão de como o fármaco atua no tecido endometrial, trazendo benefícios para as mulheres submetidas à indução da ovulação, podendo favorecer a implantação embrionária e a gestação.

8. HIPÓTESES

8.1 Hipótese Alternativa

A utilização de Citrato de Clomifeno em cultura de células-tronco endometriais altera a atividade celular prejudicando as células.

8.2 Hipótese Nula

A utilização de Citrato de Clomifeno em cultura de células-tronco endometriais não altera a atividade celular e não é prejudicial às células.

9. OBJETIVOS

9.1 Objetivo principal

Padronizar a extração, o cultivo e a caracterização das células-tronco endometriais e investigar os efeitos do Citrato de Clomifeno na capacidade de migração e viabilidade das células.

9.2 Objetivos secundários

- I. Padronizar a técnica de isolamento de células-tronco do tecido endometrial;
- II. Caracterizar as células-tronco extraídas com marcadores específicos para células-tronco mesenquimais derivadas de tecido endometrial através da citometria de fluxo;
- III. Confirmar características de células-tronco pela capacidade de diferenciação celular em adipócitos, condrócitos e osteócitos;
- IV. Testar a clonogenicidade das células-tronco através do teste de formação de colônias;
- V. Testar os efeitos do Citrato de Clomifeno em diferentes concentrações na capacidade de migração das células em cultura;
- VI. Testar os efeitos do Citrato de Clomifeno em diferentes concentrações na viabilidade das células-tronco endometriais em cultura.

10. REFERÊNCIAS

AGNES, Giovanna. Embriologia. 2014. Disponível em: <<http://repassarinformacoes.blogspot.com/2014/09/biologia-embriologia.html>>. Acesso em: 17 jun. 2018.

ALMEIDA, J. P. M. et al. Estimulação ovariana controlada e inseminação intrauterina: uma terapia atual? **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 33, n. 11, p. 341–347, nov. 2011.

ALVES, E. G. L. et al. Isolamento e cultivo de células tronco mesenquimais extraídas do tecido adiposo e da medula óssea de cães. **Ciência Animal Brasileira**, v. 18, e-34050, p. 1- 14, 21 ago. 2017.

BECHTEJEW, T. N. et al. Clomiphene citrate and letrozole to reduce follicle-stimulating hormone consumption during ovarian stimulation: systematic review and meta-analysis. **Ultrasound in Obstetrics & Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology**, v. 50, n. 3, p. 315–323, set. 2017.

BLAU, H.m.; BRAZELTON, T.r.; WEIMANN, J.m.. The Evolving Concept of a Stem Cell. **Cell**, v. 105, n. 7, p. 829-841, jun. 2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00409-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00409-3)>. Acesso em: 22 jun. 2018.

BELAN, Fernando. **Tudo o que você precisa saber sobre células-tronco**. 2014. Disponível em: <<http://biologiamais.com.br/embriologia/tudo-o-que-voce-precisa-saber-sobre-celulastronco-37.html>>. Acesso em: 17 jun. 2018.

BLICKENSTORFER, K. et al. Are WHO recommendations to perform two consecutive semen analyses for reliable diagnosis of male infertility still valid? **The Journal of Urology**, v. 0, n. 0, 10 nov. 2018.

BOBIS, S.; JAROCHA, D.; MAJKA, M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. **Mesenchymal stem cells**, v. 44, n. 4, p. 215-30, 2006

BOZORGMEHR, M. et al. Endometrial and Menstrual Blood Mesenchymal Stem/Stromal Cells: Biological Properties and Clinical Application. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 497, 9 jul. 2020.

BYDLOWSKI, S. P. et al. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, p. 25–35, maio 2009.

CAETANO, J. P. J. et al. Comparação entre três esquemas de indução da ovulação para inseminação intra-uterina com relação à espessura endometrial e taxa de gravidez. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 27, n. 1, jan. 2005.

CETIN, E.; SIBLINI, H.; AL-HENDY, A. What Is the Mechanism of Poor Endometrial Proliferation in Patients With Unexplained Infertility After Clomiphene Citrate Treatment? **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 106, n. 11, p. e4776–e4777, 30 jun. 2021.

CHAN, R. W. S.; SCHWAB, K. E.; GARGETT, C. E. Clonogenicity of Human Endometrial Epithelial and Stromal Cells¹. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 6, p. 1738–1750, 1 jun. 2004.

CHEN, X.; HE, Y.; LU, F. Autophagy in Stem Cell Biology: A Perspective on Stem Cell Self-Renewal and Differentiation. **Stem Cells International**, v. 2018, 9131397, 21 jan. 2018.

CIRNE-LIMA, E. O. Stem Cells. **Clinical & Biomedical Research**, v. 27, n. 3, 2007.

COOLEY, A. et al. Effect of infertility treatment and pregnancy-related hormones on breast cell proliferation in vitro. **Human Reproduction (Oxford, England)**, v. 27, n. 1, p. 146–152, jan. 2012.

COSTA, G. C. et al. CD14 genotype and functional dichotomy of CD14⁺ and CD14⁻ cells are associated with activated immune response and development of Chagas dilated cardiomyopathy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 115, p. e200110, 2020.

COSKUN, B. et al. The role of anti-Mullerian hormone in predicting the response to clomiphene citrate in unexplained infertility. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 57, n. 5, p. 713–717, 1 out. 2018.

COUSINS, F. L. et al. The Elusive Endometrial Epithelial Stem/Progenitor Cells. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 640319, 9 abr. 2021.

DANHOF, N. et al. The SUPER study: protocol for a randomised controlled trial comparing follicle-stimulating hormone and clomiphene citrate for ovarian stimulation in intrauterine insemination. **BMJ Open**, v. 7, n. 5, 25 maio 2017.

DE MOUZON, J. et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies world report: assisted reproductive technology 2012†. **Human Reproduction**, v. 35, n. 8, p. 1900–1913, 1 ago. 2020.

DELBOS, L. et al. ConFIRM trial - conversion of in vitro fertilization cycles to intrauterine inseminations in patients with a poor ovarian response to stimulation: a protocol for a multicentric, prospective randomized trial. **Trials**, v. 19, 17 out. 2018.

DESIDÉRIO, David Lucas. **Efeito de Campos Magnéticos Estáticos e Compensados na Proliferação Celular In Vitro**. 2017. 109 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Bauru, 2017.

DIAMOND, M. P. et al. Letrozole, Gonadotropin, or Clomiphene for Unexplained Infertility. **The New England journal of medicine**, v. 373, n. 13, p. 1230–1240, 24 set. 2015.

DING, D.-C. et al. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells: A New Era for Stem Cell Therapy. **Cell Transplantation**, v. 24, n. 3, p. 339–347, 1 mar. 2015.

ESKEW, A. M.; JUNGHEIM, E. S. A History of Developments to Improve in vitro Fertilization. **Missouri Medicine**, v. 114, n. 3, p. 156–159, 2017.

ESTEVEZ, S. C. et al. Female infertility and assisted reproductive technology. **Panminerva Medica**, v. 61, n. 1, jan. 2019.

FARINATI, D. M.; RIGONI, M. DOS S.; MÜLLER, M. C. Infertilidade: um novo campo da Psicologia da saúde. **Estudos de Psicologia (Campinas)**, v. 23, n. 4, p. 433–439, dez. 2006.

FARQUHAR, C. M. et al. Female subfertility. **Nature Reviews. Disease Primers**, v. 5, n. 1, p. 7, 24 jan. 2019.

FEH, M. K. M.; WADHWA, R. **Clomiphene**. [s.l.] StatPearls Publishing, 2021.

FERRARETTI, A. P. et al. Mild ovarian stimulation with clomiphene citrate launch is a realistic option for in vitro fertilization. **Fertility and Sterility**, v. 104, n. 2, p. 333–338, ago. 2015.

FIEDLER, K.; LUDWIG, M. Use of clomiphene citrate in in vitro fertilization (IVF) and IVF/intracytoplasmic sperm injection cycles. **Fertility and Sterility**, v. 80, n. 6, p. 1521–1523, dez. 2003.

FU, X. et al. Mesenchymal Stem Cell Migration and Tissue Repair. **Cells**, v. 8, n. 8, p. E784, 28 jul. 2019.

GASKINS, A. J. Recent advances in understanding the relationship between long- and short-term weight change and fertility. **F1000Research**, v. 7, p. 1702, 26 out. 2018.

GÓMEZ, J. L. A. et al. Effects of canine adipose-derived mesenchymal stem cells on the epithelialization of rabbits' skin autograft (*Oryctolagus cuniculus*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 40, n. 12, p. 1018–1028, dez. 2020.

HAN, D.-H. et al. Relationship between estrogen receptor-binding and estrogenic activities of environmental estrogens and suppression by flavonoids. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 66, n. 7, p. 1479–1487, jul. 2002.

HUGHES, E. et al. Clomiphene citrate for unexplained subfertility in women. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2010, n. 1, p. CD000057, 20 jan. 2010.

JOHNSON, M. H. A short history of in vitro fertilization (IVF). **International Journal of Developmental Biology**, v. 63, n. 3-4-5, p. 83–92, 16 abr. 2019.

KAMEL, R. M. Assisted Reproductive Technology after the Birth of Louise Brown. **Journal of Reproduction & Infertility**, v. 14, n. 3, p. 96–109, 2013.

KORKOLOPOULOU, P. et al. The expression of the B-cell marker mb-1 (CD79a) in Hodgkin's disease. **Histopathology**, v. 24, n. 6, p. 511–515, 1994.

KUSHNIR, V. A. et al. Observational retrospective study of US national utilisation patterns and live birth rates for various ovarian stimulation protocols for in vitro fertilisation. **BMJ Open**, v. 8, n. 11, p. e023124, 1 nov. 2018.

LANCE - LABORATÓRIO NACIONAL DE CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS. **Lance**. Disponível em: <<http://biologia.ib.usp.br/lance/>>. Acesso em: 11 abr. 2018.

LEW, R. Natural history of ovarian function including assessment of ovarian reserve and premature ovarian failure. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, 28 jun. 2018.

LEUNG, A. S.; DAHAN, M. H. The benefits of other treatments than in vitro fertilization to aid conception in minimal and mild endometriosis. **Minerva Ginecologica**, v. 68, n. 6, p. 675–686, dez. 2016.

LIESVELD, J. L.; SHARMA, N.; ALJITAWI, O. S. Stem cell homing: From physiology to therapeutics. **Stem Cells**, v. 38, n. 10, p. 1241–1253, 1 out. 2020.

LIN, T. et al. Preconditioned or IL4-Secreting Mesenchymal Stem Cells Enhanced Osteogenesis at Different Stages. **Tissue Engineering. Part A**, v. 25, n. 15–16, p. 1096–1103, 1 ago. 2019.

LINDSAY, T. J. Evaluation and Treatment of Infertility. v. 91, n. 5, p. 7, 2015

LING, L. et al. Human amnion-derived mesenchymal stem cell (hAD-MSC) transplantation improves ovarian function in rats with premature ovarian insufficiency (POI) at least partly through a paracrine mechanism. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 10, p. 46, 25 jan. 2019.

MAZINI, L. et al. Regenerative Capacity of Adipose Derived Stem Cells (ADSCs), Comparison with Mesenchymal Stem Cells (MSCs). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 10, p. 2523, 22 maio 2019.

MEHDINEJADIANI, S. et al. Effects of letrozole and clomiphene citrate on Wnt signaling pathway in endometrium of polycystic ovarian syndrome and healthy women. **Biology of Reproduction**, 2018.

MONTENEGRO, Ivan Sereno. **Avaliação da maturidade endometrial em ciclo espontâneo e estimulado com citrato de clomifeno: uma coorte pareada.** 2018. 109 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

MORRISON, S. J.; SCADDEN, D. T. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. **Nature**, v. 505, n. 7483, p. 327–334, 16 jan. 2014.

NARDI, Nance Beyer. **Células-tronco Mesenquimais e Engenharia de Tecidos.** Porto Alegre: Laboratório de Células-tronco e Terapia Gênica, 2010.

PEERAER, K. et al. Low-dose human menopausal gonadotrophin versus clomiphene citrate in subfertile couples treated with intrauterine insemination: a randomized controlled trial. **Human Reproduction**, v. 30, n. 5, p. 1079–1088, 1 maio 2015.

RODRÍGUEZ, L.; CARLOS, J. Inducción de ovulación: conceptos básicos. **Rev. centroam. obstet. ginecol**, v. 14, n. 3, p. 120–123, 200909.

RUNGSIWIWUT, R.; VIRUTAMASEN, P.; PRUKSANANONDA, K. Mesenchymal stem cells for restoring endometrial function: An infertility perspective. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 20, n. 1, p. 13–19, 20 jul. 2020.

SASSO, G. R. DA S. et al. Células-tronco oriundas do fluxo menstrual: possíveis aplicações. **Reprodução & Climatério**, v. 32, n. 1, p. 39–42, 1 jan. 2017.

SEITA, J.; WEISSMAN, I. L. Hematopoietic Stem Cell: Self-renewal versus Differentiation. **Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine**, v. 2, n. 6, p. 640–653, 2010.

SHARMA, R. S.; SAXENA, R.; SINGH, R. Infertility & assisted reproduction: A historical & modern scientific perspective. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 148, n. Suppl, p. S10–S14, dez. 2018.

SOUZA, K. K. P. C. S. P.; ALVES, O. DE F. A. DE F. AS PRINCIPAIS TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO HUMANA ASSISTIDA. **SAÚDE & CIÊNCIA EM AÇÃO**, v. 2, n. 1, p. 26–37, 17 out. 2016.

SOYSAL, C.; OZMEN, U. Intrauterine insemination in ovulatory infertile patients. **Nigerian Journal of Clinical Practice**, v. 21, n. 10, p. 1374–1379, out. 2018.

STARC, A. et al. INFERTILITY AND SEXUAL DYSFUNCTIONS: A SYSTEMATIC LITERATURE REVIEW. **Acta Clinica Croatica**, v. 58, n. 3, p. 508–515, set. 2019.

TAKEHARA, Y. et al. The restorative effects of adipose-derived mesenchymal stem cells on damaged ovarian function. **Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology**, v. 93, n. 2, p. 181–193, fev. 2013.

TANBO, T. et al. Ovulation induction in polycystic ovary syndrome. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, v. 97, n. 10, p. 1162–1167, 2018.

TANBO, T.; FEDORCSAK, P. Endometriosis-associated infertility: aspects of pathophysiological mechanisms and treatment options. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, v. 96, n. 6, p. 659–667, 2017.

TEMPEST, N.; MACLEAN, A.; HAPANGAMA, D. K. Endometrial Stem Cell Markers: Current Concepts and Unresolved Questions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 10, p. E3240, 19 out. 2018.

URANIO, M. F. et al. Isolation, proliferation, cytogenetic, and molecular characterization and in vitro differentiation potency of canine stem cells from foetal adnexa: A comparative study of amniotic fluid, amnion, and umbilical cord matrix. **Molecular Reproduction and Development**, v. 78, n. 5, p. 361–373, 2011.

VIDOR, Silvana Bellini. **Células-Tronco Mesenquimais de Origem Adiposa Associadas a Enxertos Livres de Pele de Espessura Total em Modelo Murino**. 2015. 110 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

WANG, Y. et al. Long-Term Culture Captures Injury-Repair Cycles of Colonic Stem Cells. **Cell**, v. 179, n. 5, p. 1144–1159.e15, nov. 2019.

WASILEWSKI, T. et al. Biochemistry of infertility. **Clinica Chimica Acta**, v. 508, p. 185–190, 1 set. 2020.

WEISS, A. R. R.; DAHLKE, M. H. Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of Action of Living, Apoptotic, and Dead MSCs. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 2019.

XU, R. **Radix Rehmanniae Praeparata promotes bone fracture healing through activation of TGF- β signaling in mesenchymal progenitors** | Elsevier Enhanced Reader. Disponível em: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0753332220307745?token=149EB91A78EB16F73BC8945CDAF261C8CF399D5C8C800A8E5C6241227418ED119FA82DB57A1B91E04F48FEB8B9F44341&originRegion=us-east-1&originCreation=20220209181235>>. Acesso em: 9 fev. 2022.

YAMANAKA, S. Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy-Promise and Challenges. **Cell Stem Cell**, v. 27, n. 4, p. 523–531, 1 out. 2020.

YANG, Y.-H. K. et al. Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging in vitro. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 9, n. 1, p. 131, 11 maio 2018.

YAO, P. et al. Mesenchymal Stem Cells: A Potential Therapeutic Strategy for Neurodegenerative Diseases. **European Neurology**, v. 83, n. 3, p. 235–241, 2020.

YILMAZ, S. et al. Safety of clomiphene citrate: a literature review. **Cytotechnology**, v. 70, n. 2, p. 489–495, abr. 2018.

YU, V. W. C.; SCADDEN, D. T. Hematopoietic Stem Cell and Its Bone Marrow Niche. **Current topics in developmental biology**, v. 118, p. 21–44, 2016.

ZAGO, Marco Antonio; COVAS, Dimas Tadeu. **Células-tronco: a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Atheneu, 2006

ZAKRZEWSKI, W. et al. Stem cells: past, present, and future. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 10, n. 1, p. 68, 26 fev. 2019.

12. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A reprodução assistida vem auxiliando cada vez mais na construção familiar. É importante desvincular a RA da infertilidade, ou seja, as técnicas não são utilizadas somente para estes casos, mas sim para uma infinidade de perfis, possibilitando a concretização do desejo maternal/paternal.

A estimulação ovariana controlada é uma etapa fundamental nos tratamentos de RA e vem sendo aprimorada ao longo dos anos. Um dos fármacos mais utilizados, o citrato de clomifeno, apesar de suas grandes vantagens, como o baixo custo e o amadurecimento de um número menor de oócitos, dificulta a implantação embrionária no ciclo na qual a mulher realiza a EOC. Inúmeros estudos *in vivo* demonstram o efeito deletério do citrato no tecido endometrial, atrasando o amadurecimento do endométrio e prejudicando a secreção de muco, fazendo com que as taxas de implantação do embrião no mesmo ciclo onde houve estimulação sejam baixas.

Tendo em vista a vantagem econômica e técnica do CC é importante aprofundar a compreensão acerca da ação do fármaco a nível celular visando a otimização do uso do citrato, tornando o processo de implantação mais efetivo e menos frustrante para as pacientes.

13. PERSPECTIVAS

Apesar dos poucos resultados de estudos in vitro, observamos que a ação do fármaco varia de acordo com a dose utilizada e o tipo de cultura celular. Em busca de resultados mais robustos e dando sequência ao projeto de pesquisa original, nosso grupo ainda fará algumas análises:

- Diferenciação das eMSC em células da decídua antes e após o tratamento com o citrato de clomifeno;
- Diferenciação em adipócitos, osteócitos e condrócitos após o tratamento com o citrato de clomifeno;
- Avaliação da proliferação celular antes e após o tratamento com o citrato de clomifeno;
- Análise da morfologia celular antes e após o tratamento com citrato de clomifeno;
- Realizar nova curva de dose para verificar a diferença entre as concentrações.

14. ANEXOS

14.1 ANEXO I

Parecer nº 3.341.728, de 22 de maio de 2019, emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – HCPA/UFRGS.

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeitos na diferenciação, migração, proliferação e ciclo celular de células-tronco endometriais após tratamento com Citrato de Clomifeno

Pesquisador: PAULA BARROS TERRACIANO

Área Temática: Reprodução Humana (pesquisas que se ocupam com o funcionamento do aparelho reprodutor, procriação e fatores que afetam a saúde reprodutiva de humanos, sendo que nessas pesquisas serão considerados "participantes da pesquisa" todos os que forem afetados pelos procedimentos delas):
(Reprodução Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 3

CAAE: 10971019.6.0000.5327

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Patrocinador Principal: HOSPITAL DE CLINICAS DE PORTO ALEGRE

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.341.728

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 22 de Maio de 2019

Assinado por:
Marcia Mocellin Raymundo
(Coordenador(a))

14.2 ANEXO II

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nº do projeto GPPQ: 2019-0189 e CAAE: 10971019.8.0000.5327

Título do Projeto: *"Efeitos na diferenciação, migração, proliferação e ciclo celular de células-tronco endometriais após tratamento com Citrato de Clomifeno"*

Você está sendo convidada a participar de uma pesquisa cujo objetivo é entender os mecanismos envolvidos na atividade celular de células-tronco sob efeito do fármaco Citrato de Clomifeno. Você está sendo convidada porque já aceitou participar de outro projeto que envolve biópsia endometrial (o Projeto "Viabilização do protocolo de extração, cultura e caracterização de células-tronco endometriais humanas"). Esta pesquisa está sendo realizada pelo Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Se você aceitar participar da pesquisa, os procedimentos envolvidos em sua participação são os seguintes: autorizar a utilização do material já coletada para outra pesquisa.

O único risco possível seria quebra de confidencialidade dos seus dados, no entanto, esse risco será totalmente minimizado, pois os pesquisadores terão contado somente com as células já isoladas.

A participação na pesquisa não lhe trará benefícios diretos, porém contribuirá para o aumento do conhecimento no assunto e poderá beneficiar, assim, futuras pacientes.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Caso ocorra alguma intercomência ou dano resultante de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Rubrica do participante _____

Rubrica do pesquisador _____

Página 1 de 2

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Professora Paula Barros Terraciano ou com a pesquisadora Débora Helena Zanini Gotardi, ambos pelo telefone (51) 33598989, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____