

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FARMACOLOGIA**

**INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO ALA16VAL DO
GENE DA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE
(SOD2) NO EFEITO ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DO
CITRATO DE CLOMIFENO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Felipe Costa

Santa Maria, RS, Brasil

2011

**INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO ALA16VAL DO GENE DA
ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD2) NO EFEITO
ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DO CITRATO DE CLOMIFENO**

Felipe Costa

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia**

Orientadora: Prof. Dr^a Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Santa Maria, RS, Brasil

2011

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação Farmacologia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado:

**INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO ALA16VAL DO GENE DA
ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD2) NO EFEITO
ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DO CITRATO DE CLOMIFENO**

elaborada por
Felipe Costa

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Dr^a.
(Presidente/Orientadora)

Maria Izabel de Ugalde Marques da Rocha, Dr^a. (UFSM)

Rafael Noal Moresco, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 16 de agosto de 2011.

AGRADECIMENTOS

A minha incansável orientadora, a professora Dr^a Ivana Beatrice Mânica da Cruz, que confiou em mim, e me oportunizou um novo caminho, do saber científico, da qual é *expert*, com total dedicação e brilhantismo.

A Maria Fernanda, Eduardo, Luis Filipe, Thais, Michele e Olmiro que foram muito importantes no dia a dia do Laboratório de Biogenômica, que colaboraram na parte experimental deste trabalho e pela convivência que foi muito prazerosa e enriquecedora.

Ao Curso de Medicina da Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC) pelo apoio e incentivo nessa etapa acadêmica e a todos os colegas professores e funcionários do Departamento de Biologia e Farmácia da UNISC.

Aos meus colegas da Clínica de Medicina Reprodutiva – Ginecologia e Obstetrícia, os doutores Barbosa, Otaviano e Mari, que não mediram esforços no trabalho médico diário na minha ausência.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e do Departamento de Morfologia do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, pelos ensinamentos e apoio para a realização deste trabalho.

Ao CNPq e FAPERGS pelos auxílios a pesquisa.

Aos meus pais, Madril e Anita, pelo estímulo constante e conforto incondicional. Eu amo vocês!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria (RS, Brasil)

INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO ALA16VAL DO GENE DA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD2) NO EFEITO ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DO CITRATO DE CLOMIFENO

AUTOR: Felipe Costa
ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Ivana Beatrice Mânica da Cruz
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 16 de agosto de 2011.

Para investigar *in vitro* as propriedades antioxidantes de drogas que induzem a ovulação, como citrato de clomifeno (CC) e verificar se os efeitos são influenciados pelo polimorfismo Ala16Val do gene da SOD2, o qual codifica a superóxido dismutase (SOD) mitocondrial dependente de manganês. Um estudo experimental *in vitro* foi conduzido testando o efeito de diferentes concentrações de CC sobre a capacidade antioxidante, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e na viabilidade de células mononucleadas de sangue periférico (CMSP) em cultura celular. Um total de 58 mulheres adultas saudáveis foram genotipadas para o polimorfismo Ala16Val do gene da SOD2, e sangue foi coletado para realizar os experimentos *in vitro* e analisar os efeitos antioxidantes biológicos do CC. A produção de radicais livres e análise de citotoxicidade foram conduzidas em sangue e CMSP com diferentes genótipos do Ala16Val SOD2. De acordo com as observações descritas aqui, o CC exibiu um efeito antioxidante. Adicionalmente, os tratamentos com CC levaram a um decréscimo na produção de EROs, com amostras de sangue o genótipo AA desenvolveu um efeito antioxidante mais responsivo para o CC do que os outros genótipos. A cultura de CMSP dos genótipos AA e AV mostraram um aumento na viabilidade seguida do tratamento com 10µM CC quando comparada com as culturas CMSP do grupo controle. No grupo de cultura CMSP do genótipo VV, somente os tratamentos com 5µM e 10µM de CC apresentaram efeito positivo na viabilidade. O CC apresentou uma atividade antioxidante similar à observada com outros moduladores seletivos dos receptores de estrogênio (SERMs). Entretanto, essa atividade foi influenciada pelos diferentes genótipos do polimorfismo Ala16Val SOD2 sugerindo efeito farmacogenético.

Palavras-chave: Citrato de clomifeno. Polimorfismo Ala16Val do gene da SOD2. Estresse oxidativo. Infertilidade feminina.

ABSTRACT

Master Dissertation

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Universidade Federal de Santa Maria

THE INFLUENCE OF THE ALA16VAL SOD2 POLYMORPHISM ON THE *IN VITRO* EFFECT OF CLOMIPHENE CITRATE IN OXIDATIVE METABOLISM

AUTHOR: Felipe Costa

ADVISER: Prof^a Dr^a Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Date and Place of The Defense: Santa Maria, august 16, 2011.

To investigate the *in vitro* antioxidant properties of the ovulation induction drug, Citrate clomiphene (CC), and to access whether its effects are influenced by the Ala16Val polymorphism in the SOD2 gene, which encodes mitochondrial manganese superoxide dismutase (SOD), an *in vitro* experimental study testing the effect of different concentrations of CC on antioxidant capacity, reactive oxygen species (ROS) production and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) culture viability was performed. A total of 58 healthy adult women were genotyped for the Ala16Val SOD2 polymorphism, and blood samples were collected to perform *in vitro* experiments analyzing the biological antioxidant effects of CC. Free radical production and cytotoxicity assays were performed on blood and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) with different Ala16Val SOD2 genotypes. According to the observations described here, CC exhibited antioxidant effects. Additionally, the CC treatments led to a decrease in ROS production, with blood samples from the AA genotype displaying a more responsive antioxidant effect from CC than other genotypes. AA and AV PBMCs showed an increase in viability following treatment with 10 μ M CC when compared with PMBCs from control groups. In the VV PBMC group, only the 5 μ M and 10 μ M CC treatments presented a significant positive viability effect. The CC exhibits antioxidant activity, similar to that observed with other Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs), in the presence of the Ala16Val-SOD2 polymorphism suggesting pharmacogenetic effect.

Key Words: Clomiphene citrate. Ala16Val SOD2 gene polymorphism. Oxidative stress. Female infertility.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AA – Genótipo Alanina/Alanina
- Ala16Val – Substituição da Alanina pela Valina no Códon 16 do gene da SOD2
- ATP – Adenosina trifosfato
- AV – Genótipo Alanina/Valina
- CAT – Catalase
- CC – Citrato de Clomifeno
- CMSP – Células Mononucleares do Sangue Periférico
- DCF – 2,7- Diclorofluoresceína
- DCF – Diacetato de Diclorofluoresceína
- DNA – Ácido desoxirribonucleico (*Desoxirribose acid*)
- DPPH • – 2,2-difenil-1-picrilhidrazila
- EROS – Espécies Reativas de Oxigênio
- ESR1 – Receptor de Estrogênio α
- ESR2 – Receptor de Estrogênio β
- FDA – Food Drugs Administration
- FIV – Fertilização *in vitro*
- FSH – Hormônio folículo estimulante
- GPX – Glutathione Peroxidase
- H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio
- HCV – Vírus da Hepatite C
- LDL – Colesterol de baixa densidade (*Low density lipoprotein*)
- LH – Hormônio Luteinizante
- MnSOD – Superóxido dismutase dependente de manganês
- MTS – Seqüencia mitochondrial alvo
- MTT – (3-(4,5-Di methyl thiazol-2-yl)-2,5-di phenyl tetrazolium bromide)
- NO – óxido nítrico (*nitric oxide*)
- O₂⁻ – Radical superóxido
- PCR – Polymerase Chain Reaction
- RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism
- RL – Radicais Livres
- SERM – Moduladores seletivos dos receptores de estrogênio (*Selective Estrogen Receptor Modulators*)
- SNP – Single Nucleotide Polymorphism

SOD – Superóxido dismutase

SOD2 – Superóxido dismutase dependente de manganês

SOP – Síndrome do Ovário Policístico

TBARS – Ácido tiobarbitúrico

VV – Genótipo Valina/Valina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	09
2 OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo geral.....	11
2.2 Objetivos específicos	11
3 REVISÃO DA LITERATURA	12
3.1 Reserva ovariana	12
3.2 O teste de Navot.....	14
3.3 Estresse oxidativo na reprodução feminina	15
3.4 Caracterização do Citrato de Clomifeno	17
3.5 Farmacogenética associada ao metabolismo oxidativo	18
4 RESULTADOS	24
5 DISCUSSÃO	25
6 CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS	32
ANEXOS	
ANEXO A – CARTA APROVAÇÃO DO PROJETO CEP-UFSM	39
ANEXO B – MANUSCRITO: THE SOD2 POLYMORPHISM AND CITRATE CLOMIPHENE	41

1 INTRODUÇÃO

A infertilidade feminina é um problema epidemiológico crescente devido a mudanças socioeconômicas relacionadas à inserção massiva da mulher no mercado de trabalho, e também a outros fatores ambientais que atuam na biologia reprodutiva. Investigações *in vitro* e *in vivo* sugerem que, no sistema reprodutivo feminino, as espécies reativas de oxigênio (EROs) e os compostos antioxidantes atuam na fisiologia da foliculogênese, maturação do oócito, regressão luteal e fertilização. Outros estudos também têm associado estados de estresse oxidativo com baixa capacidade de fertilização do oócito e com a presença de alterações no desenvolvimento embrionário que podem conduzir a morte do embrião.

Assim, a identificação de fatores indutores do estresse oxidativo é de grande relevância clínica e epidemiológica. Evidências sugerem a ocorrência, tanto de variáveis ambientais quanto de variáveis genéticas que aumentam a produção de radicais livres e/ou diminuem o estado antioxidante metabólico. Dentre essas se encontra o gene da enzima superóxido dismutase dependente de manganês (SOD2) que atua na mitocôndria celular. No gene da SOD2, ocorre um polimorfismo no códon 16 do gene onde uma alanina (Ala, A) é substituída por uma valina (Val, V). Essa substituição afeta a constituição da proteína, seu transporte para a mitocôndria e a sua atividade. Assim, indivíduos VV apresentam menor atividade catalítica do que os AA, enquanto os heterozigotos (AV) apresentam níveis intermediários da SOD2 (SHIMODA-MATSUBAYASHI et al., 1996; SUTTON; KHOURY; PRIP-BUUS, 2003).

Investigações adicionais também indicam que o estresse oxidativo causado tanto por fatores ambientais quanto genéticos pode alterar o sucesso da fertilização *in vitro* (FIV). Dentro desses fatores, destaca-se a baixa atividade da enzima superóxido dismutase dependente de manganês (SOD2), que degrada os radicais superóxidos produzidos na mitocôndria em peróxido de hidrogênio. Um estudo recente mostrou que mulheres portadoras do genótipo AA possuem maior chance de engravidar por FIV do que mulheres com os demais genótipos (RUIZ-SANS et al., 2011). Esses resultados subsidiam novas questões ainda não

respondidas relacionadas à potencial influência farmacogenética do polimorfismo Ala16Val-SOD2 em moléculas-alvo utilizadas na indução da ovulação.

Esse é o caso do citrato de clomifeno (CC), um modulador seletivo dos receptores estrogênicos (SERM) que assim como o tamoxifeno induz a ovulação na síndrome do ovário policístico (SOP) ou em mulheres nas quais se quer avaliar o nível de reserva ovariana. Entretanto, apesar de o CC ser utilizado desde a década de 1950, diferente de outros SERMS (tamoxifeno e raloxifeno) investigações sobre seu potencial efeito antioxidante são muito incipientes, sendo esse o principal objeto de estudo do presente trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a capacidade antioxidante do fármaco citrato de clomifeno e seu potencial efeito na produção de radicais livres e citotoxicidade de sangue e células mononucleares periféricas oriundas de mulheres com diferentes genótipos do polimorfismo Ala16Val-SOD2.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a capacidade potencial antioxidante do citrato de clomifeno em diferentes concentrações comparada com antioxidante padrão ácido ascórbico;
- Analisar o efeito *in vitro* de diferentes concentrações do citrato de clomifeno na produção de radicais livres;
- Avaliar a influência do polimorfismo Ala16Val na produção de radicais livres de amostras tratadas com diferentes concentrações de citrato de clomifeno;
- Avaliar o efeito *in vitro* de diferentes concentrações do citrato de clomifeno na citotoxicidade de células mononucleares periféricas do sangue;
- Avaliar a influência do polimorfismo Ala16Val na citotoxicidade de amostras tratadas com diferentes concentrações de citrato de clomifeno;

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Reserva ovariana

A reserva ovariana é definida como o conjunto de folículos ovarianos (*pool follicular*) disponíveis para recrutamento, representando o potencial funcional do ovário através do número e da qualidade oocitária (MAHESHWARI; FOWLER; BHATTACHARYA, 2006; CHUANG et al., 2003; VISSER et al., 2006; HUGHES et al., 2010). A quantidade de folículos é finita e fixada em um momento muito precoce da vida, mais especificamente no estágio fetal do desenvolvimento humano. Assim, logo após esse período, a quantidade de folículos disponíveis a se desenvolver e se transformar potencialmente em oócitos começa a declinar. Estimativas apontam que, em torno da 20ª semana de vida intrauterina, existem 6 a 7 milhões de oócitos. Ao nascimento, esse número já diminui para 1 milhão, e com a redução progressiva, na época da menarca existem apenas aproximadamente 300.000 folículos primordiais. Alguns desses serão recrutados para o desenvolvimento folicular, porém, a cada ciclo, apenas um será selecionado para ovular, ao passo que os demais folículos em crescimento serão perdidos por atresia (apoptose). Esse processo continua até que o *pool* de folículos primordiais seja exaurido, resultando na menopausa (TE VELDE; PEARSON, 2002).

Nos anos que precedem a menopausa, a fertilidade já diminui, antes mesmo de iniciar a irregularidade menstrual. No mundo ocidental, a menopausa costuma ocorrer aos 51 anos de idade em média; porém há uma variação individual na idade da menopausa e, subsequentemente, também na idade da subfertilidade (TE VELDE et al., 1998).

Muitos estudos têm mostrado que a fertilidade natural da mulher começa a declinar após os 30 anos de idade, acelerando esse declínio a partir dos 35 anos e conduzindo a esterilidade em uma média de idade de 41 anos. O efeito da idade sobre a fertilidade feminina também tem sido mostrado em vários estudos sobre os resultados da fertilização *in vitro* (FIV) obtidos a partir de casais inférteis que se submeteram às técnicas de reprodução assistida. A

probabilidade de gravidez e “bebê em casa” claramente diminui após os 35 anos de idade. De fato, a idade da mulher consistentemente tem se mostrado como um importante fator de predição do sucesso do tratamento de FIV (BROEKMANS et al., 2006; HUGUES et al., 2010).

Durante as duas últimas décadas, vários testes, chamados “testes de reserva ovariana”, têm sido desenvolvidos com o objetivo de prever o prognóstico reprodutivo e o sucesso da FIV em termos de produção oocitária e ocorrência de gravidez. Alguns desses testes fazem parte da avaliação de rotina de pacientes inférteis que se submeterão a alguma técnica de reprodução assistida (BROEKMANS et al., 2006; GLEICHER; WEGHOFER; BARAD, 2011). Já que não é possível alterar a capacidade reprodutiva dos ovários, a avaliação da reserva ovariana, no intuito de indicar o melhor tratamento, constitui uma abordagem acessível ao médico para tentar transpor a idade cronológica.

Para avaliar a reserva ovariana, níveis séricos na fase folicular precoce do hormônio folículo estimulante (FSH), estradiol e de inibina B têm sido mensurados, convencionalmente no 3º dia do ciclo menstrual. No caso, a inibina B e o estradiol são produzidos pelos folículos em resposta ao FSH, e fazem retroalimentação negativa sobre a hipófise, suprimindo, desse modo, a secreção do FSH. Com o declínio do *pool folicular*, os níveis séricos de inibina B e estradiol também diminuem, levando a um conseqüente aumento sérico do FSH. À medida que diminui a reserva folicular, os níveis basais de FSH se elevam. Os níveis basais do hormônio luteinizante (LH), relevantes na fase folicular tardia, permanecem mais estáveis e se elevam tardiamente na vida reprodutiva, já no período pré-menopausa (BURGER et al., 1999). O FSH basal é considerado um teste consagrado para avaliação da reserva ovariana, e, segundo Chuang et al. (2003), o FSH basal é um bom marcador do tamanho do *pool folicular* remanescente e, juntamente com a idade da paciente, são associados de forma independente aos resultados da FIV.

3.2 O teste de Navot

Testes farmacológicos têm sido amplamente utilizados para avaliar a reserva ovariana. Além disso, existem outros testes, por exemplo, o teste de avaliação do número de folículos antrais pela ultrassonografia, a dosagem do hormônio antimülleriano. Entre os testes mais amplamente utilizados no mundo, encontra-se o teste de desafio ao CC, conhecido como Teste de Navot (NAVOT; ROSENWAKS; MARGALIOTH, 1987; JOHNSON et al., 2006; NAHUIS et al., 2010).

O teste de Navot baseia-se no princípio da ligação por competição do CC aos receptores de estradiol hipofisários. Isto porque o CC é um composto sintético não esteroide, com ação estrogênica fraca em alguns tecidos e antiestrogênica em outros. Por possuir semelhança estrutural com o estrógeno, liga-se aos receptores estrogênicos hipofisários, bloqueando a retroalimentação negativa dos estrógenos endógenos. Os receptores ocupados pela ligação estável com o CC impedem o retrocontrole inibitório do estradiol sobre a hipófise. Desse modo, as pacientes com reserva ovariana adequada apresentam um aumento na secreção de FSH, mas aquelas com baixa reserva folicular apresentam uma secreção exagerada de FSH. Essa diferença indica que a retroalimentação está diminuída nos folículos disponíveis (NAHUIS et al., 2010).

A retroalimentação negativa ao FSH é exercida pelo estradiol e pela inibina, porém com o bloqueio de receptores do estradiol pelo CC, restaria apenas a inibina para exercer esse efeito. Contudo, o baixo número ou a má qualidade da coorte de folículos resultam em uma função inadequada das células da granulosa na produção de inibina suficiente. Isso faz com que ocorra liberação do FSH acima do esperado.

Por esse motivo, esse teste tem uma sensibilidade maior para detectar uma baixa reserva ovariana do que a avaliação do FSH basal no terceiro dia do ciclo (SCOTT et al., 1993). Em mulheres com um teste alterado, a chance de gravidez será pequena, independentemente da sua idade, já que reflete uma baixa reserva do ovário. Na opinião de Tambo et al. (1989), o teste de Navot tem um bom valor preditivo na chance de gravidez, ou seja, da reserva ovariana, e

dá um prognóstico correto em 92,3% dos casos. Essa sugestão prevalece até os dias de hoje segundo revisão sobre o tema (NAHUIS et al., 2010). Vale destacar que, apesar da importância da medida da reserva ovariana, a melhor maneira de avaliar o estado folicular permanece controversa (FANCHIN et al., 2005).

3.3 Estresse oxidativo na reprodução feminina

Apesar da grande quantidade de testes e do rápido desenvolvimento das tecnologias de reprodução assistida observados nestes últimos dez anos, estudos sobre fatores que incidem sobre perfil reprodutivo, fertilidade e sucesso reprodutivo feminino continuam sendo um tema de amplo interesse. Isso porque, no mundo contemporâneo, considerando os fatores socioeconômicos e culturais, as mulheres tendem a gerar filhos em idades mais avançadas do que as gerações anteriores. Assim, a investigação sobre possíveis fatores que incidem sobre o eixo hipotálamo-hipófise-ovário de modo a aumentar a fertilidade e a reprodução, ou mesmo diminuir os fatores deletérios desse processo, é de grande interesse clínico-epidemiológico (HUGUES et al., 2010).

Além da programação genética restrita no tempo da fertilidade feminina, podem existir variáveis que acelerem ou minimizem esse processo. Esse é o caso do efeito do estresse oxidativo no organismo humano (AVERY, 2011). Em um organismo humano saudável, as EROs e os antioxidantes estão em equilíbrio. Quando esse equilíbrio é perdido no sentido de excesso de EROs, o estresse oxidativo ocorre.

O estresse oxidativo influencia o tempo de vida reprodutivo de uma mulher, assim como a chegada da menopausa. Os efeitos patológicos do estresse oxidativo são exercidos por vários mecanismos incluindo peroxidação lipídica, inibição da síntese protéica, depleção da adenosina trifosfato (ATP), alterações nas proteínas e na molécula de DNA (genotoxicidade) (AGARWAL; GUPTA; SHARMA, 2005).

Estudos têm mostrado que as EROs afetam múltiplos processos fisiológicos da maturação oocitária, da fertilização, do desenvolvimento embrionário e da gravidez, e têm sugerido papel na modulação do declínio da

fertilidade idade-relacionada. O estresse oxidativo também tem um papel na fisiopatologia da infertilidade e nos resultados da fertilização assistida (AGARWAL; ALLAMANENI, 2004, RUIZ-SANZ et al., 2011).

A presença de EROs e antioxidantes no trato reprodutivo feminino tem sido demonstrada por várias metodologias envolvendo estudos em animais e humanos. Um número de biomarcadores do estresse oxidativo tem sido investigado incluindo os relacionados com a modulação das enzimas antioxidantes produzidas pelo próprio organismo (antioxidantes enzimáticos endógenos) como a superóxido dismutase e a glutathione peroxidase e na capacidade antioxidante total e compostos pró-oxidantes que, por exemplo, levam à peroxidação lipídica causando danos nas membranas celulares (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, TBARS, danos no DNA, produção de nitritos e nitratos, etc.) (JOZWIK; WOLCZYNSKI; SZAMATOWICZ, 1999, AL-GUBORY; FOWLER; GARREL, 2010).

Desse modo, é importante comentar que já existe um número consistente de estudos que associam o aumento de dano no DNA causado pelo estresse oxidativo e infertilidade masculina. Tais estudos levantam a hipótese de que a dieta parece ser crucial na prevenção desses danos (WOODALL; AMES, 1997; SHOWELL et al., 2011). No caso, disfunções nos espermatozóides relacionadas ao estresse oxidativo incluem diminuição na sua motilidade e inibição da fusão espermatozóide-oócito (SHARMA; AGARWAL, 1996).

Entretanto, o papel do estresse oxidativo na fertilidade e no sucesso reprodutivo feminino ainda é obscuro. Assim, a avaliação do impacto das EROs na fertilidade feminina e no aborto precoce representa uma lacuna no nosso conhecimento sobre a reprodução indicando a necessidade de novas pesquisas.

Dado o número pequeno de estudos e a relevância epidemiológica do tema, esse projeto tem como perspectiva conduzir investigações sobre a modulação de biomarcadores do estresse oxidativo e sua associação com o padrão de fertilidade e sucesso reprodutivo feminino.

Entretanto, para conduzir um estudo sobre associação entre reserva ovariana e estresse oxidativo induzida pelo CC, torna-se necessário estabelecer os potenciais efeitos *in vitro* dessa medicação no metabolismo oxidativo.

3.4 Caracterização do Citrato de Clomifeno (CC)

Quimicamente, o CC é uma molécula não esteróide derivada do trifeniletileno que possui tanto propriedades agonistas quanto propriedades antagonistas ao estrogênio (CLARK; MARKAVERICH, 1988). Como um composto antiestrogênico, o CC liga-se aos receptores de estrogênio no hipotálamo e na hipófise (NASSERI; LEDGER, 2001). O CC contém uma mistura assimétrica de sais isoméricos, o enclomifeno e o zuclomifeno. O zuclomifeno que compõe 38% do CC é a molécula mais potente na indução da ovulação tendo uma meia-vida mais longa do que o enclomifeno. O zuclomifeno é ainda detectável no plasma até um mês após a sua administração e pode se acumular a longos ciclos consecutivos de tratamento. Já os níveis do enclomifeno aumentam rapidamente no sangue após a administração do CC e caem para níveis não detectáveis também rapidamente (NASSERI; LEDGER, 2001).

Apesar das similaridades químicas do CC com outras moléculas como o tamoxifeno que atua como um agonista de receptores de estrogênio na mucosa vaginal e no endométrio, uma metanálise feita por Steiner, Terplan e Paulson (2005) sugeriu que tanto o CC quanto o tamoxifeno são efetivos na indução da ovulação.

Kurosawa et al. (2010) avaliaram a atividade do CC nos receptores estrogênicos alfa (ESR1) e beta (ESR2) separadamente utilizando células 293T transfectadas ou com o receptor ESR1 ou com o receptor ESR2. Esses autores observaram que o CC atua como um antagonista/agonista do estrogênio via o receptor ESR1 e como antagonista do estrogênio via o receptor ESR2.

Geralmente para a indução da ovulação, o CC é administrado via oral em uma dose diária de 50 mg durante cinco dias a partir do 2-5º dia do ciclo. No teste de Navot, no 3º dia do ciclo, é realizada a avaliação dos níveis de FSH. Entre o 5º até o 9º dia, o CC é administrado oralmente na dose de 100 mg/dia avaliando-se novamente os níveis de FSH no 10º dia do ciclo.

Pouco é conhecido sobre o destino biológico do CC em seres humanos. Sabe-se que o CC é bem absorvido, e os isômeros e seus metabólitos são excretados principalmente pelas fezes (ADASHI, 1993). Existem evidências de

reciclagem entero-hepática dos principais metabólitos do CC. Em ratos e coelhos, o principal produto metabólico do CC ocorre a partir da 4-hidroxilação, N-detilação e N-oxidação das moléculas, que é feita pelos citocromos P450 (SZUTU et al., 1989; RUENITZ, 1981). As rotas metabólicas nos seres humanos provavelmente são similares às descritas para o tamoxifeno.

Potenciais efeitos farmacogenéticos parecem agir sobre a eficácia do CC. Rostami-Hodjegan et al. (2004) revisaram essa questão no seu artigo sobre monitoramento das concentrações plasmáticas do CC sugerindo que essas concentrações devem ser individualizadas já que a resposta ao fármaco nas mulheres é muito individualizada. Entretanto, quais rotas genéticas alteradas estão associadas a essas diferenças ainda é um tema a ser estudado.

3.5 Farmacogenética associada ao metabolismo oxidativo

A farmacologia dedica-se ao estudo dos fármacos incluindo a sua ação nos tecidos e organismos vivos, bem como o seu efeito com outras substâncias químicas. Historicamente, o conhecimento das respostas farmacológicas a drogas tem se baseado em resultados populacionais. Apesar da relevância dos estudos realizados através de ensaios clínicos, subgrupos populacionais podem apresentar diferentes respostas ao fármaco que podem ser constatados através da ocorrência de efeitos colaterais, assim como maior ou menor intensidade de resposta ao medicamento. Entretanto, com os avanços tecnológicos recentes na área de biologia molecular, abriu-se a perspectiva de desenvolvimento de estudos que permitam a obtenção de informações mais específicas dos indivíduos. No caso, a implantação de estudos dessa natureza tem como objetivo final personalizar o uso de fármacos através da seleção de drogas e dosagem utilizada a fim de garantir uma maior eficiência e segurança (WANG; MCLEOD; WEINSHILBOUM, 2011).

Assim, dois princípios fundamentais estão diretamente relacionados a essa personalização: a farmacocinética e a farmacodinâmica. Como se sabe, a farmacocinética envolve a descrição dos efeitos das drogas nos organismos vivos incluindo sua taxa de absorção, distribuição, metabolismo e excreção.

Muitos fatores biológicos, fisiológicos e fisicoquímicos influenciam o processo de transferência das drogas no corpo e assim a sua dinâmica farmacológica. Desse modo, os princípios básicos da farmacocinética são utilizados para se determinar a dose necessária a uma resposta terapêutica. Como resultado, a farmacocinética é considerada um elemento-chave para o estabelecimento de doses mais personalizadas. O principal objetivo seria o de manter uma concentração ótima do fármaco no seu sítio receptor, produzindo o efeito terapêutico desejável por um período específico de tempo e minimizando qualquer efeito adverso ou tóxico da droga (WANG; MCLEOD; WEINSHILBOUM, 2011).

Já a farmacodinâmica descreve o efeito da droga no corpo e se baseia em princípios fundamentais da relação droga-receptor alvos. Portanto, a farmacodinâmica está relacionada à natureza da interação fármaco-receptor, que pode ser afetada pela quantidade e afinidade do receptor ao fármaco e pela concentração desse fármaco no sítio receptor.

A partir dos subsídios relacionados à farmacodinâmica e farmacocinética, foi desenvolvido o conceito de monitoramento fármaco-terapêutico (*therapeutic drug monitoring*), que é utilizado no manejo terapêutico de fármacos. Tal monitoramento é realizado através de medidas sorológicas da sua concentração que permitem otimizar e individualizar a resposta medicamentosa conforme o paciente evitando assim situações de subdosagens ou dosagens consideradas tóxicas (STINGL KIRCHHEINER; BROCKMÖLLER, 2011).

Uma vez que existem variações individuais ou de subgrupos populacionais à ação farmacodinâmica e farmacocinética dos fármacos, o campo da “genômica dos fármacos” emergiu com força nesta última década. Conceitualmente, a farmacogenética e a farmacogenômica tratam do estudo do papel da variação geneticamente herdada na resposta a um dado fármaco. Embora muitos fatores possam contribuir nessa variação, incluindo o sexo, idade, dieta e efeitos de interação com outras drogas, evidências robustas mostram que a genética do indivíduo tem um papel muito relevante. Nos Estados Unidos, a farmacogenética já está suficientemente madura a ponto da Food and Drug Administration (FDA) começar a incorporar informações farmacogenéticas sobre fármacos. No caso, a maioria das informações incorporadas dizem respeito a heranças monogênicas

no metabolismo das drogas. Não há limites definidos entre farmacogenética e farmacogenômica, os dois termos são frequentemente usados como sinônimos (STINGL KIRCHHEINER; BROCKMÖLLER, 2011). Portanto, aqui essas duas palavras serão utilizadas como sinônimo.

A farmacogenética também começou a ser utilizada no desenvolvimento de novos fármacos ou para identificar novas propriedades biológicas ou aspectos toxicológicos de fármacos que já são utilizados na clínica médica. Nesse contexto, o Laboratório de Biogenômica (Departamento de Morfologia, Centro de Ciências da Saúde, UFSM) implantou uma linha de pesquisa em estudos farmacogenéticos *in vitro* de propriedades biológicas e toxicológicas de fármacos associados ao metabolismo oxidativo. O presente projeto está incluído nessa linha de pesquisa avaliando, não só as potenciais propriedades oxidativas (pró e antioxidantes) *in vitro* do citrato de clomifeno, mas também se tais propriedades são dependentes do contexto genético do indivíduo relacionado ao metabolismo antioxidante enzimático.

O organismo humano, por ser aeróbio, utiliza glicose e oxigênio para gerar energia sob a forma de adenosina trifosfato (ATP). Nesse processo, cerca de 5% do oxigênio acaba formando moléculas eletronicamente desemparelhadas que possuem alta reatividade química. Essas moléculas são genericamente conhecidas como EROs.

O controle na produção e catálise dos EROs é regulado pelo organismo através de dois sistemas antioxidantes complementares: o sistema antioxidante endógeno, composto por enzimas que catalisam os EROs em água; e o sistema antioxidante exógeno, composto por moléculas antioxidantes obtidas, principalmente, através da dieta.

O sistema antioxidante enzimático inclui enzimas importantes, como superóxidos dismutases (SODs), catalase (CAT), sistema tioredoxina, glutathione peroxidase (GPX), e heme oxigenase. A principal reação antioxidante está relacionada à catálise dos íons superóxido (O^{2-}) produzidos a partir do oxigênio que não foi utilizado nos ciclos bioquímicos mitocondriais para a produção do ATP. Nesse sistema antioxidante, os íons superóxido são catalisados pela superóxido dismutase (SOD) que é considerada a primeira enzima de defesa contra o estresse oxidativo produzido pelo metabolismo normal (JOHNSON,

2002). As SODs convertem eficientemente todo o O^{2-} para H_2O_2 (peróxido de hidrogênio). Este último é então degradado finalmente em água pela catalase ou glutathiona peroxidase. Existem três isoformas da SODs: a MnSOD (SOD2) dependente de manganês, na mitocôndria, a Cu/ZnSOD dependente de cobre-zinco no citosol e a SOD extracelular, nos compartimentos extracelulares (ZELKO; MARIANI; FOLZ, 2002).

A enzima SOD2, apesar de ser codificada por um gene nuclear e sintetizada no retículo endoplasmático rugoso, atua somente no interior das membranas mitocondriais. No caso, essa enzima catalisa (dismuta) o radical superóxido produzido a partir da respiração celular em peróxido de hidrogênio. Posteriormente, o peróxido de hidrogênio formado dentro da mitocôndria é catalisado pela glutathiona peroxidase em água (SUTTON; KHOURY; PRIP-BUUS, 2003).

Para tanto, a proteína SOD2 sintetizada no citoplasma é movida para dentro da mitocôndria a partir de informações contidas em um pequeno segmento protéico conhecido como sequência mitocondrial alvo (*Mitochondrial target sequence*, MTS).

Estudos genéticos têm descrito um polimorfismo de substituição simples (*single nucleotide polymorphism*, SNP) no códon 16 da região MTS da proteína SOD2 onde ocorre a substituição de uma alanina por uma valina. Desse modo, existem três genótipos possíveis na população humana: AA, VV e AV. O alelo A determina a síntese de uma proteína alfa-hélice, que possui grande eficiência de transporte e entrada na mitocôndria. Já o alelo V determina a síntese de uma proteína com estrutura beta-lâmina que fica parcialmente retida nas membranas mitocondriais (SHIMODA-MATSUBAYASHI et al., 1996).

Essas condições acarretam consequências no desempenho da enzima. No caso, portadores do genótipo AA possuem uma maior facilidade em entrar para a mitocôndria e, por consequência, maior eficiência na dismutação do superóxido. Por outro lado, portadores do genótipo VV possuem uma maior dificuldade de entrada enzimática para a mitocôndria e, por consequência, menor eficiência na dismutação do íon superóxido (ZELKO; MARIANI; FOLZ, 2002).

Essa observação é proveniente de estudos *in vitro* que utilizaram a importação de proteínas quiméricas para dentro de camundongos e mostraram que o precursor Ala-MnSOD gerado é 30-40% mais ativo no processamento do homotetrâmero MnSOD do que o precursor Val-MnSOD. Conseqüentemente, o Ala-MnSOD/MTS permite uma importação eficiente da MnSOD para o interior da matriz mitocondrial, enquanto a variante Val causa uma retenção parcial do precursor dentro da membrana interna e diminui a formação do homotetrâmero MnSOD ativo na matriz mitocondrial (SUTTON; KHOURY; PRIP-BUUS, 2003).

Evidências epidemiológicas têm demonstrado que o alelo Ala (AA) pode alterar o transporte da enzima para o interior da mitocôndria, o que está associado ao aumento do risco para câncer de mama, próstata, cólon, carcinoma hepatocelular em pacientes infectados por HCV (Vírus da Hepatite C), e mesotelioma pleural maligno (TAUFER et al., 2005; SLANGER; CHANG-CLAUDE; WANG-GOHRKE, 2006; LANDI et al., 2007; BICA et al., 2007; BICA et al., 2009).

Investigações epidemiológicas adicionais têm sugerido que o alelo V não é uma “boa variante genética”, uma vez que foram observadas associações desse alelo com aterosclerose da carótida (KAKKO; PAIVANSALO; KOISTINEN, 2001), com cardiomiopatia dilatada não familiar em indivíduos japoneses, com altos níveis de LDL oxidado (ox-LDL) em indivíduos brasileiros com efeito sinérgico em pacientes com diabetes tipo 2 (GOTTLIEB; SCHWANKE; SANTOS, 2005). Porém, dados alternativos demonstraram que essa variante do alelo A do peptídeo sinalizador aumenta a atividade da MnSOD mitocondrial, protege os macrófagos contra a apoptose induzida por ox-LDL, reduzindo o risco de infarto agudo do miocárdio (FUJIMOTO; TAGUCHI; IMAI, 2008).

Os fatos antes mencionados sugerem um “paradoxo” no polimorfismo da MnSOD, dado que principalmente as condições homozigóticas (AA e VV) dessa variação causam um desequilíbrio na modulação antioxidante, levando ao aumento dos níveis de superóxido em indivíduos VV ou níveis de peróxido de hidrogênio em indivíduos AA.

Em ambos os casos, interações ambientais parecem aumentar ou diminuir o risco de morbidades não transmissíveis como as neoplasias e doenças cardiovasculares, como é sugerido em um estudo que descreve uma interação

entre esse polimorfismo e padrões de dieta antioxidante e outras variáveis do estilo de vida, como o hábito de fumar no risco de câncer no pulmão (AMBROSONE; FREUDENHEIM; THOMPSON, 1999; TAMIMI; HANKINSON; SPIEGELMAN, 2004).

Ruiz-Sanz et al. (2011) investigaram se o polimorfismo Ala16Val SOD2 estava associado a infertilidade e taxa de gravidez em ciclos de FIV. Nesse estudo, no grupo que foi submetido à FIV, o genótipo foi AA em 25% e VV em 28%. Esses autores estudaram 148 mulheres inférteis que se submeteram a ciclos de FIV, das quais 44 ficaram grávidas, enquanto 104 não ficaram. As mulheres portadoras do genótipo AA apresentaram uma taxa de gravidez mais alta na FIV do que os outros genótipos. O genótipo AA do polimorfismo Ala16Val SOD2 foi considerado um significativo preditor independentemente da ocorrência de gravidez em ciclos de FIV.

A partir desses resultados, os autores sugeriram que a defesa antioxidante, particularmente na mitocôndria, poderia contribuir no sucesso da FIV.

Dentro desse contexto, os ensaios para avaliar propriedades oxidativas do citrato de clomifeno também incluirão testes farmacogenéticos utilizando material biológico (sangue) oriundo de indivíduos com diferentes genótipos do polimorfismo Ala16Val SOD2.

4 RESULTADOS

Os resultados são apresentados na forma de manuscrito submetido ao *Journal of Fertility and Sterility*, Índice de Impacto: 3,93 formatado segundo as normas propostas pela Revista (Anexo B).

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho observou a capacidade antioxidante potencial do CC e o seu efeito sobre o metabolismo oxidativo e a viabilidade celular de amostras biológicas provenientes de mulheres adultas saudáveis portadoras de diferentes genótipos do polimorfismo Ala16Val SOD2.

Antes de serem discutidos os resultados obtidos, serão feitos comentários sobre as condições metodológicas relacionadas à condução do presente estudo. Inicialmente é importante comentar as condições de escolha das concentrações do CC testadas nessa investigação. Uma vez que o CC é um fármaco, as concentrações escolhidas foram as previamente utilizadas no estudo recente conduzido por Kurosawa et al. (2010) que avaliou a atividade estrogênica do CC via receptores ER α e ER β , separadamente usando células 293T transfectadas ou com um, ou com outro receptor. A atividade antiestrogênica do CC também foi avaliada através do mesmo sistema na presença de diversas concentrações de 17 β -estradiol. Os autores utilizaram concentrações entre 6 a 12 μ M. A partir de ensaios pilotos, foram determinadas como concentrações as quatro concentrações testadas que incluíram duas concentrações próximas às investigadas por Kurosawa et al. (2010) (5 μ M e 10 μ M) e uma concentração mais baixa (1 μ M) e outra mais alta (20 μ M). Uma vez que para cada concentração foram feitas triplicatas a fim de minimizar os efeitos ambientais sobre os resultados, preferiu-se limitar o número de concentrações a quatro com o adicional grupo controle negativo.

A capacidade antioxidante potencial do CC foi inicialmente avaliada pelo método de sequestro do radical livre DPPH que é um ensaio espectrofotométrico simples, mas amplamente empregado. O DPPH é um radical livre estável, não natural, cujas propriedades diferem dos radicais de oxigênio altamente reativos como os radicais hidroxil, alcóxil, superóxido, etc., que apresentam um importante papel nos processos oxidativos biológicos. Logo, o ensaio de atividade sequestradora do radical livre DPPH se apresenta como um teste de predição de uma potencial atividade antioxidante e pode ser empregado para a averiguação dessa atividade em compostos químicos sintéticos e produtos naturais (MENSOR et al., 2001). Os resultados mostraram que o CC possui ação

antioxidante ainda que bem menor do que a do ácido ascórbico, que foi a molécula antioxidante utilizada como padrão comparativo. Por exemplo, na concentração de 20 μM , a ação antioxidante do CC foi 76% menor do que a observada para o ácido ascórbico nessa mesma concentração.

Entretanto, apesar de baixa atividade antioxidante, o CC apresentou efeitos tanto sobre a produção de radicais livres quanto sobre a viabilidade celular.

Em relação ao efeito do CC na produção dos radicais livres, a potencial influência do CC na produção de EROs foi monitorada através do uso da sonda fluorescente, a 2,7'-diclorofluoresceína (DCF). Esse teste está baseado no seguinte pressuposto químico: o diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) é capaz de se difundir através de membranas celulares. Dentro das células, essa molécula é deacetilada pela ação das enzimas esterases intracelulares (ROTA; CHIGNELL; MASON, 1999). Essa reação forma, por sua vez, um produto não fluorescente, a dihidroclorofluoresceína (DCFH). A DCFH na presença de EAOs é oxidada (preferencialmente peróxidos, hidroperóxidos e $\text{NO}\bullet$) passando para uma forma altamente fluorescente a diclorofluoresceína (DCF). Assim, quanto maior a fluorescência detectada pela maior absorbância avaliada pelo fluorímetro, maior a ocorrência de compostos oxidantes.

Desse modo, o ensaio DCFH-DCF é rotineiramente utilizado para detectar a produção de EROs com um nível razoável de acurácia ainda que não faça uma detecção muito específica (de tipos diferenciados de EROs). No entanto, sabe-se que o ensaio mede oxi-radicais e peróxidos formados (TANIELIAN et al., 2000, WOODALL; AMES, 1997). No presente estudo, a influência do CC sobre a produção de EROs foi feita a partir do seguinte pressuposto: se os níveis de EROs se mantivessem similares aos observados nos tratamentos sem o fármaco (controle negativo), essa condição indicaria a não ocorrência de efeitos do CC sobre a produção dessas moléculas. Caso as taxas de fluorescência fossem aumentadas em relação ao grupo controle, tal condição indicaria efeito pró-oxidante do CC nas amostras de sangue testadas. O contrário, queda na fluorescência indicaria potencial ação antioxidante através da diminuição na produção de EROs. Considerando as amostras de sangue como um todo, os tratamentos com CC apresentaram ou efeito antioxidante ou nenhum efeito

conforme a concentração. O mesmo ocorreu no teste de viabilidade celular em que determinadas concentrações de CC (especialmente 5 e 10 μM) aumentaram a viabilidade via análise da função mitocondrial, que é fator que mede o ensaio do MTT.

Investigações complementares têm descrito que outros SERMs, como o tamoxifeno e o raloxifeno, usados nos tratamentos do câncer de mama e da osteoporose respectivamente, têm efeitos biológicos positivos sobre o metabolismo oxidativo da atividade fisiológica cardiovascular e neural. Essas moléculas apresentam, particularmente, efeito antioxidante (CARDOSO; ALMEIDA; CUSTÓDIO, 2004; OBATA, 2006; WAKADE et al., 2008; BADAWY; ELNASHAR, 2011).

Nas últimas quatro décadas, o CC tem sido o tratamento primário na infertilidade de pacientes anovuladoras do grupo II da classificação da Organização Mundial da Saúde. O CC pertence à classe farmacológica dos Moduladores Seletivos dos Receptores Estrogênicos (SERMs) que altera a ação estrogênica de acordo com a sua ligação nos receptores estrogênicos (subtipos $\text{RE}\alpha$ ou $\text{RE}\beta$) nas células (STEINER; TERPLAN; PAULSON, 2005). Assim, em alguns casos, um SERM pode antagonizar os efeitos estrogênicos por impedir o estrogênio a se ligar aos receptores e, em outros casos, essas drogas mostram atividade estrogênica por imitarem a ação dos mesmos, através da ligação via receptor, a depender do tecido. Dada as suas similaridades farmacológicas relacionadas a outros SERMs do qual já foi comprovado efeito antioxidante, o CC também parece ter tal efeito.

Entretanto, considerando a revisão da literatura indexada no Medline-Pubmed, estudos prévios dos efeitos antioxidantes do CC parecem ser muito incipientes, uma vez que não foi possível acessar a estudos similares ao aqui descrito. Desse modo, o conjunto dos resultados aqui descritos sugere que o CC tenha papel antioxidante ativo em sistemas biológicos *in vitro*, o que precisa ser confirmado a partir de estudos adicionais *in vivo*.

Entretanto, talvez os achados mais importantes do presente estudo são o potencial efeito farmacogenético dos resultados já que os mesmos foram influenciados pelo polimorfismo Ala16Val SOD2. Apesar de esse ser um estudo *in vitro* e estar limitado a poucas amostras dos diferentes genótipos da

Ala16Val SOD2, esses resultados são instigantes e incitam uma maior discussão.

Os resultados aqui descritos sobre potencial efeito dependente de variações no gene da SOD parecem ter plausibilidade biológica, uma vez que investigações prévias têm sugerido ser a SOD um elemento importante na biologia reprodutiva feminina. Entre essas investigações, destaca-se o estudo recente feito pelo grupo de pesquisa espanhol que avaliou o efeito do mesmo polimorfismo aqui investigado no sucesso da fertilização *in vitro* (FIV) (RUIZ-SANS et al., 2011).

Ruiz-Sans et al. (2011) estudaram 148 mulheres inférteis que se submeteram a ciclos de FIV, das quais 44 ficaram grávidas, enquanto 104 não ficaram. As mulheres portadoras do genótipo AA apresentaram uma taxa de gravidez mais alta na FIV do que os outros genótipos. A partir desses resultados, os autores sugeriram que a defesa antioxidante, particularmente na mitocôndria, poderia contribuir no sucesso da FIV.

O conjunto dos resultados aqui obtidos sugere que o genótipo AA apresenta maior resposta antioxidante ao CC do que os demais genótipos. Por exemplo, na análise da viabilidade celular, amostras provenientes de mulheres heterozigotas (AV) não apresentaram alteração nessa variável quando em presença do CC. Se a SOD2 é a molécula-chave no metabolismo reprodutivo feminino, pode ser especulado que alterações na atividade genética da SOD2, causadas pelo polimorfismo Ala16Val SOD2, poderiam também induzir respostas diferentes para as drogas indutoras da ovulação, como é o caso do CC. Os resultados aqui descritos corroboram particularmente essa hipótese, portanto é importante realizar estudos complementares *in vivo* para avaliar se a resposta ao tratamento com CC é influenciada pelo polimorfismo Ala16Val SOD2. A ausência desses dados poderia ser considerada uma limitação deste estudo.

Entretanto, como medicamentos indutores de ovulação são utilizados para distúrbios como a síndrome do ovário policístico muito relacionado à obesidade e para a avaliação da reserva ovariana, essas duas condições estão ligadas a uma grande variação amostral. Ou seja, mulheres portadoras de SOP ou que precisam avaliar a reserva ovariana podem ter grandes diferenças no seu histórico de doenças, no estilo de vida, na idade, etc., que precisam ser

consideradas no momento de se organizar um desenho experimental do tipo ensaio clínico. Realizar o processo seletivo dessa amostra não é tarefa fácil e envolve dispêndio de tempo e recursos financeiros, humanos e logísticos. Por esse motivo, investigações prévias, como aqui realizadas, que indiquem possível efeito do CC no perfil antioxidante e potencial ação farmacogenética relacionada ao polimorfismo Ala16Val SOD2, constituem uma base referencial para a condução dos estudos adicionais em seres humanos. Em termos clínicos, a relevância desses estudos encontra-se justo em duas situações relacionadas ao uso do CC. A primeira delas é clinicamente conhecida como resistência ao CC caracterizada pela menor responsividade à indução da ovulação, que é observada em algumas mulheres. Seria essa não responsividade um efeito associado ao metabolismo oxidativo? Essa é uma questão em aberto que precisa ainda ser respondida. A outra questão diz respeito a potenciais efeitos adversos relacionados ao CC que ainda que baixos podem ocorrer em um número pequeno de pacientes. Por exemplo, Yaşar e Ertuğrul (2009) descreveram que pacientes com tendência a dislipidemia podem apresentar quadros de hipertrigliceridemia severa quando tratadas com CC. Outro problema relatado ao uso do CC diz respeito a distúrbios visuais. Entretanto, uma investigação recente feita por Racette et al. (2011) mostrou que tais distúrbios são mínimos e que o tratamento com CC pode ser mantido.

Embora a ovulação seja restaurada em aproximadamente 70% das mulheres tratadas com CC, apenas pouco mais da metade obtêm gravidez (STEINER; TERPLAN; PAULSON, 2005). A falha na obtenção da gravidez, apesar da restauração dos ciclos ovulatórios pelo CC, não é bem compreendida. Entre as possíveis interferências nesse processo, é o efeito antiestrogênico do CC sobre o muco cervical e o endométrio.

Por isso, considerando os resultados descritos por Ruiz-Sanz et al. (2011), e sua relação com este estudo, nós não podemos descartar o possível papel do estresse oxidativo nesses dois processos (resistência ao CC e insucesso reprodutivo). Apesar dos dados aqui apresentados terem sido obtidos de mulheres jovens saudáveis, sem história de infertilidade, um ponto importante é que estudos prévios realizados pelo grupo de pesquisa que colaborou com a execução do presente estudo descreveram a associação da baixa atividade

enzimática da SOD2 relacionada ao alelo V com obesidade (MONTANO et al., 2009) e hipercolesterolemia e alta taxa de biomarcadores de estresse oxidativo (DUARTE et al., 2010). Como a SOP está intimamente relacionada à obesidade e outros distúrbios metabólicos, esses resultados indicam o potencial efeito do polimorfismo Ala16Val SOD2 na SOP. No entanto, até o momento, não há estudos na literatura que investiguem a associação entre SOP e o polimorfismo Ala16Val SOD2.

Por essa razão, investigações complementares necessitam ser realizadas, considerando: (1) a potencial associação entre o polimorfismo Ala16Val SOD2 e SOP; (2) análise do estado oxidativo de mulheres inférteis, antes e durante o tratamento com CC, e a sua potencial influência farmacogenética do polimorfismo Ala16Val SOD2.

Por fim, é importante ponderar algumas considerações sobre o aspecto metodológico deste trabalho. Nesse estudo, foi investigado o potencial efeito *in vitro* do CC sobre o metabolismo oxidativo do sangue e CMSP com diferentes genótipos Ala16Val SOD2. No entanto, não foram incluídas amostras de mulheres inférteis, já que um grande número de causas de infertilidade poderia influenciar os resultados obtidos aqui. Outra observação é que os resultados *in vitro* descritos neste estudo não são necessariamente reprodutíveis em estudos clínicos, uma vez que o CC é metabolizado diferentemente no organismo humano. Desse modo, reforça-se a necessidade de estudos clínicos complementares.

Por isso, a despeito dessas limitações, os resultados aqui descritos abrem uma perspectiva para a condução de diversos estudos complementares, que auxiliam no entendimento dos mecanismos envolvidos na infertilidade feminina e também no desenvolvimento de tratamentos personalizados.

6 CONCLUSÃO

A partir da avaliação da capacidade antioxidante do fármaco CC e seu potencial efeito na produção de radicais livres e citotoxicidade de sangue e células mononucleares periféricas oriundas de mulheres com diferentes genótipos do polimorfismo Ala16Val-SOD2, foi observado que:

- O CC possui capacidade antioxidante mesmo que baixa em relação ao ácido ascórbico avaliado em concentrações similares;
- O CC apresentou efeitos antioxidantes na produção de EROS dependendo da concentração do fármaco e do genótipo do polimorfismo Ala16Val-SOD2;
- Concentrações intermediárias do CC (5 e 10 μ M) foram as que apresentaram maior efeito antioxidante;
- Amostras provenientes de mulheres portadoras do genótipo AA apresentaram maior resposta antioxidante do que as provenientes dos demais genótipos;
- Avaliação da influência do CC na viabilidade celular mostrou que tratamentos com concentrações intermediárias aumentaram a tal viabilidade quando as amostras foram analisadas de modo conjunto.
- O conjunto dos resultados sugere efeito antioxidante do CC, entretanto tais efeitos são diretamente influenciados pelo polimorfismo Ala16Val SOD2 indicando ação farmacogenética do mesmo.

REFERÊNCIAS

- ADASHI, E. Y. Clomiphene citrate: the case for a monoisomeric preparation. **Baillière's Clinical Obstetrics and Gynaecology**, n. 7, p. 331-347, 1993.
- AGARWAL, A.; ALLAMANENI, S. S. Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. **Reproductive BioMedicine Online**, n. 9, p. 338-347, 2004.
- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R. K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, n. 3, p. 28, 2005.
- AL-GUBORY, K. H.; FOWLER, P. A.; GARREL, C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 2010.
- AMBROSONE, C. B.; FREUDENHEIM, J. L.; THOMPSON, P. A. Manganese superoxide dismutase (MnSOD) genetic polymorphisms, dietary antioxidants, and risk of breast cancer. **Cancer Research**, n. 59, p. 602-606, 1999.
- AVERY, S. V. Molecular targets of oxidative stress. **Biochemical Journal**, v. 1;434, n. 2, p. 201-210, Mar. 2011.
- BADAWY, A.; ELNASHAR, A. Treatment options for polycystic ovary syndrome. **Journal of Women's Health**, n. 3, p. 25-35, 2011.
- BICA, C. G. et al. MnSOD Gene Polymorphism Association with Steroid-Dependent Cancer. **Pathology and Oncology Research**, v. 15, p. 19-24, 2009.
- BICA et al. Association of manganese superoxide dismutase gene polymorphism (Ala-9Val) and breast cancer in males and females. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 3, p. 219-225, 2007.
- BROEKMANS, F. J. et al. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. **Human Reproduction Update**, v. 12, n. 6, p. 685-718, 2006.
- BURGER, H. G. et al. Prospectively measured levels of serum follicle-stimulating hormone, estradiol, and the dimeric inhibins during the menopausal transition in a population-based cohort of women. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, n. 84, p. 4025-4030, 1999.
- CARDOSO, C. M.; ALMEIDA, L. M.; CUSTÓDIO, J. B. Protection of tamoxifen against oxidation of mitochondrial thiols and NAD(P)H underlying the permeability transition induced by prooxidants. **Chemico-Biological Interactions**, n. 20, p. 148-161, 2004.

CHUANG, C. C. et al. Age is a better predictor of pregnancy potential than basal follicle-stimulating hormone levels in women undergoing in vitro fertilization. **Fertility and Sterility**, v. 79, n. 1, p. 63-68, 2003.

CLARK, J. H.; MARKAVERICH, B. M. Actions of ovarian steroid hormones. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. (eds.). **The Physiology of Reproduction**. New York: Raven Press, v. 1, p. 675-724, 1988.

DUARTE, M. M. et al. Oxidative stress in hypercholesterolemia and its association with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism. **Clinical Biochemistry**, v. 43, n. 13-14, p. 1118-1123, 2010.

FANCHIN, R. et al. High reproductibility of serum anti-Mullerian hormone measurements suggests a multi-staged follicular secretion and strengthens its role in the assessment of ovarian follicular status. **Human Reproduction**, v. 20, n. 4, p. 923-927, 2005.

FUJIMOTO, H.; TAGUCHI, J. I.; IMAI, Y. Manganese superoxide dismutase polymorphism affects the oxidized low-density lipoprotein- induced apoptosis of macrophages and coronary artery disease. **European Heart Journal**, n. 649, p. 1-6, 2008.

GLEICHER, N.; WEGHOFER, A.; BARAD, D. H. Defining ovarian reserve to better understand ovarian aging. **Reproductive Biology and Endocrinology**, 2011.

GOTTLIEB, M. G.; SCHWANKE, C. H.; SANTOS, A. F. Association among oxidized LDL levels, SOD2, apolipoprotein E polymorphisms, and cardiovascular risk factors in a south Brazilian region population. **Genetics and Molecular Research**, n. 4, p. 691-703, 2005.

HUGUES, J. N. et al. Assessment of theca cell function prior to controlled ovarian stimulation: the predictive value of serum basal/stimulated steroid levels. **Human Reproduction**, v. 25, n. 1, p. 228-234, Jan. 2010.

JOHNSON, P. Antioxidant enzyme expression in health and disease: effects of exercise and hypertension. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology**, n. 133, p. 493-505, 2002.

JOHNSON, N. P. et al. Ovarian reserve tests for predicting fertility outcomes for assisted reproductive technology: the International Systematic Collaboration of Ovarian Reserve Evaluation protocol for a systematic review of ovarian reserve test accuracy. **An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, n. 113, p. 1472-1480, 2006.

JOZWIK, M.; WOLCZYNSKI, S.; SZAMATOWICZ, M. Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans. **Human Reproduction**, n. 5, p. 409-413, 1999.

KAKKO, S.; PAIVANSALO, M.; KOISTINEN, P. The signal sequence polymorphism of the SOD2 gene is associated with the degree of carotid atherosclerosis. **Atherosclerosis**, n. 168, p. 147-152, 2003.

KUROSAWA, T. et al. Clomiphene citrate elicits estrogen agonistic/antagonistic effects differentially via estrogen receptors alpha and beta. **Endocrine Journal**. Epub, v. 57, n. 6, p. 517-521, 6 Apr. 2010.

LANDI, S. et al. Polymorphisms of glutathione-S-transferase M1 and manganese superoxide dismutase are associated with the risk of malignant pleural mesothelioma. **International Journal of Cancer**, n. 120, 2739–2743, 2007.

MAHESHWARI, A.; FOWLER, P.; BHATTACHARYA, S. Assessment of ovarian reserve - should we perform tests of ovarian reserve routinely?. **Human Reproduction**, v. 21, n. 11, p. 2729-2735, 2006.

MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 127-130, Mar. 2001.

MONTANO, M. A. E. et al. Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and elderly obesity. **Molecular and Cellular Biochemistry**, n. 328, p. 33-40, 2009.

NAHUIS, M. et al. Review of the safety, efficacy, costs and patient acceptability of recombinant follicle-stimulating hormone for injection in assisting ovulation induction in infertile women. **Journal of Women's Health**, v. 9, n. 1, p. 205-211, Aug. 2010.

NASSERI, S.; LEDGER, W. L. Clomiphene citrate in the twenty-first century. **Human Fertility (Cambridge)**, v. 4, n. 3, p. 145-151, 2001.

NAVOT, D.; ROSENWAKS, Z.; MARGALIOTH, E. J. Prognostic assessment of female fecundity. **The Lancet**, n. 2, p. 645-647, 1987.

OBATA, T. Tamoxifen protect against hydroxyl radical generation induced by phenelzine in rat striatum. **Toxicology**, n. 222, p. 46-52, 2006.

RACETTE, L. et al. An investigation of the visual disturbances experienced by patients on clomiphene citrate. **Fertility and Sterility**. Epub, v. 1;93, n. 4, p. 1169-1172, Mar. 2009 / Jan. 2010.

ROSTAMI-HODJEGAN, A. et al. Monitoring plasma concentrations to individualize treatment with clomiphene citrate. **Fertility and Sterility**, v. 81, n. 5, p. 1187-1193, May. 2004.

ROTA, C.; CHIGNELL, C. F.; MASON, R. P. Evidence for free radical formation during the oxidation of 2'-7'-dichlorofluorescein to the fluorescent dye 2'-7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase: possible implications for oxidative stress measurements. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, n. 7-8, p. 873-881, Oct. 1999.

RUENITZ, P. C. Rabbit liver microsomal metabolism of enclomiphene. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 9, n. 5, p. 456-60, Sep. / Oct. 1981.

RUIZ-SANZ, J. I. et al. Ala16Val SOD2 polymorphism is associated with higher pregnancy rates in in vitro fertilization cycles. **Fertility and Sterility**, n. 95, p. 1601-1605, 2011.

SCOTT, R. T. et al. A prospective evaluation of clomiphene citrate challenge teste screening in the general infertility population. **Obstetrics & Gynecology**, n. 82, p. 539-545, 1993.

SHARMA, R. K.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. **Journal of Urology**, n. 48, p. 835-850, 1996.

SHIMODA-MATSUBAYASHI, S. et al. Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, n. 226, p. 561-565, 1996.

SHOWELL, M. G. et al. Antioxidants for male subfertility. **Cochrane Database Syst Rev**, 2011.

SLANGER, T. E.; CHANG-CLAUDE, J.; WANG-GOHRKE, S. Manganese superoxide dismutase Ala-9Val polymorphism, environmental modifiers, and risk of breast cancer in a German population. **Cancer Causes and Control**, n. 17, p. 1025-1031, 2006.

STEINER, A. Z.; TERPLAN, M.; PAULSON, R. J. Comparison of tamoxifen and clomiphene citrate for ovulation induction: a meta-analysis. **Human Reproduction**, v. 20, n. 6, p. 1511-1515, Jun. 2005.

STINGL KIRCHHEINER, J. C.; BROCKMÖLLER, J. Why, when, and how should pharmacogenetics be applied in clinical studies?: current and future approaches to study designs. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 89, n. 2, p. 198-209, Feb. 2011.

SUTTON, A.; KHOURY, H.; PRIP-BUUS, C. The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. **Pharmacogenetics**, n. 13, p. 145-157, 2003.

SZUTU, M. et al. Pharmacokinetics of intravenous clomiphene isomers. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 27, n. p. 639-640, May. 1989.

TAMBO, T. et al. Follicle stimulation hormone as a prognostic indicator in clomiphene citrate/human menopausal gonadotrophin-stimulated cycle for in vitro fertilization. **Human Reproduction**, n. 6, p. 647-650, 1989.

TAMIMI, R. M.; HANKINSON, S. E.; SPIEGELMAN, D. Manganese superoxide dismutase polymorphism, plasma antioxidants, cigarette smoking, and risk of breast cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, n. 13, p. 989-996, 2004.

TANIELIAN, C. et al. Mechanistic and kinetic aspects of photosensitization in the presence of oxygen. **Journal of Photochem. Photobiol**, n. 71, p. 12-19, 2000.

TAUFER, M. et al. Is the Val16Ala manganese superoxide dismutase polymorphism associated with the aging process?. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 60, n. 4, p. 432-438, Apr. 2005.

TE VELDE, E. R. et al. Developmental and endocrine aspects of normal ovarian aging. **Molecular and Cellular Endocrinology**, n. 145, p. 67-73, 1998.

TE VELDE, E. R.; PEARSON, P. L. The variability of female reproductive ageing. **Human Reproduction Update**, n. 8, p. 141-154, 2002.

VISSER, J. A. et al. Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function. **Reproduction**, n. 131, p. 1-9, 2006.

WAKADE, C. et al. Tamoxifen neuroprotection in cerebral ischemia involves attenuation of kinase activation and superoxide production and potentiation of mitochondrial superoxide dismutase. **Endocrinology**, n. 149, p. 367-379, 2008.

WANG, L.; MCLEOD, H. L.; WEINSHILBOUM, R. M. Genomics and drug response. **The New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 12, p. 1144-1153, Mar. 2011.



WOODALL, A. A.; AMES, B. Nutritional prevention of DNA damage to sperm and consequent risk reduction in birth defects and cancer in offspring. In: **Preventive Nutrition: the comprehensive guide for health professionals**. Totowa: Humana Press, p. 373-385, 1997.

YAŞAR, H. Y.; ERTUĞRUL, O. Clomiphene citrate-induced severe hypertriglyceridemia. **Fertility and Sterility**, v. 92, n. 1, p. 396-398, Jul. 2009.

ZELKO, I. N.; MARIANI, T. J.; FOLZ, R. J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn- SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. **Free Radical Biology & Medicine**, n. 33, p. 337-349, 2002.

ANEXOS

ANEXO A – CARTA APROVAÇÃO DO PROJETO CEP-UFSM

 <p>MINISTÉRIO DA SAÚDE Conselho Nacional de Saúde Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)</p>	<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa Comitê de Ética em Pesquisa - CEP- UFSM REGISTRO CONEP: 243</p> 
--	---

CARTA DE APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa – UFSM, reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – (CONEP/MS) analisou o protocolo de pesquisa:

Título: Associação entre estresse oxidativo e reserva ovariana avaliada através da administração de citrato de clomifeno

Número do processo: 23081.015821/2010-73

CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética): 0283.0.243.000-10

Pesquisador Responsável: Ivana Beatrice Mânica da Cruz

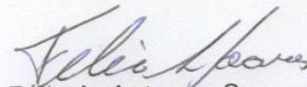
Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes estabelecidas na Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê. O pesquisador deve apresentar ao CEP:

Janeiro/ 2013- Relatório final

Os membros do CEP-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

DATA DA REUNIÃO DE APROVAÇÃO: 21/12/2010

Santa Maria, 21 de Dezembro de 2010.



Félix A. Antunes Soares
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa-UFSM
Registro CONEP N. 243.

**ANEXO B – MANUSCRITO: THE SOD2 POLYMORPHISM
AND CITRATE CLOMIPHENE**

The SOD2 polymorphism and Citrate clomiphene

The influence of the Ala16Val SOD2 polymorphism on the *in vitro* effect of clomiphene citrate in oxidative metabolism

Felipe Costa¹, Eduardo Dornelles², Maria Fernanda Mânica-Cattani³, Thaís Doeler Algarve⁴, Olmiro Cezimbra de Souza Filho⁵, Michele Rorato Sagrillo⁶, Luiz Filipe Machado Garcia⁷, Ivana Beatrice Mânica da Cruz^{8*}.

¹ MD, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil

² MSc, Laboratório de Biogenômica, Departamento de Morfologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil

³ PhD, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil

⁴ MSc, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil

⁵ MD, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil

⁶ MSc, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil

⁷ MSc, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil

⁸ PhD, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil

* Corresponding author: Ivana BM da Cruz, Av. Roraima 1000, Prédio 19, UFSM, Santa Maria-RS, Brazil. Zip code: 90105900. Phone: 55-55-32208163, Fax: 55-55-32208139, Email: ibmcruz@hotmail.com

Statement: The authors declare that they do not have any potential conflicts of interest pertaining to the study presented in this manuscript.

Financial support: Brazilian research support agencies CNPq (300969/2009-0), FAPERGS (1006741)

CAPSULE

An *in vitro* study was performed to evaluate the antioxidant properties of citrate clomiphen (CC) in the presence of the Ala16Val SOD2 polymorphism. The results suggest that CC exerts antioxidant pharmacogenetic effects.

ABSTRACT

Objective: To investigate the *in vitro* antioxidant properties of the ovulation induction drug, Citrate clomiphene (CC), and to assess whether its effects are influenced by the Ala16Val polymorphism in the SOD2 gene, which encodes mitochondrial manganese superoxide dismutase (SOD).

Design: An *in vitro* experimental study testing the effect of different concentrations of CC on antioxidant capacity, reactive oxygen species (ROS) production and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) culture viability.

Setting: A public university, Biogenomic Lab.

Patient(s): A total of 58 healthy adult women were genotyped for the Ala16Val SOD2 polymorphism, and blood samples were collected to perform *in vitro* experiments analyzing the biological antioxidant effects of CC.

Main Outcome Measure(s): Free radical production and cytotoxicity assays were performed on blood and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) with different Ala16Val SOD2 genotypes.

Result(s): According to the observations described here, CC exhibited antioxidant effects. Additionally, the CC treatments led to a decrease in ROS production, with blood samples from the AA genotype displaying a more responsive antioxidant effect from CC than other genotypes. AA and AV PBMCs showed an increase in viability following treatment with 10 μ M CC when compared with PBMCs from control groups. In the VV PBMC group, only the 5 μ M and 10 μ M CC treatments presented a significant positive viability effect.

Conclusion(s): CC exhibits antioxidant activity, similar to that observed with other Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs), in the presence of the Ala16Val-SOD2 polymorphism.

Key words: Citrate clomiphene, Ala16Val SOD2 gene polymorphism, antioxidant, ovulation drug, pharmacogenetic, cytotoxicity

Introduction

In the female reproductive system, reactive oxygen species (ROS) and antioxidants play a physiological role in folliculogenesis, oocyte maturation, luteal regression, and fertilization (1). However, an increase in ROS production leads to oxidative stress, which has been associated with reduced oocyte fertilization (2,3), and aberrant embryonic development, which leads to early embryo death (4,5). Recently, studies performed by Aurrekoetxea et al. (6) have also suggested that oxidative stress affects the success of *in vitro* fertilization therapy (IVF).

These adverse effects may be caused by a chronic ROS imbalance resulting from environmental and/or genetic alterations in antioxidant enzyme activity. This is the case with superoxide dismutase enzymes (SODs), which play a crucial role in the protection against ROS-induced mitochondrial damage (7). SODs degrade the superoxide anion (O_2^-) in hydrogen peroxide (H_2O_2), which in turn is degraded by other enzymes in water. There are three SOD intracellular isoforms: the Manganese-SOD (SOD2 or MnSOD), which is the mitochondrial isoform, and two Copper/Zinc-SOD isoforms (SOD1 and SOD3), which are the cytoplasmic and extracellular isoforms, respectively (8).

Previous studies have demonstrated that SOD enzyme activity could be associated with oocyte quality and may influence the success of assisted reproductive techniques (ART) (9,10). This hypothesis was recently supported by a genetic study performed by Ruiz-Sans et al. (11). In the Ruiz-Sans study, the SOD2 polymorphism that was analyzed was characterized by a valine-to-

alanine substitution (rs4880), at amino acid position 16 (Ala16Val), which results in three different genotypes: AA, VV, and AV the Ala-MnSOD precursor generated 30-40% more of the active, processed MnSOD homotetramer, than did the Val-MnSOD precursor. In this case, the Ala-MnSOD/MTS allows for efficient MnSOD import into the mitochondrial matrix, while the Val variant causes partial arrest of the precursor within the inner membrane and decreased formation of the active MnSOD homotetramer in the mitochondrial matrix (12,13). In the Ruiz-Sans study (11), the authors found that the AA-SOD2 genotype was a significant independent predictor of the likelihood of successful IVF pregnancy .

These results raised questions about the potential pharmacogenetic influence of the Ala16Val SOD2 polymorphism on the activity of target molecules used to induce ovulation or to perform ovarian reserve tests, such as clomiphene citrate (CC). CC is a non-steroidal selective estrogen receptor modulator (SERM) used to induce ovulation in polycystic ovary syndrome and to perform ovarian reserve tests in ART (14,15).

However, despite the use of CC since its introduction in 1956 and the data from studies suggesting that other SERMS, such as tamoxifen and ramoxifen, have antioxidant effects (16,17,18), studies investigating the influence of CC on oxidative metabolism are just emerging.

Therefore, we evaluated the potential antioxidant capacity and the *in vitro* effect of CC on specific parameters of oxidative metabolism (blood ROS production and peripheral mononuclear blood cell (PBMC) culture viability). Additionally, we evaluated whether these results could be directly influenced by

the Ala16Val SOD2 polymorphism. We choose this experimental model because the blood samples were easy to obtain from donors with different SOD2 genotypes and because PBMCs express the estrogen receptor alpha (ESR1) and beta (ESR2) proteins (19) and, therefore, are potentially responsive to CC activity.

Materials and Methods

Materials

All of the chemicals used for the biochemical and molecular analyses were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA), Invitrogen (USA) and Cultilab Co. (São Paulo, Brazil).

CC treatments

To test the potential *in vitro* effects of CC on oxidative metabolism and lymphocyte proliferation, we used four different concentrations of CC (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M and 20 μ M), as described in a previous study by Kurosawa et al. (20). CC was initially dissolved in 70% alcohol and then further dissolved in buffer or cell culture medium according the experimental protocol. All experiments were performed at least in triplicate.

Antioxidant capacity: Radical-scavenging activity - DPPH assay

The antioxidant capacity of CC at different concentrations was evaluated by monitoring its ability to quench the stable free radical DPPH (21). Ascorbic acid was used as a control antioxidant molecule at the same concentrations of CC. The scavenging ability of DPPH was expressed as a percentage of DPPH inhibition.

Subjects and Ala16Val SOD2 polymorphism analysis

To test the effect of CC on ROS production and cell viability, we used total blood and PBMC samples collected from women with different Ala16Val SOD2 genotypes. In a previous genetic study of the Ala16Val SOD2 polymorphism (22,23,24) involving a population living in the southern region of Brazil, we selected 58 young, healthy females (26.4 ± 7.3 years old, menarche = 12.37 ± 3.48 years old). Blood samples were collected from this group, and the Ala16Val gene polymorphism was assessed by Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism methods. The SOD2 genotype frequencies were the following: AA = 25.9%, VV = 27.6% and AV = 46.6%. The calculation of possible deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium, which was used to assess the χ^2 goodness-of-fit, showed that the samples were in genetic equilibrium. From these patient samples, we excluded patients who were smokers, obese, using chronic medication, using vitamin supplements or

taking hormonal contraceptives. Patients included in the study had no cardiovascular medical history, no hypertensive disorder, and no metabolic diseases or other morbidity that could affect the results. The research study described here is associated with the research project that was approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal de Santa Maria. All blood cell donors signed a consent form.

Because a previous study performed by Montano et al. showed a association between the Ala16Val polymorphism and dietary behavior, we selected volunteers with similar lifestyle behaviors regarding diet and physical activity to avoid possible environmental interferences. Additionally, we asked volunteers to avoid consuming antioxidant-containing food 24 hours before blood collection. The foods that were not consumed by the volunteers included salads, fruits and juices (natural or manufactured). Three subjects of each genotype, who were considered to have the ideal profile, were selected as blood donors for the biological assays that were performed in the study.

The blood samples were collected by venipuncture using top tubes with heparin (5 ml), which were centrifuged within 1 h of collection for 15 min at 2500 g. These samples were also used in the other experiments described below.

The effect of CC on Radical Oxidative Species (ROS) plasma production measured using DCFH-DA oxidation

The total blood samples were suspended in 5.0 mM PBS both with and without CC for 60 minutes in a 1×10^5 cells concentration. Intracellular ROS

production was detected in human leukocytes using the non-fluorescent cell permeating compound 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA). DCFH-DA is hydrolyzed by intracellular esterases to DCFH, which is trapped within the cell. This non-fluorescent molecule is then oxidized to fluorescent dichlorofluorescein (DCF) by cellular oxidants. After CC exposure, the cells were treated with DCFH-DA (10 μ M) for 60 min at 37 °C. The fluorescence was measured at an excitation of 485 nm and an emission of 520 nm. The calibration curve was performed with standard DCF (0–1 mM), and the level of ROS production was calculated as nmol DCF formed/mg protein (25).

Cytotoxicity of Ala16Val SOD2 Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) after CC treatment

The effect of CC on PBMC viability was measured using a protocol similar to the PBMC culture assay described previously by Montagner et al. (26). Briefly, the blood samples were collected and centrifuged, and then the cells were transferred to culture media containing 5 ml RPMI 1640 with 10% fetal calf serum (FCS) and 1% penicillin/streptomycin. The cells were cultured in a 96-well plate at a density of 1×10^5 cells in 100 μ l of culture medium for 72 hours at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. The cells were counted, centrifuged and transferred to a new culture media containing CC. The PBMCs (1×10^7 cell) were treated with CC for 24 h; each treatment concentration was performed in triplicate. After this period, PBMC viability was assessed using an

MTT (3-[4,5dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolic bromide) reduction assay (27).

Statistics

All analyses were carried out using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) version 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). The mean values were compared among different CC concentrations, using ascorbic acid as an antioxidant control compound, were determined using the One-way analysis of variance followed by a *post hoc* Tukey's test. The cytotoxicity effect of CC on PBMCs from different Ala16Val SOD2 donor samples was compared using the Two-way analysis of variance followed by a *post hoc* Tukey's test. All p values were two-tailed. The alpha value was set to ≤ 0.05 to determine statistical relevance.

Results

Before evaluating the *in vitro* effect of CC treatment on blood and PBMCs with different Ala16Val SOD2 genotypes, we analyzed the antioxidant capacity of CC using a DPPH assay. The antioxidant capacity of CC was compared with that of the antioxidant molecule, ascorbic acid, at the same concentrations; these results are presented in Figure 1. According to our results, the CC treatment caused some antioxidant effects. However, its antioxidant capacity was 24.5% of that of ascorbic acid (20 μ M).

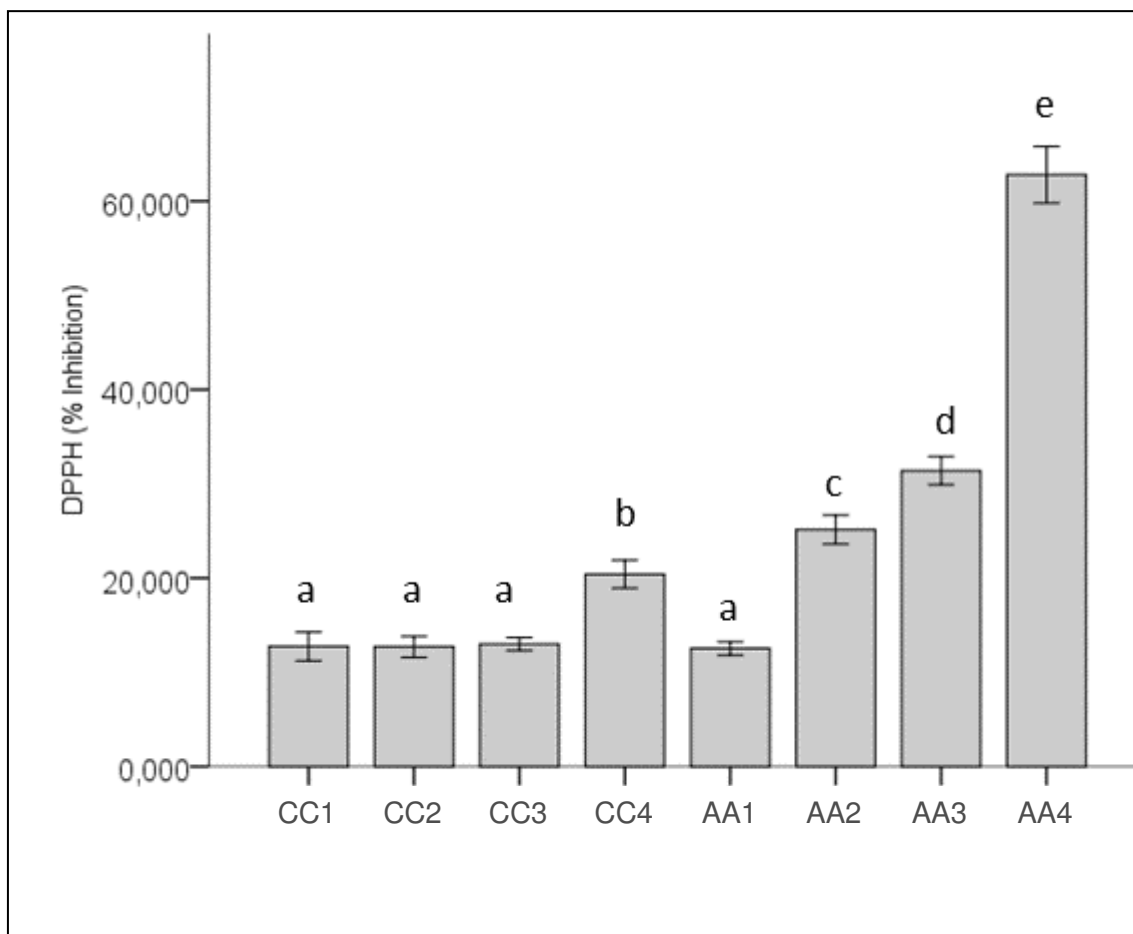


Figure 1 Percentage inhibition of DPPH by the different Clomiphene Citrate (CC1=1 μ M, CC2= 5 μ M, CC3= 10 μ M, CC4=20 μ M) concentrations and ascorbic acid (AA1= 1 μ M, AA2= 5 μ M, AA3= 10 μ M, AA4= 20 μ M). Different letters indicated statistical differences compared by Anova One-Way followed by Tukey test.

The CC treatments on *in vitro* biological samples showed antioxidant effects on the blood total ROS production when compared with the control group without treatment (Table 1). However, the effect was not dose-dependent because a U curve was observed when analyzing the effect of the CC concentrations. The higher antioxidant effect was observed with 5 μ M CC, while treatment with 20 μ M CC showed similar ROS production to that of the control group.

Table 1 Comparison among different Citrate Clomiphene concentrations of reactive oxidative species (ROS) production by blood total evaluated by fluorimetric DCFH-DA assay

Treatments	Median±SD fluorescence ratio
Control	86.33±11.52 ^a
CC 1 µM	68.27±10.51 ^{bc}
CC 5 µM	56.40±18.93 ^c
CC 10 µM	63.28±21.06 ^{bc}
CC 20 µM	74.50±20.49 ^{ab}

Different letters indicated statistical differences compared by Anova One-Way followed by Tukey test.

Additionally, we noticed a variation in ROS production in response to CC treatment when we considered the Ala16Val polymorphism genotypes (Figure 2). The AA genotype was more responsive to CC treatments at 1 µM, 5 µM and 10 µM, as displayed by the significant decreased in ROS production that was observed when compared with the control group. However, the blood from VV patients displayed an antioxidant effect on ROS production exclusively at the 1 µM CC concentration. Heterozygous (AV) samples did not show any antioxidant effects following CC treatment when compared with the untreated group.

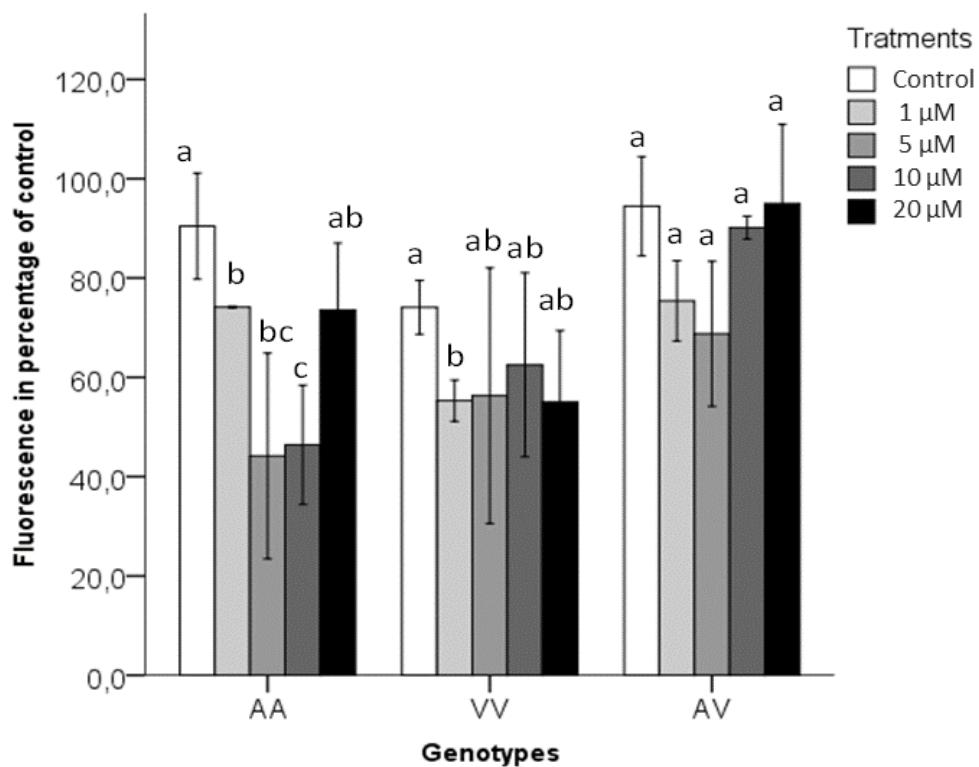


Figure 2 Inhibition of blood total oxidative metabolism by different concentrations of citrate clomiphene (CC). The inhibition is presented in percentage of controls with no CC (CC1=1 μ M, CC2= 5 μ M, CC3= 10 μ M, CC4=20 μ M) to each Ala16ValGenotypes. Different letters indicated statistical differences among CC treatments in each genotype group.

A third experiment was performed to assess the effect of CC on PBMC cytotoxicity. In general, CC treatments at concentrations of 10 μ M and 20 μ M caused an increase in the mitochondrial function, which indicated a positive influence on cell viability by CC. However, these results were also Ala16Val-SOD2-dependent (Table 2).

Table 2 Comparison of cytotoxicity (MTT assay) among PBMC cells with different Ala16Val SOD2 genotypes treated with different Citrate Clomiphene concentrations.

Treatments	Genotypes		
	AA	VV	AV
	Mean±SD*	Mean±SD	Mean±SD
Control	0.22±0.04 ^a	0.19±0.03 ^a	0.12±0.02 ^a
CC 1 µM	0.19±0.05 ^a	0.20±0.01 ^{ab}	0.11±0.02 ^a
CC 5 µM	0.27±0.01 ^a	0.31±0.06 ^b	0.18±0.04 ^a
CC 10 µM	0.51±0.07 ^b	0.31±0.14 ^b	0.48±0.12 ^b
CC 20 µM	0.60±0.02 ^c	0.16±0.01 ^a	0.74±0.03 ^c

Different letters indicated statistical differences compared by Anova One-Way followed by Tukey test. * MTT formazan/µg cell protein

The AA and AV PBMC samples showed an increase in viability with the 10 µM and 20 µM CC treatments when compared with control groups and the treatments with low CC concentrations. In these cells, the 20-µM CC treatment showed higher viability than other treatments. However, these results were not observed in VV-PBMC samples. In this genotype group, only the 5 µM and 10 µM CC concentrations had an effect on cell viability.

DISCUSSION

In this work, we observed that CC displays an antioxidant capacity and an effect on oxidative metabolism as evaluated by ROS production. Additionally, we observed that CC treatments at some concentrations

(predominantly 5 μ M and 10 μ M) led to increased PBMC viability. However, perhaps the most important finding in this study was the potential pharmacogenetic effect of the Ala16Val SOD2 polymorphism on the variables analyzed here. Although this study involved *in vitro* experiments and was limited to a few samples with different Ala16Val SOD2 genotypes, these results are interesting and should be investigated further.

For the past four decades, clomiphene citrate (CC), a SERM drug, has been used as the primary treatment for infertility by the World Health Organization for group II anovulatory patients (19). In some cases, SERMs may antagonize the effects of estrogen by preventing estrogen molecules from binding to receptor sites, while in other cases, these drugs exert estrogenic activity by mimicking estrogen. Additional investigations showed that SERMs, such as tamoxifen and raloxifen, which are used in breast cancer and osteoporosis treatments, also exert antioxidant effects and, therefore, have positive biological effects on cardiovascular and neural physiology (14,16,28,29,30,31,32,33). However, to the best of our knowledge, previous studies of the antioxidant effects of CC were mostly preliminary, and the results described here suggest that this SERM also exerts antioxidant effects.

However, these effects are influenced by the presence of the Ala16Val SOD2 polymorphism. These data are interesting because another independent research group recently described the association of this polymorphism with the success of IVF (11). The authors studied 148 infertile women and found that the AA females showed a higher pregnancy rate with IVF. Based on these results,

the authors suggested that antioxidant defense, particularly in the mitochondria, could contribute to conception IVF success.

If SOD2 is indeed a key molecule involved in the female reproductive metabolism, we could speculate that alterations in SOD2 activity caused by the Ala16Val polymorphism could result in differential responses to drugs such as CC. However, whether its activity could have a pharmacogenetic effect on patients with CC resistance during the induction of ovulation or whether it causes side effects is unknown.

In reproductive clinics, CC is commonly used to induce ovulation, especially in patients with polycystic ovary syndrome (PCOS), although controversies regarding its treatment do exist (34,35). Additionally, CC is used to evaluate the ovarian reserve (Navot test) in infertile women. However, two main complications may occur during treatment. The patients may be CC resistant; either ovulation is not triggered by the drug, or ovulation is induced, but the pregnancy still fails (23). The causes associated with CC resistance remain unclear and are currently being investigated.

In the latter complication, although ovulation is restored in approximately 70% of women treated with CC, fewer than half become pregnant (36). The reason that the pregnancies fail despite the increase in the ovulation induced by CC is not well understood. One cause of pregnancy failure is the estrogen antagonist effects of CC in the cervical mucosa and endometrial tissue.

Therefore, considering the results described by Ruiz-Sanz et al. (11) and the observations reported in this study, we cannot ignore the possible role of oxidative stress in these two scenarios (CC resistance and pregnancy failure).

Although our data were obtained from young healthy women without a history of infertility, it is important to point out that the previous studies performed by our research team described a link between the lower SOD2 activity associated with the V allele and obesity, hypercholesterolemia and higher oxidative stress biomarkers (24,26). As PCOS is closely associated with obesity and other metabolic disorders, these results indicate the potential effect of Ala16Val SOD2 polymorphism in PCOS. However, at the moment, we are unable to locate association studies between PCOS and the Ala16Val SOD2 polymorphism in the literature. The absence of clinical data could be considered the main methodological limitation of our study. However, we believed that it was important to perform the initial *in vitro* analysis described here, which contributes to the evaluation of the impact of the SOD2 polymorphism on the treatment of women with CC in a clinical setting. Complementary investigations must be performed that consider the potential association between the Ala16Val SOD2 polymorphism and PCOS, the oxidative status of infertile women before and during CC treatment and the potential pharmacogenetic influence of the Ala16Val SOD2 polymorphism.

However, despite these limitations, the results described here shed light on several complementary studies that could help to understand the mechanisms involved in female infertility and may assist with the development of personalized treatments.

REFERENCES

-
1. Agarwal A, Gupta S, Sharma R. Oxidative stress and its implications in female infertility - a clinician's perspective. *Reprod Biomed Onl* 2005;11:641-50.
 2. Seino T, Saito H, Kaneko T, Takahashi T, Kawachiya S, Kurachi H. Eight-hydroxy-2'-deoxyguanosine in granulosa cells is correlated with the quality of oocytes and embryos in an *in vitro* fertilization-embryo transfer program. *Fertil Steril* 2002;77:1184-90.
 3. Jancar N, Kopitar AN, Ihan A, Virant Klun I, Bokal EV. Effect of apoptosis and reactive oxygen species production in human granulosa cells on oocyte fertilization and blastocyst development. *J Assist Reprod Genet.* 2007;24:91-7.
 4. Johnson MH, Nasr-Esfahani MH. Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos *in vitro*? *Bioessays.* 1994;16:31-8.
 5. Matsuzuka T, Ozawa M, Nakamura A, Ushitani A, Hirabayashi M, Kanai Y. Effects of heat stress on the redox status in the oviduct and early embryonic development in mice. *J Reprod Dev.* 2005;51:281-7.
 6. Aurrekoetxea I, Ruiz-Sanz JI, del Agua AR, Navarro R, Hernández ML, Matorras R et al. Serum oxidizability and antioxidant status in patients undergoing *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 2010;94:1279-86.
 7. Beyer W, Imlay J, Fridovich I. Superoxide dismutases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1991;40:221-53
 8. Miao L, St Clair DK. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic Biol Med.* 2009;47:344-56.
 9. Sabatini L, Wilson C, Lower A, Al-Shawaf T, Grudzinskas JG. Superoxide dismutase activity in human follicular fluid after controlled ovarian hyperstimulation in women undergoing *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 1999; 72:1027-34
 10. Matos L, Stevenson D, Gomes F, Silva-Carvalho JL, Almeida H. Superoxide dismutase expression in human cumulus oophorus cells. *Mol Hum Reprod* 2009;15:411-9.

-
11. Ruiz-Sanz JI, Aurrekoetxea I, Matorras R, Ruiz-Larrea MB. Ala16Val SOD2 polymorphism is associated with higher pregnancy rates in in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril*. 2011;95:1601-5.
 12. Shimoda-Matsubayashi S, Matumine H, Kobayashi T, Nakagawa-Hattori Y, Shimizu Y, Mizuno Y. Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 22: 6561-565.
 13. Sutton A, Khoury H, Prip-Buus C, Capanec C, Pessayre D, Degoul F. The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria'. *Pharmacogenet* 2003; 13:145-157.
 14. Steiner AZ, Terplan M, Paulson RJ. Comparison of tamoxifen and clomiphene citrate for ovulation induction: a meta-analysis. *Hum Reprod* 2005; 20:1511-5.
 15. Badawy A, Elnashar A. Treatment options for polycystic ovary syndrome. *Int J Womens Health* 2011;3:25-35.
 16. Cardoso CM, Almeida LM, Custódio JB. Protection of tamoxifen against oxidation of mitochondrial thiols and NAD(P)H underlying the permeability transition induced by prooxidants. *Chem Biol Interact* 2004; 20;148:149-61.
 17. Obata T Tamoxifen protect against hydroxyl radical generation induced by phenelzine in rat striatum. *Toxicology* 2006; 222:46–52.
 18. Wakade C, Khan MM, De Sevilla LM, Zhang QG, Mahesh VB, Brann DW. Tamoxifen neuroprotection in cerebral ischemia involves attenuation of kinase activation and superoxide production and potentiation of mitochondrial superoxide dismutase. *Endocrinology* 2008;149:367-79.
 19. Scariano JK, Emery-Cohen AJ, Pickett GG, Morgan M, Simons PC, Alba F. Estrogen receptors alpha (ESR1) and beta (ESR2) are expressed in circulating human lymphocytes. *J Recept Signal Transduct Res* 2008;28:285-9.
 20. Kurosawa, T. et al. Clomiphene citrate elicits estrogen agonistic/antagonistic effects differentially via estrogen receptors alpha and beta. *Endocr J*. Epub, v. 57, n. 6, p. 517-521, 6 Apr. 2010.
 21. Choi CW, Kim SC, Hwang SS et al. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Sci* 2002; 163:1161-1168.
 22. Taufer M, Peres A, de Andrade VM, de Oliveira G, Sá G, do Canto ME, dos Santos AR, Bauer ME, da Cruz IB. Is the Val16Ala manganese superoxide dismutase polymorphism associated with the aging process? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2005;60:432-8

-
23. Montano MAE, Lera JPB, Gottlieb MG, Schwanke CHA, da Rocha MIUM, Manica-Cattani MF, dos Santos GF, da Cruz IBM. Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and elderly obesity'. *Mol Cell Biochem* 2009; 328:33-40.
24. Duarte MM, Moresco RN, Duarte T, Santi A, Bagatini MD, Da Cruz IB, Schetinger MR, Loro VL. Oxidative stress in hypercholesterolemia and its association with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism. *Clin Biochem* 2010;43:1118-23.
25. Wallace DR, Dodson SL, Nath A, Booze RM. Delta opioid agonists attenuate TAT(1-72)-induced oxidative stress in SK-N-SH cells. *Neurotoxic* 2006;27:101-7
26. dos Santos Montagner GF, Sagrillo M, Machado MM, Almeida RC, Mostardeiro CP, Duarte MM, da Cruz IB. Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. *Toxicol In Vitro* 2010;24:1410-6.
27. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J Immunol Methods* 1983; 65:55-63.
28. Custódio JB, Dinis TC, Almeida LM, Madeira VM. Tamoxifen and hydroxytamoxifen as intramembraneous inhibitors of lipid peroxidation. Evidence for peroxy radical scavenging activity. *Biochem Pharmacol* 1994;47:1989-98.
29. Hernández-Esquivel L, Natalia-Pavón, Zazueta C, García N, Correa F, Chávez E. Protective action of tamoxifen on carboxyatractyloside-induced mitochondrial permeability transition. *Life Sci* 2011;88:681-7.
30. Morota S, Månsson R, Hansson MJ, Kasuya K, Shimazu M, Hasegawa E et al. Evaluation of putative inhibitors of mitochondrial permeability transition for brain disorders--specificity vs. toxicity. *Exp Neurol* 2009; 218:353-62.
31. Ozbasar D, Toros U, Ozkaya O, Sezik M, Uzun H, Genc H et al. Raloxifene decreases serum malondialdehyde and nitric oxide levels in postmenopausal women with end-stage renal disease under chronic hemodialysis therapy. *J Obstet Gynaecol Res* 2010;36:133-7.
32. Wong CM, Yung LM, Leung FP, Tsang SY, Au CL, Chen ZY et al. Raloxifene protects endothelial cell function against oxidative stress. *Br J Pharmacol* 2008;155:326-34.

-
33. Wong CM, Yung LM, Leung FP, Tsang SY, Au CL, Chen ZY et al. Raloxifene protects endothelial cell function against oxidative stress. *Br J Pharmacol* 2008;155:326-34.
34. Thessaloniki ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Consensus on infertility treatment related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2008;89:505-22.
35. Jungheim ES, Odibo AO. Fertility treatment in women with polycystic ovary syndrome: a decision analysis of different oral ovulation induction agents. *Fertil Steril* 2010;94:2659-64.
36. Homburg R. Clomiphene citrate--end of an era? A mini-review. *Hum Reprod* 2005;20:2043-51.