UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Caroline Mantovani da Luz

**Perfil diferencial de transcritos de células do *cumulus*
oophorus de mulheres inférteis com e sem
endometriose submetidas à estimulação ovariana**

Ribeirão Preto
2016

Caroline Mantovani da Luz

**Perfil diferencial de transcritos de células do *cumulus*
oophorus de mulheres inférteis com e sem
endometriose submetidas à estimulação ovariana**

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

Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia.

Orientadora: Professora Doutora Paula Andrea de
Albuquerque Salles Navarro.

Ribeirão Preto

2016

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Luz, Caroline Mantovani da

Perfil diferencial de transcritos de células do *cumulus oophorus* de mulheres inférteis com e sem endometriose submetidas à estimulação ovariana. Ribeirão Preto, 2016.

77 p.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia.

Orientadora: Navarro, Paula Andrea de Albuquerque Salles.

1. Endometriose. 2. Endometrioma 3. Infertilidade feminina. 4. Células do cumulus. 5. RNA-Seq. 6. Perfil diferencial de transcritos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Caroline Mantovani da Luz

Perfil diferencial de transcritos de células do *cumulus oophorus* de mulheres inférteis com e sem endometriose submetidas à estimulação ovariana

Dissertação apresentada ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências Médicas.
Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Presidente da banca Dr. Rui Alberto Ferriani
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

Assinatura: _____

Professor Dr. Wilson Araújo da Silva Junior
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

Assinatura: _____

Professor Dr. Fernando Marcos dos Reis
Faculdade de Medicina – UFMG

Assinatura: _____

Dedicatória

Aos meus pais, Izanete e Jorge, pelos exemplos de caráter e de luta,
pelo incentivo a conquista de meus objetivos e
pelo apoio incondicional nesta jornada.

Agradecimentos

A Deus pela proteção, força e superação.

A minha mãe, Izanete R. M. da Luz, pelo exemplo de professora, sempre persistente na arte de ensinar. São suas palavras de carinho e calma que me incentivam a jamais desistir. Ao meu pai, Jorge L. da Luz, e meu irmão, Pedro H. M. da Luz, pela presença mesmo distante e pelo amor imensurável. A minha família, minha maior riqueza, pela compreensão da ausência, pelo suporte emocional e financeiro e por sempre me receberem de braços abertos. Vocês são e sempre serão meu porto seguro.

Ao meu melhor amigo e namorado, Dr. Fernando T. T. Frajacom, pelo estímulo a seguir a carreira acadêmica e ampliar meus horizontes. Obrigada por estar ao meu lado em todos os momentos.

A minha incansável orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Paula A. A. S. Navarro exemplo de profissional, pelo acolhimento e incentivo nesta jornada. Pelas sábias palavras e principalmente por acreditar em meu potencial.

À Dr^ª. Juliana Meola Lovato, pela amizade, companheirismo e pelo comprometimento com este estudo. Você intensificou em mim a paixão pela genética. Sem você esta caminhada teria sido assustadoramente árdua.

À amiga Dr^ª. Michele Gomes da Broi, pelo auxílio e dedicação à este trabalho. Sua doação à pesquisa será sempre um exemplo para mim.

Ao Dr. Rui Alberto Ferriani, pelo acolhimento, solicitude e inspiração.

Às amigas e colegas de pós-graduação pelo companheirismo, pelo carinho familiar e por transformarem meus dias. Vocês tornaram esta jornada mais leve.

Às técnicas do Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular pelos treinamentos e auxílio nos experimentos. Em especial a Cristiana Carolina Padovan, pelo amparo de mãe

desde o princípio e a Lilian Eslaine C. M. da Silva, pelos conselhos sempre presentes.

Às funcionárias do Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia, Setor de Reprodução Humana, do Hospital das Clínicas desta faculdade, pelo carinho, apoio e dedicação. Especialmente as embriologistas Maria Cristina Picinato, Roberta C. Giorgenon, Camila Kokudai e Thalita Bertelli pela coleta das amostras de células do cumulus. A auxiliar de enfermagem Maria Auxiliadora P. Rosa pelo carinho e acolhida a rotina da enfermagem durante minha passagem pelo Setor de Reprodução Humana.

À secretária da pós graduação do departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP, Suelen Soares pela amizade e auxílio constante.

Ao Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática do Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto, em especial ao Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Junior, a Kamila Peronni, Anemary Dinarte e principalmente a bioinformata Jessica Praça pelo auxílio técnico e científico, sem os quais esse trabalho não seria executado.

À equipe de Genômica do Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD), da Universidade Estadual de Campinas, pelo empenho no desenvolvimento da etapa de sequenciamento.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de mestrado e pelo auxílio financeiro, imprescindíveis para o desenvolvimento deste projeto.

Aos componentes da banca avaliadora, Prof. Dr. Fernando Marcos dos Reis e Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Junior, pela disponibilidade e pelas valiosas contribuições.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram, direta ou indiretamente, para realização deste trabalho.

De modo especial a todas as pacientes que aceitaram participar do estudo.

Obrigada!

Epígrafe

“Uma teoria pode ser comprovada por experimentos,
mas nenhum caminho leva do experimento
ao nascimento de uma teoria.”

Albert Einstein

Resumo

LUZ, CM. **Perfil diferencial de transcritos de células do *cumulus oophorus* de mulheres inférteis com e sem endometriose submetidas à estimulação ovariana.** Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Os mecanismos da infertilidade relacionada à endometriose ainda não foram esclarecidos, embora diversos estudos proponham um efeito deletério desta doença sobre a qualidade oocitária (QO). No entanto, a análise de oócitos em pacientes com endometriose não é rotineiramente exequível, uma vez que os oócitos humanos raramente são doados para pesquisa e sua aplicação em técnicas invasivas impede sua utilização em procedimentos de reprodução assistida. Neste contexto, as evidências sugerem que as células cumulus (CC) podem ser utilizadas como biomarcadores indiretos capazes de prever a QO. Desta forma, através de um estudo inédito, objetivamos determinar o perfil diferencial de transcritos em CC de mulheres inférteis, com e sem endometriose avançada, submetidas à estimulação ovariana controlada para injeção intracitoplasmática de espermatozoides. Para tanto, realizamos um estudo caso-controle, que analisou via sequenciamento de nova geração de RNA (RNA-Seq), 3 grupos (controle, endometriose III/IV sem endometrioma e endometriose III/IV com endometrioma), com 3 *pools* de 3 pacientes cada. Dentre os principais genes desregulados identificados nas comparações entre os grupos com endometriose avançada e mulheres sem a doença foram evidenciados transcritos com expressão alterada envolvidos na via de fosforilação oxidativa, genes relacionados aos processos da acetilação e conjugação de ubiquitina, além de genes associados a via de biossíntese do colesterol e do estradiol. Esses resultados demonstram que as CC de mulheres inférteis com endometriose avançada apresentam alterações moleculares possivelmente relacionadas ao desenvolvimento folicular e oocitário. Através do enriquecimento dos principais genes desregulados, nossos dados indicam as potenciais vias alteradas nesse processo que podem interferir na aquisição da competência gamética e por sua vez, mediar o comprometimento da fertilidade dessas pacientes.

Palavras-chave: Endometriose; Endometrioma; Infertilidade feminina; Células cumulus; RNA-Seq; Perfil diferencial de transcritos.

Abstract

LUZ, CM. **Differential transcript profile of *cumulus oophorus* cells of infertile women with and without endometriosis who underwent ovarian stimulation.** Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, 2016.

The endometriosis related infertility mechanisms still remain to be elucidated, although several studies propose a deleterious effect of this disease on oocyte quality. However, the oocyte analysis in patients with endometriosis is not routinely feasible, since human oocytes are rarely donated to researches and their application in invasive techniques precludes their use in reproduction procedures. In this context, evidences suggest that cumulus cells (CC) could be used as indirect biomarkers capable of predicting oocyte quality. Thus, through an unprecedented study, we aimed to determine the differential transcripts profile in CC of infertile women with and without advanced endometriosis and its different stages, undergoing controlled ovarian stimulation for intracytoplasmic sperm injection. Therefore, we performed a case-control study, which analyzed by RNA next generation sequencing (RNA-Seq), 3 groups (control, endometriosis III/IV without endometrioma and endometriosis III/IV with endometrioma), with 3 pools of 3 patients each. The comparison of top deregulated genes among groups of advanced endometriosis and control patients show us altered genes associated with oxidative pathways, acetylation and ubiquitination process, aside from genes related to cholesterol and estradiol regulation. These data elucidated that CC of infertile woman with advanced endometriosis carried essential molecular alteration linked with follicular and gametic development. Through enrichment of the top deregulated genes, we can point out the potential pathways altered in this process toward oocyte commitment and infertility in these patients.

Key words: Endometriosis; Endometrioma; Female infertility; Cumulus cells; RNA-Seq; Differential transcripts profile.

Lista de figuras

Figura 1 – Interação bidirecional entre o oócito e as células do cumulus.....	20
Figura 2 – Preparo das bibliotecas para realização do RNA-Seq.....	34
Figura 3 – Fluxograma do estudo.....	40
Figura 4 – Eletroferogramas demonstrando a avaliação de integridade do RNA das amostras (<i>pools</i>) sequenciadas.....	42
Figura 5 – Gráficos representativos da qualidade média de leitura por base em cada grupo.....	43
Figura 6 – Gráfico PCA, distribuição das amostras conforme sua expressão gênica global.....	44
Figura 7 – <i>Heatmap</i> dos 30 genes com maior diferença de expressão na comparação grupo controle e grupo endometriose III/IV sem endometrioma.....	46
Figura 8 – <i>Heatmap</i> dos 30 genes com maior diferença de expressão na comparação grupo controle e grupo endometriose III/IV com endometrioma.....	48
Figura 9 - Diagrama de <i>Venn</i> representando a interseção dos 56 genes provenientes das duas comparações: grupo controle e endometriose III/IV sem endometrioma e grupo controle e endometriose III/IV com endometrioma	50
Figura 10 – Genes desregulados relacionados a processos ou componentes mitocondriais.....	54

Lista de tabelas

Tabela 1 – Testes de concentração e integridade de RNA total.....	31
Tabela 2 – Caracterização das amostras do estudo.....	41
Tabela 3 – Dados das bibliotecas sequenciadas.....	43
Tabela 4 – Os 30 genes com maior diferença de expressão em células do cumulus de mulheres inférteis com endometriose III/IV sem endometrioma comparadas aos controles.....	47
Tabela 5 – Os 30 genes com maior diferença de expressão em células do cumulus de mulheres inférteis com endometriose III/IV com endometrioma comparadas aos controles.....	49
Tabela 6 – Análise de enriquecimento das vias metabólicas dos genes com maior diferença de expressão da comparação entre os grupos controle e endometriose III/IV sem endometrioma.....	52
Tabela 7 – Análise de enriquecimento das vias metabólicas dos genes com maior diferença de expressão da comparação entre os grupos controle e endometriose III/IV com endometrioma.....	53
Tabela anexo 1 - Quantificação e análise de integridade do RNA total das células do cumulus.....	77

Lista de siglas

ASRM – Sociedade americana de medicina reprodutiva
ATP – Adenosina trifosfato
C – Controle
CC – Células do cumulus
cDNA – DNA complementar
CFA – Contagem de folículos antrais
CO₂ – Dióxido de carbono
COC – Complexo oócito cumulus
CSCM – *Continuous single culture medium*
DAVID – *Database for annotation, visualization and integrated discovery*
DNA – Ácido desoxirribonucleico
EOC – Estimulação ovariana controlada
ESHRE – *Special Interest Group for Endometriosis and Endometrium*
FIV – Fertilização *in vitro*
FMRP – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FSH – Hormônio folículo estimulante
GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofina
GO – *Gene Ontology*
hCG – Gonadotrofina coriônica humana
HCRP – Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto
HIV – Vírus da imuno deficiência humana
HTF – Fluido humano tubário
ICSI – Injeção intracitoplasmática de espermatozoides
I/II – Endometriose mínima e leve
III/IV - Com – Endometriose III/IV com endometrioma
III/IV - Sem – Endometriose III/IV sem endometrioma
III/IV – Endometriose avançada
IMC – Índice de massa corporal
IGF – Fator de crescimento semelhante a insulina
KEGG – *Kyoto encyclopedia of genes and genomes*

Kg – Quilogramas

Kg/m² – Quilogramas por metro quadrado

LH – Hormônio luteinizante

mRNA – RNA mensageiro

N – Número

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

NADP – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

ng – Nanograma

PC2 – *Principal component 2*

PCA – *Principal component analysis*

PE – *Paired-end*

QO – Qualidade oocitária

PC1 – *Principal component 1*

qPCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real

RIN – *RNA integrity number*

RNA – Ácido ribonucleico

RNA-Seq – Sequenciamento de nova geração de RNA mensageiro

SAS – *Statistical analysis system*

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

TRA – Técnicas de reprodução assistida

UI – Unidades internacionais

USP – Universidade de São Paulo

USTV – Ultrassonografia transvaginal

VLPS – Videolaparoscopia

°C – Graus célsius

μl – Microlitro

μm – Micrômetro

Sumário

1. Introdução	16
1.1 Endometriose	17
1.2 Endometriose e infertilidade.....	18
1.3 Células do cumulus e qualidade oocitária	20
1.4 Expressão gênica global em células do cumulus.....	22
2. Objetivos.....	24
3. Casuística e métodos.....	26
3.1 Desenho do estudo e considerações éticas	27
3.2 Pacientes	27
3.3 Protocolos de estimulação ovariana controlada e suplementação da fase lútea	28
3.4 Coleta e armazenamento das amostras	29
3.5 Extração e avaliação do RNA.....	30
3.5.1 Testes para extração do RNA	30
3.5.2 Extração e análise do RNA.....	31
3.6 Preparo das bibliotecas	32
3.7 Sequenciamento dos transcritos.....	34
3.8 Análise de bioinformática.....	35
3.9 Variáveis	36
3.10 Tamanho do estudo.....	36
3.11 Análise estatística	37
4. Resultados.....	38
4.1 Fluxograma do estudo	39
4.2 Caracterização dos grupos	41
4.3 Análise de qualidade do sequenciamento	41
4.4 Análise de expressão gênica global	44
4.5 Análise de expressão gênica diferencial.....	45
4.5.1. Comparação entre os grupos controle e endometriose III/IV sem endometrioma	45
4.5.2. Comparação entre os grupos controle e endometriose III/IV com endometrioma.....	48
4.5.3. Interseção dos genes das comparações	50
4.5.4. Comparação entre os grupos endometriose III/IV com e sem endometrioma	51
4.6 Análise de enriquecimento dos transcritos diferencialmente expressos.....	51
4.6.1. Comparação entre os grupos controle e endometriose III/IV sem endometrioma	51
4.6.2. Comparação entre os grupos controle e endometriose III/IV com endometrioma.....	52
5. Discussão.....	55
6. Conclusões	63
Referências bibliográficas.....	65
Anexos.....	76
Anexo 1.....	77

1. Introdução

1.1 Endometriose

A endometriose é um distúrbio ginecológico crônico, inflamatório e estrogênio dependente (Eskenazi e Warner, 1997). Caracteriza-se pela presença de tecido semelhante ao endométrio (glândulas e/ou estroma) fora da cavidade uterina, principalmente no peritônio pélvico, ovários e septo reto-vaginal. Pode apresentar quadro clínico bastante diversificado, variando desde o assintomático até o caracterizado pela presença de dor pélvica crônica, dismenorreia, dispareunia, sangramento uterino anormal e infertilidade (Giudice e Kao, 2004; Bulun, 2009). Um levantamento multicêntrico realizado em 10 países, apontou que mulheres com endometriose perderam 38% de sua capacidade de trabalho, representando um grande impacto socioeconômico, além da drástica redução da qualidade de vida (Nnoaham *et al.*, 2011), por esses motivos a endometriose tem sido considerada um problema atual de saúde pública (Signorile e Baldi, 2010).

Dados recentes da literatura apontam uma prevalência da endometriose em 6% a 10% das mulheres em idade fértil (Burney e Giudice, 2012). A dificuldade em definir a real estimativa da endometriose na população geral é determinada pela presença de variáveis como o acesso ao sistema de saúde, diferenças culturais e de atitude frente aos sintomas, refletindo indiretamente nos aspectos socioculturais associados à doença (Vigano *et al.*, 2004).

A etiopatogenia da endometriose é ainda desconhecida, de modo geral existem hipóteses propondo que os implantes se originam do endométrio uterino e outras que os implantes surgem de tecidos extrauterinos (Burney e Giudice, 2012). A teoria da menstruação retrógrada de Sampson é a mais aceita pela comunidade científica. Segundo essa teoria as células endometriais descamadas são transportadas até a cavidade peritoneal através da menstruação retrógrada e as células viáveis implantam-se e crescem (Sampson, 1927). Embora a menstruação retrógrada explique o deslocamento físico dos fragmentos endometriais, são necessárias medidas adicionais para o desenvolvimento de implantes endometrióticos, como: escape do sistema de remoção imunológico, fixação no epitélio peritoneal, invasão do epitélio, estabelecimento de neovascularização local e contínuo crescimento e sobrevivência. Esses fatores adicionais podem explicar a diferença entre a prevalência de 90% da menstruação retrógrada e a taxa de apenas 10% do desenvolvimento da doença (Burney e Giudice, 2012).

O diagnóstico definitivo da endometriose é cirúrgico, sendo a videolaparoscopia diagnóstica o padrão-ouro para a detecção da doença. Esse método possibilita a visualização da cavidade peritoneal e o estudo anatomopatológico da lesão (Kodaman, 2015; Nothnick e Alali, 2016) o que permite a classificação do estadio da doença de acordo com a Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (ASRM). A endometriose é classificada em 4 estadios de acordo com suas características morfológicas, leva-se em consideração a dimensão e profundidade dos implantes endometrióticos e a presença, extensão e tipo de aderências anexiais. O estadio I ou mínima é caracterizado por focos endometrióticos isolados e ausência de aderências significativas. Lesões ectópicas superficiais, com menos de 5 cm e ausência de aderências significativas são características do estadio II ou endometriose leve, não havendo alterações anatômicas da pelve. A endometriose moderada ou III é caracterizada por múltiplos implantes endometrióticos, com aderências peritubárias e periovarianas evidentes. Já a presença de múltiplos implantes superficiais e profundos, incluindo endometriomas ovarianos, aderências densas e firmes caracterizam o estadio IV ou grave (Asrm, 1997).

Associados com uma maior severidade e considerados indício de atividade da endometriose, endometriomas ovarianos são uma característica comum da doença presentes em 17 a 44% das pacientes (Busacca e Vignali, 2009). O cisto endometriótico contém um fluido repleto de enzimas proteolíticas, espécies reativas de oxigênio e moléculas inflamatórias em níveis bastante elevados que podem influenciar o microambiente ovariano (Vercellini *et al.*, 2009; Vercellini *et al.*, 2011; Sanchez *et al.*, 2014).

1.2 Endometriose e infertilidade

A relação causal entre endometriose e infertilidade ainda não foi totalmente estabelecida, contudo esta associação está fundamentada na alta prevalência da endometriose em populações de mulheres inférteis, 25 a 40%, em comparação à populações férteis, 5 a 10% (D'hooghe *et al.*, 2003). Além disso, 30 a 50% das portadoras de endometriose têm dificuldade em ter filhos (Holoch e Lessey, 2010; Asrm, 2012).

Estadios mais avançados da endometriose podem estar associados à infertilidade pela presença de aderências e distorção na anatomia pélvica, impedindo, assim, a liberação oocitária pelo ovário, a captação deste oócito pela trompa uterina ou a interação entre os

gametas. Contudo, pacientes sem alterações na anatomia também possuem piores resultados no desenvolvimento oocitário, embriogênese e implantação embrionária (Vercellini *et al.*, 2009; Asrm, 2012).

Novas abordagens terapêuticas ao problema da infertilidade relacionada a esta afecção têm surgido, destacando-se a aplicação das técnicas de reprodução assistida (TRA) de alta complexidade. A introdução da fertilização *in vitro* (FIV) no tratamento da infertilidade secundária à endometriose tornou-se uma importante ferramenta para o estudo dos potenciais efeitos da endometriose em alguns estágios específicos do processo reprodutivo, incluindo a foliculogênese, a fertilização, o desenvolvimento embrionário e a implantação (Asrm, 2012; Kodaman, 2015) .

A ocorrência de menores taxas de implantação e gestação em portadoras de endometriose já são relatadas há algum tempo (Hughes *et al.*, 1993). Estes resultados podem ser decorrentes do comprometimento da qualidade oocitária e consequentemente embrionária e de defeitos na interação entre o endométrio e o embrião (Barnhart *et al.*, 2002; Al-Fadhli *et al.*, 2006). As alterações no endométrio eutópico de pacientes com endometriose poderiam explicar os distúrbios na interação entre o embrião e o endométrio, gerando anomalias no processo de implantação (Garcia-Velasco e Arici, 1999). Contudo, em programas de ovodoação de mulheres saudáveis para pacientes com endometriose, as taxas de implantação foram semelhantes entre os grupos controle e endometriose (Simon *et al.*, 1994; Sung *et al.*, 1997), sugerindo que alterações oocitárias podem originar embriões de pior qualidade com menores chances de implantação, sendo esse um fator importante na etiopatogênese da infertilidade relacionada a endometriose (Brizek *et al.*, 1995; Pellicer *et al.*, 1995; Garrido *et al.*, 2000).

Sabemos que embriões de boa qualidade com habilidade para implantar e desenvolver-se adequadamente têm origem de oócitos de boa qualidade, que, por sua vez, são provenientes de folículos com um adequado meio ambiente, condicionados tanto pelo conteúdo do fluido folicular como pela influência das células da granulosa e do cumulus (Canipari, 2000; Gilchrist, 2011). A qualidade oocitária é resultado de um complexo e sincronizado processo, desde a fase de folículo primordial até a fase de folículo pré-ovulatório (Fritz e Speroff, 2012).

1.3 Células do cumulus e qualidade oocitária

O *cumulus oophorus* (*cumulus*: montículo e *oophorus*: ovo portador) é um grupo de células da granulosa estreitamente ligadas, que envolvem o oócito no folículo ovariano antral (Russell *et al.*, 2016). Além de serem importantes na fertilização, atraindo os espermatozoides e promovendo sua capacitação e penetração, estas células contribuem diretamente para o processo de maturação citoplasmática oocitária (Tanghe *et al.*, 2002) através de uma rede de *gap junctions*, ou junções comunicantes, entre as próprias células do cumulus (CC) e entre essas e o oócito (Albertini D. F., 2003; Combelles *et al.*, 2004; Thomas e Vanderhyden, 2006; Hutt e Albertini, 2007).

Essa comunicação é bidirecional e envolve a transferência de nutrientes e a sinalização entre dois tipos de células muito diferentes, sendo o oócito o condutor e regulador desta relação (Asrm, 2012; Russell *et al.*, 2016). As transmissões entre as células são dinâmicas ocorrendo desde o crescimento folicular até depois do sinal ovulatório (Huang e Wells, 2010). Os avanços na temática evidenciaram alguns mecanismos estabelecidos nesta interação entre o oócito e as CC, sendo os principais a transferência bidirecional de íons e pequenas moléculas que basicamente regulam o processo de maturação do oócito (Figura 1), além da regulação meiótica e das próprias junções celulares através de nucleotídeos cíclicos e de fatores secretados pelo oócito que regulam a função das CC (Russell *et al.*, 2016).

Figura 1 – Interação bidirecional entre o oócito e as células do cumulus (CC). Representação do oócito e da zona pelúcida com as células do cumulus envolvendo-o, as setas representam os diferentes meios de comunicação (Sutton *et al.*, 2003).

Visto que as CC desempenham um papel crucial na aquisição da competência oocitária e estão intimamente ligadas ao oócito, alguns estudos sugerem que a análise da expressão gênica destas células possa ser utilizada como preditor indireto da qualidade oocitária e dos resultados de procedimentos de reprodução assistida (Assou, Anahory, Pantesco, Carroul, *et al.*, 2006; Hamamah *et al.*, 2006; Hamel *et al.*, 2008; Haouzi e Hamamah, 2009).

A avaliação da expressão gênica em CC de mulheres com infertilidade relacionada à endometriose ainda é pouco explorada. Nosso grupo foi pioneiro nesta temática, demonstrando valores de expressão do gene *SOD1*, significativamente maiores em CC de pacientes inférteis com endometriose pélvica nos estádios avançados (III/IV), quando comparadas a pacientes inférteis sem endometriose e com endometriose pélvica em estádios iniciais (I/II). Estes resultados sugerem que o aumento da expressão do *SOD1* em CC de pacientes inférteis com endometriose avançada pode refletir uma tentativa de prevenção ao dano oxidativo oocitário desencadeado pela doença (Donabela *et al.*, 2015). Além disso, evidenciamos ainda a redução da expressão do gene *CYP19A1* em CC de mulheres inférteis com endometriose submetidas à estimulação ovariana controlada (EOC) para injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI). Essa alteração na expressão do *CYP19A1* também pode estar relacionada ao comprometimento gamético (Barcelos *et al.*, 2013).

Todavia, o estudo de genes individuais em CC restringe a exploração de vias metabólicas potencialmente desreguladas, cuja investigação é imprescindível no entendimento dos mecanismos etiopatogênicos da infertilidade relacionada à endometriose, mais especificamente, à piora da qualidade oocitária. Neste contexto, o uso de novas tecnologias de alto desempenho possibilitam uma abordagem integrada, avaliando mudanças globais no perfil de expressão gênica, uma abordagem fundamental para elucidação de importantes questões moleculares, dentre elas, o complexo processo de aquisição da competência oocitária (Allegra *et al.*, 2014).

1.4 Expressão gênica global em células do cumulus

O advento da genômica e o sequenciamento completo do genoma humano, bem como a análise computacional, ou bioinformática, estimulou os pesquisadores a desvendar também o transcriptoma completo, em lugar de um gene de cada vez. Este avanço abriu caminho para uma tarefa ainda mais árdua, explicar as redes altamente complexas de regulação e expressão dos genes (Wang *et al.*, 2009).

A expressão gênica consiste na avaliação da variabilidade da composição e abundância dos níveis de RNA mensageiro de um determinado tecido ou conjunto de células. Também conhecida como transcriptômica, essa tecnologia é utilizada para descrever e comparar perfis de expressão gênica entre diferentes grupos de estudo, propondo um novo conceito de painéis de biomarcadores (Haouzi *et al.*, 2012).

A análise em larga escala da expressão gênica em CC de mulheres com infertilidade associada à endometriose está ainda nos primeiros passos. A realização dessas metodologias enfrenta alguns obstáculos como a obtenção das CC, exclusivamente por meio de TRA de alta complexidade, e principalmente a ínfima quantidade de RNA disponível nestas células. Allegra e colaboradores (2014) analisaram o perfil de expressão gênica em CC de mulheres com endometriose severa utilizando a técnica de microarray realizada com apenas um *pool* de amostras por grupo, controle e endometriose. Essa avaliação evidenciou genes desregulados e potencialmente associados a doença e a baixa taxa de fertilização de pacientes com endometriose, sendo até o presente o único estudo de análise em larga escala na temática (Allegra *et al.*, 2014).

Dentre as estratégias para investigação do perfil global de expressão gênica destaca-se a tecnologia de sequenciamento de nova geração, rotineiramente aplicada a genomas, epigenomas e transcriptomas (Oshlack *et al.*, 2010). O sequenciamento de RNA (RNA-Seq) realiza a leitura de todos os RNAs mensageiros (mRNA) de uma amostra, possibilitando traçar um perfil e quantificar os transcritos do transcriptoma completo (Wang *et al.*, 2009; Oshlack *et al.*, 2010). Esta metodologia proporciona grandes vantagens, como informações precisas sobre os níveis absolutos de transcrição, variantes transcritas, regiões atualmente desconhecidas (Oshlack *et al.*, 2010), quantificação ilimitada, acurácia superior na quantificação dos níveis de expressão, alta reprodutibilidade, baixo ruído e a necessidade de u

volume menor de amostra (Wang *et al.*, 2009). Por sua sensibilidade praticamente ilimitada, o RNA-Seq é ideal para a análise de transcriptomas complexos, como o humano, e permite a detecção de transcritos raros em tecidos inexplorados com as CC.

O emprego do RNA-Seq na análise do perfil diferencial de expressão gênica em CC de pacientes inférteis com e sem endometriose será uma realização inédita, capaz de esclarecer vias metabólicas e mecanismos moleculares desregulados, relacionados com o papel da endometriose na infertilidade e seu impacto na aquisição da competência oocitária. A partir dessa compreensão, será possível elencar potenciais biomarcadores de qualidade gamética, tanto na predição do sucesso gestacional em ciclos de reprodução assistida, como favorecendo a identificação de novos alvos terapêuticos para o tratamento da infertilidade associada à endometriose, com destaque ao grande interesse na melhora da fertilidade natural destas mulheres, que, em sua maioria, não têm acesso a serviços de reprodução assistida.

2. Objetivos

Comparar o perfil de transcritos, por meio de sequenciamento de nova geração, das células do cumulus de mulheres inférteis com endometriose III/IV com e sem endometrioma e pacientes controle, sem endometriose, submetidas à estimulação ovariana controlada para injeção intracitoplasmática de espermatozoides.

Realizar uma análise de enriquecimento dos principais genes diferencialmente expressos em células do cumulus de mulheres inférteis com endometriose III/IV com e sem endometrioma e controles, sem endometriose, submetidas à estimulação ovariana controlada para injeção intracitoplasmática de espermatozoides, por meio da ferramenta DAVID (*Database for annotation, visualization and integrated discovery*) e dos bancos de dados KEGG (*Kyoto encyclopedia of genes and genomes*) e NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), considerando seus processos biológicos e vias de atuação relacionadas à aquisição da competência oocitária.

3. Casuística e métodos

3.1 Desenho do estudo e considerações éticas

Realizou-se um estudo prospectivo caso-controle, com recrutamento de pacientes e coleta de amostras de CC de agosto de 2014 a fevereiro de 2016 e realização das metodologias propostas e análise dos resultados de fevereiro de 2016 a outubro de 2016 junto ao Setor de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da FMRP - USP, de acordo com o processo N° 15113/2012. As pacientes que preencheram os critérios de elegibilidade e manifestaram o desejo de participar do projeto assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido previamente à inclusão no estudo.

3.2 Pacientes

Para os grupos endometriose, foram selecionadas pacientes com endometriose diagnosticada e classificada por videolaparoscopia (segundo critérios da ASRM, 1997), independente da presença de fator masculino ou tubário associado. As pacientes endometriose foram ainda divididas de acordo com os estadios da doença, sendo elegíveis apenas mulheres com endometriose III/IV sem endometrioma e endometriose III/IV com endometrioma ovariano durante o ciclo, identificado através da ultrassonografia transvaginal (USTV). O grupo controle por sua vez, foi composto por pacientes com infertilidade associada a fator masculino e/ou tubário submetidas à videolaparoscopia diagnóstica como procedimento de rotina para investigação da infertilidade conjugal, sendo excluída a presença de endometriose. Foram considerados critérios de inclusão para ambos os grupos: idade ≤ 39 anos, IMC < 34 kg/m², ausência de doença cardiovascular, dislipidemias, endocrinopatias não tratadas como hipotireoidismo, diabetes mellitus, lúpus eritematoso sistêmico e outras doenças reumatológicas, infecção pelo vírus HIV ou qualquer infecção ativa, ausência de tabagismo ou uso abusivo de álcool, além da ausência de procedimentos invasivos para obtenção de espermatozoides. As pacientes tiveram seus prontuários avaliados de acordo com os critérios de elegibilidade e as consideradas elegíveis foram entrevistadas, aquelas que concordaram em participar da pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

3.3 Protocolos de estimulação ovariana controlada e suplementação da fase lútea

Ao concordarem em participar do estudo, as pacientes foram acompanhadas durante todo o ciclo de EOC. Com o objetivo de sincronizar e programar o início da EOC, foi utilizada a programação da menstruação, que consiste em se administrar anticoncepcionais orais combinados diariamente, iniciados no período menstrual do ciclo precedente até cinco dias antes da data prevista para o início da estimulação ovariana, suspendendo sua administração de tal forma que o início do sangramento menstrual coincida com a realização da USTV basal. Desta forma, pode-se observar o padrão endometrial e afastar a presença de cistos ovarianos que poderiam interferir na resposta à administração das gonadotrofinas exógenas e na monitorização ultrassonográfica do crescimento folicular. Após a interrupção do uso de contraceptivos orais foi iniciada a EOC sendo que três protocolos distintos foram aplicados como descrito a seguir.

No protocolo com agonista longo, o uso de agonistas do GnRH (acetato de leuprolide de 0,5 mg/dia) foi iniciado durante a fase lútea média do ciclo anterior, seguido de gonadotrofinas (150-300 UI/dia) durante os primeiros dias de EOC. Em sequência, a dose diária de gonadotrofinas foi ajustada de acordo com o crescimento folicular.

No protocolo antagonista flexível, gonadotrofinas (150-300 UI/dia) foram administradas nos primeiros seis dias de EOC, com a dose diária ajustada de acordo com o crescimento folicular. Antagonistas de GnRH (ganirelix ou cetorelix 0,25 mg/dia) foram iniciados no dia em que a média do diâmetro do maior folículo foi ≥ 14 mm.

O protocolo de estimulação mínima (citrato de clomifeno mais gonadotrofinas e antagonista de GnRH) foi oferecido a algumas mulheres com contagem de folículos antrais (CFA) baixa ($CFA \leq 6$) (Martins *et al.*, 2014). O citrato de clomifeno (100 mg/dia) foi administrado durante os primeiros cinco dias de EOC e as gonadotrofinas (150 UI/dia) foram administradas nos dias dois e quatro, e diariamente a partir do dia seis. O antagonista de GnRH (ganirelix ou cetorelix 0,25 mg/dia) foi iniciado no dia em que o diâmetro médio do maior folículo foi ≥ 14 mm.

O hCG recombinante (250 µg, Ovidrel®, Serono, Brasil) ou hCG urinário (10,000 IU, Choriomon®, Meizler, Brasil) foi administrado quando pelo menos um folículo com 18 mm

de diâmetro médio estava presente. Os oócitos foram captados de 34 a 36 horas após a administração do hCG recombinante, e a fase lútea foi mantida pela administração da progesterona micronizada (600 mg/dia).

3.4 Coleta e armazenamento das amostras

Para captação dos oócitos, as pacientes foram submetidas a anestesia geral venosa com propofol (Diprivan®, Zeneca-Astra, Brasil), além de fentanil (Fentanil®, Janssen-Cilag, Brasil). Os folículos foram aspirados por via endovaginal, guiada por um transdutor de ultrassom transvaginal. Uma agulha padrão de lúmen único (Wallace, Smiths Medical, Mexico) foi usada, com pressão aspirativa artificial constante de 100 mmHg obtidos com uma bomba de sucção controlada eletronicamente (Craft® Bomba de Sucção, Rocket Medical, Inglaterra). Os folículos foram aspirados e reunidos em tubos de ensaio contendo 1 ml de meio de cultura fluido humano tubário (HTF) - HEPES (Irvine Scientific) previamente aquecido a 37° C.

Após uma lavagem cuidadosa, para a remoção de sangue e debris, todos os complexos oócitos-cumulus (COC) foram identificados e colocados juntos em placas de cultura de células (One Well Dish , Corning, USA) contendo o meio de cultura HTF-HEPES, suplementado com 10% de soro substituto sintético (SSS, Irvine Scientific) até o final da captação. Em seguida, os COC foram transferidos para placas de cultura de células (One well dish, Corning, USA) contendo o meio de cultura CSCM (Continuous single culture medium, Irvine Scientific) suplementado com 10% de soro substituto sintético (SSS, Irvine Scientific) e as placas foram incubadas a 37° C em 5% de CO₂ e 95% de umidade durante 2 horas. Posteriormente, as CC foram removidas mecanicamente em HTF-SSS por microdissecção com a utilização de duas agulhas de insulina, e em seguida foram desnudados pela exposição dos COC à hialuronidase (90101, 80 UI/ml, Irvine Scientific), durante 30 segundos. Após a desnudação mecânica, o restante das CC foram removidas mecanicamente por aspirações sucessivas em pipetas de desnudação de 170 e 140 µm (Flexipet, Cook Medical, Bloomington, USA).

Posteriormente as CC que foram removidas mecanicamente com auxílio de agulhas de insulina foram transferidas para um criotubo contendo 100µl de criopreservador (*RNAlater*® -

Life Technologies) e após 24 horas à 4° C, para penetração do *RNAlater*® nas células, as amostras foram armazenadas em nitrogênio líquido à -196° C até a fase de extração do RNA total. Todos os procedimentos foram realizados sob condições RNase free.

3.5 Extração e avaliação do RNA

3.5.1 Testes para extração do RNA

Uma vez que, as CC são um material bastante raro e que possuem uma ínfima concentração de RNA, foram realizados testes de extração de RNA total, com a finalidade de otimizar e preservar a quantidade e a integridade do material a ser analisado. Para encontrar o melhor método de extração de RNA total que nos permita obter a maior concentração de RNA integro, foram realizados testes com diferentes metodologias: *mirVana Paris Kit* (Life Technologies); *Trizol* (Life Technologies); *AllPrep DNA/RNA/miRNA Kit* (Qiagen); *Pure Link Mini Kit* (Qiagen) e *RNeasy Mini Kit* (Qiagen).

Através dos testes verificamos que a quantidade de COC coletados não está relacionada à concentração do RNA total obtido, independente do método de extração. Realizamos também a análise da integridade do RNA total extraído. Essa técnica foi desenvolvida no Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática do Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto da FMRP, USP, utilizando o aparelho *2100 Bioanalyzer*™ (Agilent® Technologies). Em todos os testes observamos a irregularidade na quantidade de RNA total presente nas amostras de CC, sendo que em nenhuma das metodologias conseguimos obter, em todas as amostras, a quantidade suficiente de RNA total (~ 400 ng) para a realização do sequenciamento de RNA (RNA-Seq). Desta forma, após a avaliação dos resultados de todos os testes, optamos pela utilização do método que se mostrou mais eficaz, o *AllPrep DNA/RNA/miRNA Kit* (Qiagen), obtendo a maior pontuação de RIN em todas as amostras analisadas (Tabela 1).

Tabela 1 - Testes de concentração e integridade de RNA total

ID da amostra	Nº de COC	Método de extração	Concentração de RNA total (ng)	RIN
1	3	<i>mirVana Paris Kit</i>	497,8	6,3
2	4	<i>mirVana Paris Kit</i>	1.018,4	8,1
3	2	<i>mirVana Paris Kit</i>	528,2	N/A
4	2	<i>mirVana Paris Kit</i>	478,8	N/A
5	4	<i>Trizol</i>	302,4	N/A
6	2	<i>Trizol</i>	2942,4	7,8
7	2	<i>Trizol</i>	556,8	6,8
8	15	<i>AllPrep DNA/RNA/miRNA Kit</i>	1.620,0	7,1
9	8	<i>AllPrep DNA/RNA/miRNA Kit</i>	1.320,0	8,8
10	3	<i>AllPrep DNA/RNA/miRNA Kit</i>	340,0	8,9
11	2	<i>Pure Link Mini Kit</i>	205,2	4,2
12	1	<i>Pure Link Mini Kit</i>	73,8	N/A
13	3	<i>Pure Link Mini Kit</i>	50,4	N/A
14	4	<i>RNeasy Mini Kit</i>	862,4	4,6
15	6	<i>RNeasy Mini Kit</i>	191,4	2,8
16	8	<i>RNeasy Mini Kit</i>	952,0	7,3

NOTA: Testes realizados para verificação da concentração de RNA total obtido por amostra de CC com diferentes métodos de extração. COC: Complexo oócito-cumulus. RIN: *RNA integrity number*. N/A: Não analisável.

3.5.2 Extração e análise do RNA

O RNA total das amostras de CC foi extraído utilizando-se o *AllPrep DNA/RNA/miRNA Kit* (Qiagen) e tratado com DNase (*DNA free® Kit* - Ambion) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram diluídas em 20µl da solução recomendada e a integridade do RNA total extraído foi avaliada no aparelho 2100 *Bioanalyzer™* (Agilent® Technologies) segundo instruções do fabricante, com base no eletroferograma e no RIN. No eletroferograma de cada amostra, a quantidade dos rRNAs 28S, 18S e 5S é representada por picos. Os valores de RIN de cada amostra são calculados através de um algoritmo que leva em consideração a razão 28S:18S dos RNAs extraídos. Consideraram-se adequadas as amostras de RNA com $RIN \geq 7$.

As concentrações de RNA total foram determinadas por fluorimetria no *Qubit® 2.0 Fluorometer* (Invitrogen). Este método fluorimétrico permite uma quantificação mais acurada e é preferencialmente indicado para amostras submetidas a protocolos de sequenciamento de larga escala. Consideraram-se adequadas as amostras com concentração ≥ 120 ng totais de RNA total.

3.5.3 Agrupamento dos *pools*

Baseados nos testes de extração verificamos que as CC possuem uma concentração muito baixa de RNA total o que não permite a execução dos experimentos propostos quando as amostras são consideradas individualmente, aproximadamente 400ng totais. Com o objetivo de solucionarmos este problema e baseados na literatura optamos por gerar dentro de cada um dos 3 grupos de estudo *pools* de amostras (Assou, Anahory, Pantesco, Le Carrou, *et al.*, 2006; Hamel *et al.*, 2008; Van Montfoort *et al.*, 2008; Adriaenssens *et al.*, 2010). Estes *pools* foram formados por três pacientes, que apresentaram concentração de RNA total suficiente ($\geq 120\text{ng}$) para a metodologia do RNA-Seq (100ng) e suas respectivas avaliações ($\sim 20\text{ng}$).

Para o agrupamento dos *pools* foram levadas em consideração as seguintes características clínicas em ordem de importância: Idade da paciente; número de oócitos captados; índice de massa corpórea; protocolo de EOC e tempo após videolaparoscopia. As amostras nos *pools* foram agrupadas da forma mais heterogênea possível para que os *pools* ficassem homogêneos que entre si. Ou seja, as pacientes que compõem um agrupamento possuem características diferentes um das outras, no entanto, os pools quando comparados entre si tendem a ser semelhantes. Esta resolução foi escolhida, pois, para o RNA-Seq serão analisados os agrupamentos e não as amostras individualmente, deste modo, é importante que os *pools* analisados, sejam homogêneos dentro de cada um dos grupos de estudo. Com isso, almejamos que o perfil diferencial de expressão gênica, resultante do RNA-Seq, não sofra interferência da heterogeneidade das particularidades clínicas das pacientes, ressaltando assim as características investigadas pelo estudo e os prováveis alvos deste trabalho.

3.6 Preparo das bibliotecas

Previamente à construção das bibliotecas, a integridade do *pool* de pacientes foi novamente avaliada no aparelho 2100 BioanalyzerTM (Agilent® Technologies) segundo instruções do fabricante. Consideraram-se adequadas as amostras de RNA total com RIN $\geq 7,0$. As amostras íntegras foram quantificadas no Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen) para verificar se apresentavam, ao menos, 300µg de RNA total, quantidade mínima necessária para

preparo das bibliotecas.

Para o preparo das bibliotecas de RNA-Seq utilizou-se o kit *TruSeq® RNA Sample Preparation v2* (Illumina). Resumidamente, o RNA mensageiro (mRNA), caracterizado por conter sequências de poliadenina (poli A+) na porção 3', foi purificado a partir do RNA total, utilizando-se sequências complementares de timinas (poli T) ligadas a esferas magnéticas. Durante a segunda eluição, o RNA poli A+ isolado foi fragmentado. A síntese de cDNA foi realizada por meio de transcrição reversa, utilizando hexâmeros randômicos e a enzima *Superscript II* (Invitrogen, Carlsbad, CA), gerando, assim, a primeira fita de cDNA. Em seguida, a fita de mRNA foi removida e uma segunda fita de cDNA foi sintetizada. Para obtenção de fragmentos de pontas coesas, as extremidades do cDNA foram removidas utilizando-se o mix *End Repair* (Illumina), que contém uma 3'-5' exonuclease, capaz de remover as bases excedentes nas extremidades 3'. Depois disso, foi adicionada uma única base "A" (adenina) às extremidades 3' do cDNA, a fim de auxiliar a ligação dos adaptadores, que possuem uma base T (timina) nas suas extremidades 3'. A adição da base A também evita a formação de concatâmeros de cDNA. Múltiplos adaptadores foram, então, ligados às extremidades do cDNA, utilizando-se uma enzima ligase e tampões apropriados, contidos no kit *TruSeq*. Para enriquecer de forma seletiva os fragmentos de cDNA e amplificar a quantidade de DNA na biblioteca, foi feita uma qPCR com poucos ciclos de amplificação (a fim de evitar amplificação tendenciosa), utilizando primers complementares aos adaptadores (Figura 2).

Depois da amplificação, o tamanho dos fragmentos formados foi avaliado utilizando-se o equipamento *2100 Bioanalyzer™* (Agilent® Technologies), devendo ser de aproximadamente 260 pb. Também é muito importante a quantificação dos fragmentos formados na biblioteca e para isso recomenda-se uma quantificação absoluta para o PCR em tempo real, utilizando-se o kit comercial *KAPA SYBR FAST* (KAPA Biosystems), que contém uma curva-padrão e todos os demais reagentes. Com base nessa quantificação, as bibliotecas são diluídas e são utilizados 8pM para desnaturação e posterior agrupamento, ou geração de *clusters*, que consiste de 3 etapas: amplificação dos *clusters*, linearização, bloqueio e hibridação dos *primers*.

Figura 2 - Preparo das bibliotecas para realização do RNA-Seq. (1) O mRNA é selecionado através da cauda poli-A, fragmentado e ligado a *primers* randômicos. (2) A primeira fita de cDNA é sintetizada. (3) Segue-se à síntese da segunda fita de cDNA. (4) As extremidades das fitas de cDNA são reparadas para obtenção de fragmentos de pontas coesas. (5) Uma base adenina (A) é adicionada às extremidades 3' do cDNA. (6) Adaptadores são ligados às extremidades adeniladas e a biblioteca é amplificada (Palhares, 2014).

3.7 Sequenciamento dos transcritos

As bibliotecas foram agrupadas na *flow cell* (suporte sólido da reação) com os reagentes do *TruSeq Cluster Generation Kit v5*. Durante a geração dos clusters, cada fragmento de cDNA da biblioteca foi incorporado à superfície da *flow cell* coberta com oligonucleotídeos utilizados para amplificar o cDNA de forma isotérmica, dando origem aos *clusters*. Depois da amplificação dos *clusters*, foi feita a sua linearização, bloqueio e a hibridação de *primers*. A linearização foi realizada para retirada dos dois adaptadores e assegurando que a hibridação e o sequenciamento ocorressem somente em uma das fitas de cada *cluster*. O bloqueio corresponde a inutilização das hidroxilas presentes nas extremidades 3' dos *clusters* linearizados, para evitar a adição de substratos de fluoróforos a qualquer outro segmento que não fosse o *primer* de sequenciamento. A desnaturação garantiu a formação de *templates* de fita simples, que foram hibridados aos *primers* de sequenciamento.

O sequenciamento foi realizado em equipamento *Illumina Genome Analyzer IIx* (GAIIx), através da corrida *High Output, paired-end* da plataforma *Illumina HiSeq2500* (Illumina Inc.). Esta técnica baseia-se na terminação da síntese da cadeia de DNA após a detecção do sinal fluorescente. Por terminação entende-se a clivagem do nucleotídeo marcado já detectado que possibilita a adição do próximo nucleotídeo. Os eventos de incorporação e clivagem do nucleotídeo marcado e modificado ocorrem sucessivas vezes, permitindo, desta forma, a leitura base-a-base.

3.8 Análise de bioinformática

As análises computacionais foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática do Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto da FMRP - USP. Toda a análise foi realizada no sistema operacional *CentOS release 6.7*.

Os arquivos com as sequências nucleotídicas e a descrição de qualidade das bases gerados pela plataforma *Illumina HiSeq2500* (Illumina Inc.) foram analisados com o programa *FastQC v0.11.2* (Andrews, 2010) uma ferramenta de controle de qualidade para sequenciamentos de larga escala. A qualidade de cada *lane* da *flow cell* foi checada para cada amostra. Nucleotídeos da extremidade 3' com *phred-score* < 20, *reads* com tamanho < 25 e média de qualidade < 20 foram removidos com o programa *PRINSEQ v0.20.4*. Posteriormente o mapeamento e a quantificação dos fragmentos gerados (*reads*) foi realizada através do programa *STAR - Spliced Transcripts Alignment to a Reference* (Dobin *et al.*, 2013), utilizando o GRCh37.p7 como genoma de referência, e a *Release 85* do *Ensembl* como anotação gênica. Para esta análise os parâmetros utilizados foram “outFilterMultimapNmax 1 e alignIntronMin 20” que permitem a seleção das *reads* mapeadas com apenas um único *hit*. Após o mapeamento, o resultado com as informações finais do alinhamento das *reads* foram disponibilizadas em formato binário “bam” (Li *et al.*, 2009). A quantificação das *reads* presentes nos genes também foi realizada com a ferramenta *STAR*, como mencionado anteriormente, que realiza a quantificação de forma semelhante ao *HTSeq*, um programa de pré-processamento para a análise de expressão diferencial por meio da contagem de *reads* sobrepostas com genes ou transcritos, selecionando apenas as *reads*

com qualidade de mapeamento (Anders *et al.*, 2015).

A normalização e a expressão diferencial entre os grupos a partir das contagens brutas foi realizada no ambiente estatístico R (Team, 2008) utilizando o pacote do *Bioconductor* *DESeq2* (Love *et al.*, 2014). No mesmo ambiente, foi realizada a análise de componente principal (PCA) entre os grupos para checar o agrupamento das amostras conforme sua expressão global. Foram considerados genes diferencialmente expressos aqueles com valores de *p value* ajustado por FDR < 0,05. Os gráficos de *heatmap* foram gerados com a função *aheatmap* do pacote NMF a partir dos dados rlog transformados resultantes da função *rlog* do *DESeq2*.

3.9 Variáveis

O perfil diferencial de transcritos foi avaliado por sequenciamento de nova geração e a análise de enriquecimento dos genes com maior diferença de expressão, através da ferramenta DAVID, levou em consideração os processos biológicos e as vias de atuação correlacionados com o papel da endometriose na infertilidade e seu possível impacto na aquisição da competência oocitária.

3.10 Tamanho do estudo

Por tratar-se de um estudo inédito sem dados prévios passíveis de estimar médias e desvios-padrão e considerando os restritivos critérios de elegibilidade, a dificuldade esperada em obter amostras satisfatórias, o elevadíssimo custo do sequenciamento e o fato de estudos utilizando a mesma metodologia analisarem pequenas casuísticas (mínimo de 2 casos por grupo), propusemos um tamanho amostral que permite identificar ou descartar uma grande diferença entre os grupos (Cohen, 1988).

Como a quantidade de RNA total extraída das CC é muito baixa e não permite a execução do sequenciamento de nova geração quando as pacientes são consideradas individualmente, analisamos três *pools* de amostras dentro de cada grupo do estudo, sendo

que cada *pool* possui RNA de 3 pacientes. Além disso, foram armazenadas quantidades suficientes de cDNA de cada paciente para a validação individual, por PCR em tempo real, dos genes selecionados.

3.11 Análise estatística

A avaliação estatística referente a caracterização das amostras foi realizada utilizando o programa SAS, “Statistical Analysis System” (SAS Inc. versão 9.3). Para a análise de distribuições das características clínicas das pacientes (idade, número de oócitos captados, IMC e tempo de infertilidade), entre os grupos do estudo, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal Wallis ($p\text{ value} < 0,05$), os dados foram apresentados em mediana e intervalo interquartil.

4. Resultados

4.1 Fluxograma do estudo

No período de agosto de 2014 a fevereiro de 2016 foram analisados um total de 1683 prontuários de mulheres admitidas por infertilidade conjugal no Serviço de Reprodução Assistida do Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Desses 1683 prontuários, 1222 referiam-se a casais que seriam submetidos a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Do total de prontuários, 161 pacientes apresentaram os critérios de elegibilidade descritos no projeto. Das 161 mulheres, 110 iniciaram o ciclo de tratamento. Finalmente, as pacientes selecionadas foram convidadas a participar da pesquisa assinando o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), sendo que 9 mulheres não aceitaram participar do estudo.

As 101 pacientes elegíveis e que assinaram o TCLE foram submetidas a estimulação ovariana controlada EOC para ICSI. Destas 101 mulheres, 32 foram excluídas do estudo, sendo que 14 tiveram o ciclo cancelado por apresentarem má resposta ovariana, 1 devido a suspensão do tratamento por questões financeiras, 8 por não possuírem amostras de células do cumulus CC disponíveis para a pesquisa e 9 por não obterem oócitos captados no ciclo de estimulação ovariana.

Finalmente, foram coletadas amostras de 69 pacientes. Destas, 16 foram utilizadas para os testes de extração de RNA total, descritos na metodologia do estudo, com o objetivo de otimizar e preservar a qualidade e a quantidade do material a ser posteriormente analisado. As 53 amostras de CC foram submetidas a extração do RNA total e posterior quantificação e verificação de integridade, após estas avaliações obtivemos 38 amostras adequadas aos experimentos, sendo 11 pacientes do grupo controle, 14 do grupo endometriose III/IV sem endometrioma e 13 mulheres do grupo endometriose III/IV com endometrioma (anexo 1). Estas amostras foram analisadas levando em consideração suas principais características clínicas para formação dos *pools*. Sendo assim, foram formados 3 *pools* de 3 pacientes em cada um dos 3 grupos do estudo, totalizando 9 mulheres por grupo. O fluxograma do estudo está representado na figura 3.

Figura 3 – Fluxograma do estudo. Total de paciente recrutadas, elegíveis e incluídas no estudo, número das mulheres excluídas, das amostras coletadas, das utilizadas nos testes, das inadequadas para análise e das amostras armazenadas e disponíveis para a pesquisa. Divisão nos grupos Controle, Endometriose estádios III/IV sem endometrioma e Endometriose estádios III/IV com endometrioma.

4.2 Caracterização dos grupos

A comparação entre os grupos controle, endometriose III/IV sem endometrioma e endometriose III/IV com endometrioma não apresentaram diferenças estatisticamente significativas com relação à distribuição das características clínicas das pacientes, idade, número de oócitos captados, IMC e tempo de infertilidade (Tabela 2).

Tabela 2 – Caracterização das amostras de pacientes inférteis dos grupos do estudo.

Variável	Grupo	N	Mediana (IQ)	<i>p</i> - value
Idade	Controle	9	34 (33 - 37)	0,279
	III/IV - Com	9	33 (32 - 37)	
	III/IV - Sem	9	31 (30 - 34)	
Nº de oócitos captados	Controle	9	9 (4 - 11)	0,891
	III/IV - Com	9	9 (4 - 12)	
	III/IV - Sem	9	9 (7 - 11)	
IMC (Kg/m ²)	Controle	9	24,23 (22,95 - 27,83)	0,800
	III/IV - Com	9	23,80 (22,49 - 24,98)	
	III/IV - Sem	9	23,51 (21,49 - 24,98)	
Tempo de infertilidade (meses)	Controle	9	84 (48 - 96)	0,216
	III/IV - Com	9	59 (36 - 111)	
	III/IV - Sem	9	36 (30 - 53)	

NOTA: Dados expressos como mediana e intervalo interquartil (IQ), *p* - value referente ao teste não paramétrico de Kruskal Wallis (*p* - value < 0,05). IMC: Índice de massa corporal. Grupos: Controle, endometriose III/IV com endometrioma (III/IV - Com) e III/IV sem endometrioma (III/IV - Sem).

4.3 Análise de qualidade do sequenciamento

Todas as amostras (*pools*) que seguiram para a etapa do sequenciamento de RNA foram avaliadas quanto a integridade do RNA total dos *pool* no 2100 BioanalyzerTM (Agilent® Technologies), e apresentaram um RIN entre 8,4 e 10 (Figura 4) sendo assim consideradas adequadas para a técnica (RIN ≥ 7).

Figura 4 - Eletroferogramas demonstrando a avaliação de integridade do RNA das amostras (*pools*) sequenciadas. RIN= RNA *integrity number*. Amostras: Controle (C), Endometriose III/IV sem endometrioma (III/IV - Sem) e Endometriose III/IV com endometrioma (III/IV - Com).

As bibliotecas *paired-end* foram geradas dos 9 *pools* de RNA sendo 3 *pools* controle e 6 *pools* endometriose (3 endometriose III/IV sem endometrioma e 3 endometriose III/IV com endometrioma), e foram distribuídas em 2 *lanes*, originando cerca de 50 milhões de *reads* de 101pb (*forward* e *reverse*) para cada biblioteca (Tabela 3). Os transcritos obtidos tiveram sua qualidade analisada pela ferramenta *FastQC* (FASTQC, [s.d.]), que fornece uma análise de qualidade para cada biblioteca (Figura 5).

Tabela 3 - Dados das bibliotecas sequenciadas

<i>Lane</i>	ID da amostra	<i>Reads</i>	% Bases $\geq$ Q30
1	1 C	58.713.456	92,57
1	1 III/IV - Sem	65.587.888	92,30
1	1 III/IV - Com	80.178.150	92,18
1	2 C	86.943.014	92,26
2	2 III/IV - Sem	56.863.310	93,23
2	2 III/IV - Com	48.639.172	93,42
2	3 C	72.968.144	93,05
2	3 III/IV - Sem	67.742.876	93,29
2	3 III/IV - Com	71.241.880	93,48

NOTA: *Lane*: Distribuição dos *pools* nas 2 *lanes*, *Reads*: número de *reads* gerados para cada amostra, % Bases $\geq$ Q30: qualidade da leitura do RNA-Seq. Grupos: Controle (C), Endometriose III/IV sem endometrioma (III/IV - Sem) e Endometriose III/IV com endometrioma (III/IV - Com).

Figura 5 - Gráficos representativos da qualidade média de leitura por base em cada grupo. A cor de fundo dos gráficos representa o nível de qualidade da leitura das bases; verde: boa, laranja: razoável e vermelho: ruim. Grupos: Controle, Endometriose III/IV sem endometrioma (Endometriose III/IV - Sem) e Endometriose III/IV com endometrioma (Endometriose III/IV - Com)

Foram removidas da análise de mapeamento cerca de 1% de *reads singleton*, ou seja, que não possuíam a *read* pareada da biblioteca, além de 1% de múltiplos alinhamentos que foram mapeadas mais de uma vez, em diferentes posições, no genoma de referência. A uniformidade das *reads* mapeadas em todas as amostras foi considerada satisfatória.

4.4 Análise de expressão gênica global

O gráfico de análise de componente principal (PCA: *Principal component analysis*) apresenta a distribuição das amostras de acordo com sua expressão gênica global, ou seja, todos os genes identificados pelo sequenciamento, utilizando as semelhanças e diferenças do perfil gênico de cada *pool* para representar o agrupamento das amostras (Figura 6).

Figura 6 - Gráfico PCA, distribuição das amostras conforme sua expressão gênica global. Amostras dos grupos Controle (C), Endometriose III/IV sem endometrioma (III/IV - Sem) e Endometriose III/IV com endometrioma (III/IV - Com).

A reta estabelecida pelo PC1 (*Principal component 1*) divide o gráfico em dois quadrantes que representam a principal diferença entre os *pools*. Considerando que a análise de expressão gênica global representada pelo PCA avalia todos os genes identificados pelo sequenciamento, aproximadamente 25 milhões, a distribuição dos *pools* no gráfico evidencia uma diferença sutil nas amostras endometriose quando comparadas as controles.

A linha PC2 (*Principal component 2*) por sua vez, divide o gráfico em duas subdivisões, representando a segunda maior diferença entre as amostras. Essa separação do PC2 indica uma subdivisão do grupo controle, na qual duas amostras aparecem na parte superior do gráfico e uma no quadrante inferior. A mesma subdivisão ocorre no grupo endometriose III/IV sem endometrioma com duas amostras na parte inferior e uma no quadrante superior.

4.5 Análise de expressão gênica diferencial

As comparações por análise de bioinformática foram realizadas entre todos os grupos do estudo e foram considerados genes diferencialmente expressos aqueles com valores de $p < 0,05$. As comparações foram detalhadas a seguir.

Para visualizar o perfil dos genes identificados como diferencialmente expressos nestas comparações foram confeccionados agrupamentos hierárquicos dos genes, baseados nos níveis de expressão (*heatmap*), dos genes com maior diferença de expressão de acordo com o valor de p . O agrupamento refletiu o padrão de genes regulados positivamente ou negativamente.

4.5.1. Comparação entre os grupos controle e endometriose III/IV sem endometrioma

A comparação entre os grupos controle e endometriose III/IV sem endometrioma apresentou 66 genes diferencialmente expressos ($p < 0,05$). Os 30 genes com maior diferença de expressão desta comparação foram representados em um *heatmap* de acordo com seu agrupamento hierárquico (Figura 7). A tabela 4 identifica os 30 genes e seus respectivos status da expressão refletido pelo grupo endometriose III/IV sem endometrioma.

Figura 7 - *Heatmap* dos 30 genes com maior diferença de expressão na comparação grupo controle e grupo endometriose III/IV sem endometrioma, agrupados pelo nível de expressão. As colorações azuis e vermelhas indicam, respectivamente, o aumento e diminuição da expressão. Amostras dos grupos Controle (C) e Endometriose III/IV sem endometrioma (III/IV - Sem).

Tabela 4 – Os 30 genes com maior diferença de expressão em células do cumulus de mulheres inférteis com endometriose III/IV sem endometrioma comparadas aos controles.

Gene	Nome oficial do gene	<i>p value</i>	Status
<i>CYP11B1</i>	Cytochrome P450 family 1 subfamily B member 1	8,14E+04	Down
<i>TOB1</i>	Transducer of ERBB2, 1	0.00499348591835858	Down
<i>MBNL3</i>	Muscleblind like splicing regulator 3	0.0085756761938157	Down
<i>PUS7L</i>	Pseudouridylate synthase 7 like	0.0114377493627879	Down
<i>PDP1</i>	Pyruvate dehydrogenase phosphatase catalytic subunit 1	0.0159374033396463	Down
<i>SLC10A7</i>	Solute carrier family 10 member 7	0.0220422460309614	Down
<i>UQCRCQ</i>	Ubiquinol-cytochrome c reductase complex III Subunit VII	0.000152557732643079	Up
<i>WDR83OS</i>	WD repeat domain 83 opposite strand	0.000168136742577093	Up
<i>RAMP1</i>	Receptor activity modifying protein 1	0.00203355488078927	Up
<i>COX8A</i>	Cytochrome c oxidase subunit 8A	0.00332267185799696	Up
<i>ANAPC11</i>	Anaphase promoting complex subunit 11	0.00332267185799696	Up
<i>MT1E</i>	Metallothionein 1E	0.00499348591835858	Up
<i>TMEM256</i>	Transmembrane protein 256	0.00568559969109982	Up
<i>H2AFZ</i>	H2A histone family member Z	0.0119193763828222	Up
<i>SSR4</i>	Signal sequence receptor subunit 4	0.0123633113352655	Up
<i>NDUFS3</i>	NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit S3	0.0123633113352655	Up
<i>GAS5</i>	Growth arrest specific 5 (non-protein coding)	0.0125160433250437	Up
<i>NDUFB2</i>	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit B2	0.0125160433250437	Up
<i>ELOB</i>	Elongin B	0.0125160433250437	Up
<i>CHCHD2</i>	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 2	0.0159374033396463	Up
<i>MZT2A</i>	Mitotic spindle organizing protein 2A	0.0160851129142765	Up
<i>RBX1</i>	Ring-box 1	0.0161976331140603	Up
<i>ROMO1</i>	Reactive oxygen species modulator 1	0.0212724547694766	Up
<i>MZT2B</i>	Mitotic spindle organizing protein 2B	0.0220422460309614	Up
<i>SRA1</i>	Steroid receptor RNA activator 1	0.0220422460309614	Up
<i>EBP</i>	Emopamil binding protein (sterol isomerase)	0.0220422460309614	Up
<i>NAPRT</i>	Nicotinate phosphoribosyltransferase	0.0220422460309614	Up
<i>HINT2</i>	Histidine triad nucleotide binding protein 2	0.0220422460309614	Up
<i>TMEM141</i>	Transmembrane protein 141	0.0220422460309614	Up
<i>MVK</i>	Mevalonate kinase	0.0220422460309614	Up

NOTA: Status de expressão dos genes no grupo endometriose III/IV sem endometrioma com relação ao grupo controle (*p value* < 0,05).

4.5.2. Comparação entre os grupos controle e endometriose III/IV com endometrioma

A comparação entre os grupos controle e endometriose III/IV com endometrioma apresentou 461 genes diferencialmente expressos ($p < 0,05$). Os 30 genes com maior diferença de expressão desta comparação foram representados em um *heatmap* com agrupamento hierárquico (Figura 8). A tabela 5 identifica estes genes de acordo com o status da expressão refletido pelo grupo endometriose III/IV com endometrioma.

Figura 8 - *Heatmap* dos 30 genes com maior diferença de expressão na comparação grupo controle e grupo endometriose III/IV com endometrioma, agrupados pelo nível de expressão. As colorações azuis e vermelhas indicam, respectivamente, o aumento e diminuição da expressão. Amostras dos grupos Controle (C) e Endometriose III/IV com endometrioma (III/IV - Com).

Tabela 5 - Os 30 genes com maior diferença de expressão em células do cumulus de mulheres inférteis com endometriose III/IV com endometrioma comparadas as controles.

Gene	Nome oficial do gene	<i>p value</i>	Status
<i>CYP11B1</i>	Cytochrome P450 family 1 subfamily B member 1	8,14E+04	Down
<i>NEAT1</i>	Nuclear paraspeckle assembly transcript 1 (non-protein coding)	0.00499348591835858	Down
<i>GAS5</i>	Growth arrest specific 5 (non-protein coding)	0.0085756761938157	Down
<i>SSR4</i>	Signal sequence receptor subunit 4	0.0114377493627879	Down
<i>RBX1</i>	Ring-box 1	0.0159374033396463	Down
<i>EBP</i>	Emopamil binding protein (sterol isomerase)	0.0220422460309614	Up
<i>RAMP1</i>	Receptor activity modifying protein 1	0.000152557732643079	Up
<i>UQCRCQ</i>	Ubiquinol-cytochrome c reductase complex III Subunit VII	0.000168136742577093	Up
<i>CXCL5</i>	C-X-C motif chemokine ligand 5	0.00203355488078927	Up
<i>SERPINB2</i>	Serpin family B member 2	0.00332267185799696	Up
<i>WDR83OS</i>	WD repeat domain 83 opposite strand	0.00332267185799696	Up
<i>FABP4</i>	Fatty acid binding protein 4	0.00499348591835858	Up
<i>AQP9</i>	Aquaporin 9	0.00568559969109982	Up
<i>TMEM141</i>	Transmembrane protein 141	0.0119193763828222	Up
<i>COX8A</i>	Cytochrome c oxidase subunit 8A	0.0123633113352655	Up
<i>ECH1</i>	Enoyl-coa hydratase 1	0.0123633113352655	Up
<i>HSPE1</i>	Heat shock protein family E (Hsp10) member 1	0.0125160433250437	Up
<i>ROMO1</i>	Reactive oxygen species modulator 1	0.0125160433250437	Up
<i>TMEM256</i>	Transmembrane protein 256	0.0125160433250437	Up
<i>MMAB</i>	Methylmalonic aciduria (cobalamin deficiency) cblb type	0.0159374033396463	Up
<i>SLC43A2</i>	Solute carrier family 43 member 2	0.0160851129142765	Up
<i>H2AFZ</i>	H2A histone family member Z	0.0161976331140603	Up
<i>RPL10P6</i>	Ribosomal protein L10 pseudogene 6	0.0212724547694766	Up
<i>NDUFB2</i>	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit B2	0.0220422460309614	Up
<i>ATP5E</i>	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, epsilon subunit	0.0220422460309614	Up
<i>RNF181</i>	Ring finger protein 181	0.0220422460309614	Up
<i>FLNC</i>	Filamin C	0.0220422460309614	Up
<i>COX6A1</i>	Cytochrome c oxidase subunit 6A1	0.0220422460309614	Up
<i>ANAPC11</i>	Anaphase promoting complex subunit 11	0.0220422460309614	Up
<i>AC026271.5</i>	AC026271.5 Pseudogene	0.0220422460309614	Up

NOTA: Status de expressão dos genes no grupo endometriose III/IV sem endometrioma com relação ao grupo controle (*p value* < 0,05).

4.5.3. Interseção dos genes das comparações

Com o objetivo de verificar quais genes estão presentes em ambas comparações, controle e endometriose III/IV sem endometrioma e controle e endometriose III/IV com endometrioma, foi realizada uma análise de interseção utilizando a ferramenta online “*Bioinformatics & Evolutionary Genomics*”. A investigação evidenciou 56 genes diferencialmente expressos comuns às duas comparações. Utilizando a mesma forma de análise, realizamos a interseção destes 56 genes com os 30 genes com maior diferença de expressão de ambos os grupos endometriose III/IV com e sem endometrioma (Figura 9). O Diagrama de *Venn* revela 15 genes comuns as duas comparações.

Figura 9 - Diagrama de *Venn* representando a interseção dos 56 genes provenientes das duas comparações: grupo controle e endometriose III/IV sem endometrioma (III/IV – Sem) e grupo controle e endometriose III/IV com endometrioma (III/IV – Com). No quadro da figura podemos visualizar os 56 genes representados por seus símbolos oficiais e destacados em vermelho os 15 genes comuns a ambas comparações.

4.5.4. Comparação entre os grupos endometriose III/IV com e sem endometrioma

A comparação entre os grupos endometriose III/IV sem endometrioma e endometriose III/IV com endometrioma, não apresentou genes diferencialmente expressos ($p < 0,05$).

4.6 *Análise de enriquecimento dos transcritos diferencialmente expressos*

A análise de enriquecimento referente aos genes com maior diferença de expressão das comparações entre os grupos controle, endometriose III/IV sem endometrioma e III/IV com endometrioma, foi realizada com a ferramenta eletrônica DAVID (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*). Destacamos desta avaliação os processos biológicos possivelmente relacionados com o papel da endometriose na aquisição da competência oocitária em mulheres inférteis. Os genes foram analisados do ponto de vista funcional usando o banco de dados GENE do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e as principais vias metabólicas foram evidenciadas através da base de dados KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*).

4.6.1. Comparação entre os grupos controle e endometriose III/IV sem endometrioma

Dos 30 genes mais significativos desta comparação, 29 foram identificados pela ferramenta de enriquecimento, DAVID, como genes já descritos nos bancos de dados, apenas o pseudogene *AC026271.5* não foi incluído na análise. Destes 29 genes, 13 foram associados a diferentes vias metabólicas potencialmente ligadas à aquisição da competência oocitária em mulheres inférteis com endometriose, tema foco deste estudo (Tabela 6).

Tabela 6 - Análise de enriquecimento das vias metabólicas dos genes com maior diferença de expressão da comparação entre os grupos controle e endometriose III/IV sem endometrioma.

Via metabólica	Genes associados (%)	Genes identificados	Status
Fosforilação oxidativa	13,8%	<i>NDUFS3</i>	<i>Up</i>
		<i>NDUFB2</i>	<i>Up</i>
		<i>COX8A</i>	<i>Up</i>
		<i>UQCRQ</i>	<i>Up</i>
Biossíntese de esteroides	10,3%	<i>CYP11B1</i>	<i>Down</i>
		<i>EBP</i>	<i>Up</i>
		<i>MVK</i>	<i>Up</i>
Acetilação	27,6%	<i>H2AFZ</i>	<i>Up</i>
		<i>WDR83OS</i>	<i>Up</i>
		<i>EBP</i>	<i>Up</i>
		<i>HINT2</i>	<i>Up</i>
		<i>MT1E</i>	<i>Up</i>
		<i>RBX1</i>	<i>Up</i>
		<i>TMEM256</i>	<i>Up</i>
		<i>UQCRQ</i>	<i>Up</i>

NOTA: Genes associados a vias metabólicas potencialmente relacionadas a aquisição da competência oocitária em mulheres inférteis com endometriose. Status de expressão dos genes no grupo endometriose III/IV sem endometrioma com relação ao grupo controle.

4.6.2. Comparação entre os grupos controle e endometriose III/IV com endometrioma

Assim como na comparação anterior, dos 30 genes mais significativos, 29 foram identificados pela ferramenta online de enriquecimento, apenas o pseudogene *AC026271.5* não foi incluído na análise. Dos 29 genes, 18 foram associados a diferentes vias metabólicas possivelmente relacionadas a aquisição da competência oocitária em mulheres inférteis com endometriose (Tabela 7).

Tabela 7 - Análise de enriquecimento das vias metabólicas dos genes com maior diferença de expressão da comparação entre os grupos controle e endometriose III/IV com endometrioma.

Via metabólica	Genes associados (%)	Genes identificados	Status
Fosforilação oxidativa	17,2%	<i>NDUFB2</i>	<i>Up</i>
		<i>COX6A1</i>	<i>Up</i>
		<i>COX8A</i>	<i>Up</i>
		<i>ATP5E</i>	<i>Up</i>
		<i>UQCRCQ</i>	<i>Up</i>
Biossíntese de esteroides	6,8%	<i>CYP11B1</i>	<i>Down</i>
		<i>EBP</i>	<i>Up</i>
Acetilação	37,9%	<i>H2AFZ</i>	<i>Up</i>
		<i>WDR83OS</i>	<i>Up</i>
		<i>EBP</i>	<i>Up</i>
		<i>MMBA</i>	<i>Up</i>
		<i>FABP4</i>	<i>Up</i>
		<i>RBX1</i>	<i>Up</i>
		<i>TMEM256</i>	<i>Up</i>
		<i>UQCRCQ</i>	<i>Up</i>
		<i>ECH1</i>	<i>Up</i>
		<i>HSPE1</i>	<i>Up</i>
Conjugação de ubiquitina	17,2%	<i>ATP5E</i>	<i>Up</i>
		<i>ANAPC11</i>	<i>Up</i>
		<i>H2AFZ</i>	<i>Up</i>
		<i>UQCRCQ</i>	<i>Up</i>
		<i>FLNC</i>	<i>Up</i>
		<i>RNF181</i>	<i>Up</i>

NOTA: Genes associados a vias metabólicas potencialmente relacionadas a aquisição da competência oocitária em mulheres inférteis com endometriose. Status de expressão dos genes no grupo endometriose III/IV com endometrioma com relação ao grupo controle.

Além da associação a vias metabólicas, a análise de enriquecimento dos principais genes diferencialmente expressos em células do cumulus de mulheres inférteis com endometriose III/IV com e sem endometrioma, somados, evidenciaram 22 genes desregulados envolvidos em processos e componentes mitocondriais, conforme demonstrado na figura 10.

Figura 10 - Genes desregulados relacionados a processos ou componentes mitocondriais em células do cumulus de mulheres inférteis com endometriose III/IV com e sem endometrioma. As setas indicam o status de expressão do gene desregulado, *up*: ↑ e *down*: ↓.

5. Discussão

A associação endometriose e infertilidade baseia-se na alta prevalência desta doença em populações de mulheres inférteis (D'hooghe *et al.*, 2003; Holoch e Lessey, 2010). Apesar de os mecanismos de causa e efeito dessa relação ainda carecerem de esclarecimentos, diversos estudos propõem um impacto deletério da endometriose sobre a qualidade oocitária (Brizek *et al.*, 1995; Saito *et al.*, 2002; Allegra *et al.*, 2014; Donabela *et al.*, 2015). A aquisição da competência oocitária é condicionada pelo conteúdo do fluido folicular e a influência das células da granulosa e do cumulus (Canipari, 2000; Thomas *et al.*, 2005; Thomas e Vanderhyden, 2006; Gilchrist, 2011). Estes fatores somados estabelecem um microambiente ovariano para o desenvolvimento do oócito, que pode ser danificado por processos como alterações imunológicas, elevados níveis de espécies reativas de oxigênio e foliculogênese anormal (Pellicer *et al.*, 1998; Allegra *et al.*, 2014).

Dentro deste microambiente, a comunicação cruzada entre o oócito e as CC desempenha um papel crucial na aquisição da competência gamética (Canipari, 2000). A interação entre essas células inclui a troca de nutrientes, fatores de crescimento, transporte de ions, sinais parácrinos e moléculas regulatórias (Motta *et al.*, 1994; Assidi *et al.*, 2008; Allegra *et al.*, 2014). Isto posto, estudos propõem que a análise da expressão gênica em CC pode ser utilizada como um potencial biomarcador de qualidade oocitária (Hamamah *et al.*, 2006; Hamel *et al.*, 2008; Haouzi e Hamamah, 2009; Haouzi *et al.*, 2012; Donabela *et al.*, 2015).

Apesar de a literatura demonstrar a expressão alterada de genes em CC envolvidos em múltiplos mecanismos passíveis de comprometer o desenvolvimento gamético em mulheres com endometriose, até o presente nenhum trabalho com a ampla cobertura e sensibilidade de um sequenciamento de nova geração foi realizado. Desta forma, propusemos um estudo inédito da análise global do transcriptoma, por RNA-Seq, das CC de mulheres inférteis com endometriose III/IV com e sem endometrioma e pacientes sem a doença, com o objetivo de evidenciar processos biológicos e vias de atuação correlacionados com o papel da endometriose na infertilidade e seu possível impacto na aquisição da competência oocitária.

Ao compararmos o transcriptoma das CC entre os diferentes grupos do estudo observamos que as pacientes com endometriose III/IV com e sem endometrioma apresentaram, respectivamente, 461 e 66 genes com expressão alterada quando comparadas as controles ($p < 0,05$). Através da análise de enriquecimento dos 30 genes com maior diferença de expressão destas comparações verificamos que em ambos os grupos, endometriose III/IV

com e sem endometrioma, foram identificadas vias metabólicas alteradas como a fosforilação oxidativa com 6 genes hiperexpressos, a acetilação que apresentou 12 transcritos com expressão aumentada, a conjugação de ubiquitina, com 5 genes *up* regulados e a biossíntese de esteroides com 3 transcritos alterados, sendo 2 hiperexpressos e 1 *down* regulado.

A via da fosforilação oxidativa, tem por função produzir energia, na forma de ATP, através da oxidação de nutrientes e liberação de elétrons. Esse mecanismo molecular de formação de ATP ocorre através dos complexos da cadeia de respiração mitocondrial localizada na membrana interna da mitocôndria (Weber e Senior, 2003; Dumesic *et al.*, 2015).

Os complexos I e II da fosforilação oxidativa promovem a redução de moléculas de ubiquinona e a expulsão de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana. Dentre os transcritos relacionados a esta via o *NDUFB2* e o *NDUFS3* fazem parte do complexo I e ambos possuem níveis de expressão aumentada em CC de pacientes com endometriose avançada quando comparadas às mulheres sem a doença. O complexo III é responsável pela transferência de elétrons entre o ubiquinol, produzido nos complexos I e II, e o citocromo C. Para cada molécula de ubiquinol reduzida, dois citocromos C são oxidados e quatro prótons são bombeados para o espaço intermembrana da mitocôndria. A enzima citocromo C oxidase ou complexo IV, é responsável pelo transporte dos elétrons do citocromo C para o oxigênio molecular que é reduzido a água. Essa redução produz um gradiente de prótons através da membrana mitocondrial (Weber e Senior, 2003; Dumesic *et al.*, 2015). Nesta etapa foram identificados os genes *UQCRCQ*, *COX8A* e *COX6A1* hiperexpressos em mulheres com endometriose III/IV em comparação às controles.

Por fim, a matriz da mitocôndria apresenta um déficit na concentração de íons H^+ devido o bombeamento de prótons para o espaço intermembrana. Em busca da homeostase a enzima ATP sintase regula a reentrada dos prótons na matriz produzindo por consequência moléculas de ATP. Identificamos neste mecanismo o gene *ATP5E*, mais expresso em pacientes com endometriose avançada quando comparadas às mulheres sem a doença. Esse aumento da expressão dos genes relacionados a cadeia de fosforilação oxidativa em CC de mulheres com endometriose III/IV sugere o crescimento da produção de energia em forma de ATP e a alteração no metabolismo da mitocôndria.

Através da rede de comunicação ou junções celulares o oócito absorve pequenos metabólitos, como substratos energéticos, nucleotídeos e aminoácidos, provenientes em sua

maioria das CC (Buccione *et al.*, 1990; Sugiura *et al.*, 2005). Peddinti e colaboradores (2010) verificaram que proteínas pertencentes ao processo de fosforilação oxidativa encontravam-se mais expressas nas CC do que em oócitos bovinos em estágio de vesícula germinativa, sugerindo que estas células são as principais fontes de ATP do oócito (Peddinti *et al.*, 2010). Um estudo realizado em camundongos demonstrou que os oócitos envoltos pelas CC durante a maturação *in vitro* possuíam maiores níveis de ATP do que os oócitos desnudados, ademais, quando empregados inibidores de junções celulares a diferença nos níveis de ATP foi abolida, resultado que corrobora a contribuição de ATP das CC para do gameta (Dalton *et al.*, 2014).

No entanto, a fosforilação oxidativa também produz grande quantidade de elétrons que ao transporem a membrana interna mitocondrial tornam-se espécies reativas de oxigênio (Dumesic *et al.*, 2015). O aumento destes radicais livres pode afetar a qualidade e o desenvolvimento embrionário (Das *et al.*, 2006; Yalçinkaya *et al.*, 2013). Estudos recentes evidenciaram que pacientes com endometriose apresentam níveis elevados de espécies reativas de oxigênio e a diminuição da capacidade antioxidante total no fluido folicular (Prieto *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2013). Corroborando estes resultados, em um trabalho realizado pelo nosso grupo, onde oócitos bovinos foram cultivados em fluido folicular de pacientes com endometriose, a suplementação de antioxidantes durante a maturação *in vitro* preveniu efeitos deletérios sobre o fuso meiótico e a distribuição cromossômica (Giorgi *et al.*, 2016).

Baseados nestes achados, sugerimos que a hiperexpressão dos genes presentes na via de fosforilação oxidativa resulta no aumento da produção de ATP e por consequência maiores níveis de espécies reativas de oxigênio, tornando o microambiente do complexo cumulus oócito pró-oxidativo. Esse processo de estresse oxidativo nas CC pode ser prejudicial ao desenvolvimento e a aquisição da competência oocitária.

Entre os processos metabólicos alterados nas CC de pacientes com endometriose III/IV com e sem endometrioma também encontramos a via de acetilação. Nesta via identificamos 12 genes com expressão aumentada, *H2AFZ*, *WDR83OS*, *EBP*, *HINT2*, *MT1E*, *RBX1*, *TMEM256*, *UQCRQ*, *FABP4*, *ECH1*, *HSPE1* e *ATP5E*. A acetilação é um processo pós-traducional de proteínas, histonas e tubulinas, e está associado a mecanismos epigenéticos através de modificações químicas no DNA e na cromatina (Tamburini e Tyler, 2005; Howell *et al.*, 2009).

Na endometriose, as alterações epigenéticas podem ocorrer em estágios críticos para o estabelecimento da gestação, tais como a maturação do oócito (Nafee *et al.*, 2008), o desenvolvimento embrionário, a pré-implantação (Latham e Schultz, 2001) e a implantação (Paulson *et al.*, 1990; Stilley *et al.*, 2012). Baseados em estudos anteriores, Stilley e colaboradores (2012), sugerem que o fluido folicular de pacientes com endometriose, que apresenta o aumento de citocinas inflamatórias e espécies reativas de oxigênio (Hill *et al.*, 1988), pode desencadear mutações epigenéticas no genoma do embrião, essas potenciais modificações ocorreriam, por exemplo, através de enzimas como as histonas deacetilases (Stilley *et al.*, 2012). Pesquisas que investigaram o envelhecimento do oócito revelaram diversas alterações epigenéticas, incluindo o aumento do nível de acetilação das histonas (Huang *et al.*, 2007; Liang *et al.*, 2008; Manosalva e Gonzalez, 2010). As histonas acetiladas possuem uma afinidade reduzida pelo DNA e umas pelas outras tornando a conformação da cromatina aberta e transcritionalmente ativa (Ausio *et al.*, 2003) sugerindo um aumento na transcrição. Dessa forma, acreditamos que os níveis de transcrição elevados estimulariam uma maior formação de proteínas, as quais poderiam ser mal formadas, indesejadas ou danificadas. Essa hipótese pode ser reforçada por outra via alterada identificada no estudo, a via da conjugação de ubiquitina.

A análise de enriquecimento dos 30 genes com maior diferença de expressão da comparação entre os grupos endometriose III/IV com endometrioma e mulheres sem a doença evidenciou 5 genes alterados envolvidos na via da conjugação de ubiquitina, sendo que *ANAPC11*, *UQCRQ*, *H2AFZ*, *RNF181* e *FLNC* estão hiperexpressos. Além disso, ao analisarmos a totalidade dos genes diferencialmente expressos entre mulheres com endometriose III/IV sem endometrioma e controles encontramos 4 destes transcritos *up* regulados envolvidos na via de conjugação da ubiquitina (*ANAPC11*, *UQCRQ*, *H2AFZ* e *RNF181*), visualizados na análise de interseção, sugerindo que esta via também está alterada nas CC destas pacientes.

A ubiquitina é uma proteína com função de regulação proteica, ela marca proteínas para que sejam degradadas por um complexo denominado proteossoma. A maior atuação da ubiquitina-proteossoma se dá em proteínas mutantes ou danificadas que não foram aprovadas pelo restrito controle de qualidade da célula (Hershko *et al.*, 2000; Bhogaraju e Dikic, 2016). Além disso, a ubiquitilação é um processo proteolítico dependente de ATP (Etlinger e

Goldberg, 1977), o que justificaria o aumento da produção de ATP pela via de fosforilação oxidativa previamente descrita.

Outra via metabólica identificada pela análise de enriquecimento foi a biossíntese de esteroides ou esteroidogênese um processo crucial para o crescimento folicular e desenvolvimento oocitário (Dumesic *et al.*, 2015). Dois dos genes identificados nesta via estão relacionados à síntese do colesterol, *MVK* e *EBP*, ambos hiperexpressos em CC de pacientes com endometriose. Sendo incapaz de produzir o aporte suficiente de colesterol de que necessita, o oócito delega esta tarefa às CC (Su *et al.*, 2008). Estudos realizados com camundongos evidenciaram que os oócitos também não possuem receptores para colesterol, sugerindo que estes são incapazes de captar esse esteroide do ambiente (Sato *et al.*, 2003). Desta forma, as CC são responsáveis por sintetizar e prover grande parte do colesterol necessário para o oócito e essa interação é regulada pelo gameta através de fatores parácrinos (Li *et al.*, 1998; Miettinen *et al.*, 2001; Su *et al.*, 2008).

Os transcritos *MVK* e *EBP* já foram identificados em camundongos tendo sua expressão aumentada em CC quando comparadas ao oócito, ratificando o importante papel das CC no aporte de colesterol para o gameta (Su *et al.*, 2008). Acreditamos que o aumento da expressão destes genes em células do CC de mulheres com endometriose III/IV com e sem endometrioma quando comparadas a controles pode estar relacionada ao dano oocitário desencadeado pela doença.

Sabemos que mulheres com endometriose possuem maiores níveis de espécies reativas de oxigênio e redução da capacidade antioxidante no fluido folicular, favorecendo um ambiente de estresse oxidativo (Prieto *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2013) que pode comprometer a qualidade e o desenvolvimento do gameta (Das *et al.*, 2006; Yalçinkaya *et al.*, 2013). Seli e colaboradores (2014), sugerem que as CC são responsáveis pela regulação da oxirredução no oócito fornecendo NADP (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato), colesterol e transportando L-alanina do fluido folicular para o oócito (Seli *et al.*, 2014). Logo, supomos que o oócito, afetado pelo aumento das espécies reativas de oxigênio presentes no fluido folicular de mulheres com endometriose avançada, possa induzir o aumento da produção de colesterol das CC na tentativa de que estas o auxiliem a regular seu estado oxidativo através de reações redox.

O gene *CYP11B1*, também relacionado à esteroidogênese ovariana, participa da via do

estradiol e encontra-se menos expresso nas CC de pacientes com endometriose III/IV com e sem endometrioma quando comparadas às mulheres sem a doença. Brevemente, a androstenediona proveniente das células da teca é transformada em estrona nas células da granulosa (muras e do cumulus), esta é convertida em 17 β -estradiol ou simplesmente estradiol (E₂) (Tesarik e Mendoza, 1997; Dumesic *et al.*, 2015). Outra forma de síntese do E₂ é através da conversão da testosterona igualmente oriunda das células da teca (Anderiesz e Trounson, 1995). O E₂ exerce funções fundamentais no desenvolvimento oocitário, visto que oócitos imaturos possuem mecanismos de maturação citoplasmática dependentes desse hormônio (Tesarik e Mendoza, 1995; Dumesic *et al.*, 2015).

Altos níveis de E₂ e andrógenos intrafoliculares estão associados a altas taxas de gestação em FIV (Andersen, 1993), enquanto baixos níveis de E₂ estão relacionados ao comprometimento do desenvolvimento embrionário *in vitro* (Rabinovici *et al.*, 1989). O transcrito *CYP11B* atua na hidroxilação do 17 β -estradiol no metabólito 4 OH-estradiol (Hakkola *et al.*, 1997; Zhu e Conney, 1998). A expressão do *CYP11B* é regulada por meio do estradiol, ligando-se ao seu receptor e alterações no nível de expressão deste gene podem alterar a intensidade da ação do estrogênio (Zheng *et al.*, 2000; Tsuchiya *et al.*, 2005). Isto posto, sugerimos que a baixa expressão do transcrito *CYP11B* em CC de mulheres com endometriose avançada seja decorrente de uma redução dos níveis de E₂, o que comprometeria a esteroidogênese e a qualidade oocitária.

Até o presente, não existem estudos avaliando as possíveis alterações nestes mecanismos em CC do cumulus de pacientes com endometriose restando-nos hipóteses a respeito. Contudo, estes achados abrem grandes perspectivas para estudos futuros que visem esclarecer os processos biológicos e mecanismos moleculares relacionados a estas vias me CC de pacientes inférteis com endometriose.

Na comparação entre pacientes com endometriose III/IV, diferenciadas pela identificação ou não de endometrioma no ciclo de estimulação, não houve diferenças significativas quanto ao transcriptoma. Esse resultado indica a similaridade da expressão gênica das CC dessas pacientes, visualizada também na análise de interseção dos grupos, sugerindo uma semelhança molecular do impacto da endometriose avançada nestas células. Estudos que investigaram a influência do endometrioma na função ovariana e na qualidade oocitária verificaram que a presença deste acometimento não interfere na competência gamética (Filippi *et al.*, 2014), nem na qualidade embrionária e nas taxas de gravidez pós FIV

(Suzuki *et al.*, 2005). Se correlacionarmos estes achados podemos sugerir que as CC assim como a qualidade oocitária não sofrem influência pela presença do endometrioma ovariano. Contudo, essa análise comparativa por sequenciamento é inédita e tais hipóteses precisam ser confirmadas em pesquisas futuras com metodologias apropriadas.

Nosso estudo trouxe contribuições inéditas no entendimento dos processos biológicos e vias de atuação associados ao papel da endometriose na infertilidade e seu impacto na aquisição da competência oocitária. Porém, encontramos algumas limitações, sendo a principal delas a pequena casuística avaliada em decorrência dos restritivos critérios de elegibilidade e das mudanças adotadas pela comunidade médica com relação a videolaparoscopia. Tida como padrão ouro para a investigação da endometriose a videolaparoscopia durante muito tempo foi empregada como medida usual no diagnóstico e tratamento da doença, assim como para a investigação da infertilidade conjugal (Podgaec, 2014). No entanto, novas recomendações das sociedades especializadas na temática, como o ESHRE (*Special Interest Group for Endometriosis and Endometrium*), sugerem que sintomas de dor, sugestivos de endometriose, podem ser tratados sem um diagnóstico definitivo. Associado a isto, a videolaparoscopia deixou de ser recomendada, em tal grau, como ferramenta de investigação da infertilidade, de modo que expressiva parcela das mulheres inférteis com indicação de tratamentos de reprodução assistida não foi submetida a este procedimento. A partir dessa constatação, somando-se nossos rigorosos parâmetros de elegibilidade, o número de pacientes da pesquisa foi drasticamente afetado. Além disso, a baixa concentração e qualidade do RNA total das amostras de CC tornou-se outro obstáculo no desenvolvimento deste trabalho. Aproximadamente 28% (N= 15) das amostras coletadas foram excluídas da análise por não apresentarem RNA com integridade e concentração adequadas para o experimento de RNA-Seq (RIN ≥ 7). Tais dificuldades prejudicaram diretamente a casuística do estudo limitando a generalização dos resultados aqui obtidos.

6. Conclusões

A comparação entre os grupos endometriose III/IV sem endometrioma e endometriose III/IV com endometrioma não evidenciou genes diferencialmente expressos, demonstrando que o perfil dos transcritos das CC destas pacientes tem grande similaridade, sugerindo que estas células podem não sofrer influências da presença do endometrioma ovariano. Porém, as comparações entre o grupo controle e os grupos endometriose III/IV sem endometrioma e endometriose III/IV com endometrioma, apresentaram respectivamente 66 e 461 genes diferencialmente expressos em CC de mulheres inférteis com endometriose avançada.

A análise de enriquecimento referente aos genes com maior diferença de expressão nas pacientes com endometriose III/IV com e sem endometrioma comparadas a pacientes sem a doença, demonstrou processos biológicos alterados e possivelmente relacionados com a aquisição da competência oocitária, o que poderia estar envolvido na etiopatogenia da infertilidade associada à endometriose. As vias metabólicas evidenciadas foram a fosforilação oxidativa, a acetilação, a conjugação de ubiquitina e a biossíntese de esteroides, envolvidas, respectivamente na produção de ATP e, por consequência, de espécies reativas de oxigênio, no aumento dos níveis de transcrição, na degradação de proteínas indesejadas ou danificadas e na via do estradiol, processos essenciais ao desenvolvimento oocitário.

Nossos achados são inéditos e sugerem, com base nos processos biológicos e vias de atuação desregulados em CC de mulheres inférteis com endometriose avançada, um possível mecanismo envolvido na infertilidade associada à doença. Ademais, reforçam a importância de estudos futuros que investiguem essas e outras alterações nas CC associadas ao processo de aquisição da competência gamética em mulheres inférteis com endometriose.

Referências bibliográficas

ADRIAENSSENS, T. et al. Cumulus cell gene expression is associated with oocyte developmental quality and influenced by patient and treatment characteristics. **Hum Reprod**, v. 25, n. 5, p. 1259-70, May 2010. ISSN 0268-1161.

AL-FADHLLI, R. et al. Effects of different stages of endometriosis on the outcome of in vitro fertilization. **Obstet Gynaecol Can** v. 28, p. 4, 2006.

ALBERTINI D. F., B. S. T. Oocyte-somatic cell communication. **Reproduction**, v. 61, p. 6, 2003.

ALLEGRA, A. et al. The gene expression profile of cumulus cells reveals altered pathways in patients with endometriosis. **J Assist Reprod Genet**, v. 31, n. 10, p. 1277-85, Oct 2014. ISSN 1058-0468.

ANDERIESZ, C.; TROUNSON, A. O. The effect of testosterone on the maturation and developmental capacity of murine oocytes in vitro. **Hum Reprod**, v. 10, n. 9, p. 2377-81, Sep 1995. ISSN 0268-1161 (Print) 0268-1161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8530669> >.

ANDERS, S.; PYL, P. T.; HUBER, W. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. **Bioinformatics**, v. 31, n. 2, p. 166-9, Jan 15 2015. ISSN 1367-4811 (Electronic) 1367-4803 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25260700> >.

ANDERSEN, C. Y. Characteristics of human follicular fluid associated with successful conception after in vitro fertilization. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 77, n. 5, p. 1227-34, Nov 1993. ISSN 0021-972X (Print) 0021-972x.

ANDREWS, S. FastQC: a Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data. 2010. Disponível em: < <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc> >.

ASRM. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. **Fertil Steril**, v. 67, n. 5, p. 817-21, May 1997. ISSN 0015-0282 (Print) 0015-0282.

ASRM. Endometriosis and infertility: a committee opinion. **Fertil Steril**, v. 98, n. 3, p. 591-8, Sep 2012. ISSN 0015-0282.

ASSIDI, M. et al. Identification of potential markers of oocyte competence expressed in bovine cumulus cells matured with follicle-stimulating hormone and/or phorbol myristate acetate in vitro. **Biol Reprod**, v. 79, n. 2, p. 209-22, Aug 2008. ISSN 0006-3363 (Print) 0006-3363.

ASSOU, S. et al. The human cumulus-oocyte complex gene-expression profile. **Hum Reprod**, v. 21, p. 15, 2006.

ASSOU, S. et al. The human cumulus--oocyte complex gene-expression profile. **Hum Reprod**, v. 21, n. 7, p. 1705-19, Jul 2006. ISSN 0268-1161 (Print) 0268-1161.

AUSIO, J. et al. Syndromes of disordered chromatin remodeling. **Clin Genet**, v. 64, n. 2, p. 83-95, Aug 2003. ISSN 0009-9163 (Print) 0009-9163.

BARCELOS, I., D. et al. Mulheres inférteis com endometriose pélvica mínima e leve submetidas à estimulação ovariana apresentam menor expressão do gene CYP19A1 em células do cumulus. **Reprod Clim**, 2013. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.recli.2013.08.001> >.

BARNHART, K.; DUNGSMOOR-SU, R.; COUTIFARIS, C. Effect of endometriosis on in vitro fertilization. **Fertil Steril**, v. 77, p. 7, 2002.

BHOGARAJU, S.; DIKIC, I. Cell biology: Ubiquitination without E1 and E2 enzymes. **Nature**, v. 533, n. 7601, p. 43-4, May 5 2016. ISSN 0028-0836.

BRIZEK, C. L. et al. Increased incidence of aberrant morphological phenotypes in human embryogenesis--an association with endometriosis. **J Assist Reprod Genet**, v. 12, n. 2, p. 106-12, Feb 1995. ISSN 1058-0468 (Print) 1058-0468.

BUCCIONE, R.; SCHROEDER, A. C.; EPPIG, J. J. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. **Biol Reprod**, v. 43, n. 4, p. 543-7, Oct 1990. ISSN 0006-3363 (Print) 0006-3363.

BULUN, S. E. Endometriosis. **N Engl J Med**, v. 360, n. 3, p. 268-79, Jan 15 2009. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19144942> >.

BURNEY, R. O.; GIUDICE, L. C. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. **Fertil Steril**, v. 98, n. 3, p. 511-9, Sep 2012. ISSN 0015-0282.

BUSACCA, M.; VIGNALI, M. Endometrioma excision and ovarian reserve: a dangerous relation. **J Minim Invasive Gynecol**, v. 16, n. 2, p. 142-8, Mar-Apr 2009. ISSN 1553-4650 (Print) 1553-4650.

CANIPARI, R. Oocyte--granulosa cell interactions. **Hum Reprod Update**, v. 6, n. 3, p. 279-89, May-Jun 2000. ISSN 1355-4786 (Print) 1355-4786.

COHEN, J. **Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences**. New York, NW: Lawrence Erlbaum Associates, Hillsdale, 1988.

COMBELLES, C. M. et al. Hormonal control of somatic cell oocyte interactions during ovarian follicle development. **Mol Reprod Dev**, v. 69, n. 3, p. 347-55, Nov 2004. ISSN 1040-452X (Print) 1040-452X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15349847> >.

D'HOOGE, T. M. et al. Endometriosis and subfertility: is the relationship resolved? **Semin Reprod Med**, v. 21, n. 2, p. 243-54, May 2003. ISSN 1526-8004 (Print) 1526-4564.

DALTON, C. M.; SZABADKAI, G.; CARROLL, J. Measurement of ATP in single oocytes: impact of maturation and cumulus cells on levels and consumption. **J Cell Physiol**, v. 229, n. 3, p. 353-61, Mar 2014. ISSN 0021-9541.

DAS, S. et al. Reactive oxygen species level in follicular fluid--embryo quality marker in IVF? **Hum Reprod**, v. 21, n. 9, p. 2403-7, Sep 2006. ISSN 0268-1161. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16861701> >.

DOBIN, A. et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. **Bioinformatics**, v. 29, n. 1, p. 15-21, Jan 1 2013. ISSN 1367-4811 (Electronic) 1367-4803 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23104886> >.

DONABELA, F. C. et al. Higher SOD1 Gene Expression in Cumulus Cells From Infertile Women With Moderate and Severe Endometriosis. **Reprod Sci**, v. 22, n. 11, p. 1452-60, Nov 2015. ISSN 1933-7191.

DUMESIC, D. A. et al. Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. **Fertil Steril**, v. 103, n. 2, p. 303-16, Feb 2015. ISSN 1556-5653 (Electronic) 0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25497448> >.

ESKENAZI, B.; WARNER, M., L. Epidemiology of endometriosis. **Obstet Gynaecol Can**, 1997.

ETLINGER, J. D.; GOLDBERG, A. L. A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 74, n. 1, p. 54-8, Jan 1977. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424.

FILIPPI, F. et al. Ovarian endometriomas and oocyte quality: insights from in vitro fertilization cycles. **Fertil Steril**, v. 101, n. 4, p. 988-93.e1, Apr 2014. ISSN 0015-0282.

FRITZ, M. A.; SPEROFF, L. **Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility**. Wolters Kluwer Health, 2012. ISBN 9781451148473. Disponível em: < <http://books.google.com.br/books?id=KZLubBxJEwEC> >.

GARCIA-VELASCO, J. A.; ARICI, A. Is the endometrium or oocyte/embryo affected in endometriosis? **Hum Reprod**, v. 14 Suppl 2, p. 77-89, Dec 1999. ISSN 0268-1161 (Print) 0268-1161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10690803> >.

GARRIDO, N. et al. Follicular hormonal environment and embryo quality in women with endometriosis. **Hum Reprod Update**, v. 6, n. 1, p. 67-74, Jan-Feb 2000. ISSN 1355-4786 (Print) 1355-4786 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10711831> >.

GILCHRIST, R. B. Recent insights into oocyte-follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to in vitro maturation. **Reprod Fertil Dev**, v. 23, n. 1, p. 23-31, 2011. ISSN 1031-3613 (Print) 1031-3613.

GIORGI, V. S. et al. N-Acetyl-Cysteine and l-Carnitine Prevent Meiotic Oocyte Damage Induced by Follicular Fluid From Infertile Women With Mild Endometriosis. **Reprod Sci**, v. 23, n. 3, p. 342-51, Mar 2016. ISSN 1933-7191.

GIUDICE, L. C.; KAO, L. C. Endometriosis. **Lancet**, v. 364, n. 9447, p. 1789-99, Nov 13-19 2004. ISSN 1474-547X (Electronic) 0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15541453> >.

HAKKOLA, J. et al. Expression of CYP1B1 in human adult and fetal tissues and differential inducibility of CYP1B1 and CYP1A1 by Ah receptor ligands in human placenta and cultured cells. **Carcinogenesis**, v. 18, n. 2, p. 391-7, Feb 1997. ISSN 0143-3334 (Print) 0143-3334.

HAMAMAH, S. et al. Comparative protein expression profiling in human cumulus cells in relation to oocyte fertilization and ovarian stimulation protocol. **Reprod Biomed Online**, v. 13, n. 6, p. 807-14, Dec 2006. ISSN 1472-6483 (Print) 1472-6483 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17169200> >.

HAMEL, M. et al. Identification of differentially expressed markers in human follicular cells associated with competent oocytes. **Hum Reprod**, v. 23, n. 5, p. 1118-27, May 2008. ISSN 1460-2350 (Electronic) 0268-1161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18310048> >.

HAOUZI, D. et al. Altered gene expression profile in cumulus cells of mature MII oocytes from patients with polycystic ovary syndrome. **Hum Reprod**, v. 27, n. 12, p. 3523-30, Dec 2012. ISSN 0268-1161.

HAOUZI, D.; HAMAMAH, S. Pertinence of apoptosis markers for the improvement of in vitro fertilization (IVF). **Curr Med Chem**, v. 16, n. 15, p. 1905-16, 2009. ISSN 0929-8673 (Print) 0929-8673 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19442154> >.

HERSHKO, A.; CIECHANOVER, A.; VARSHAVSKY, A. Basic Medical Research Award. The ubiquitin system. **Nat Med**, v. 6, n. 10, p. 1073-81, Oct 2000. ISSN 1078-8956 (Print) 1078-8956.

HILL, J. A. et al. Characterization of leukocyte subpopulations in the peritoneal fluid of women with endometriosis. **Fertil Steril**, v. 50, n. 2, p. 216-22, Aug 1988. ISSN 0015-0282 (Print) 0015-0282.

HOLOCH, K. J.; LESSEY, B. A. Endometriosis and infertility. **Clin Obstet Gynecol**, v. 53, n. 2, p. 429-38, Jun 2010. ISSN 1532-5520 (Electronic) 0009-9201 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20436320> >.

HOWELL, P. M., JR. et al. Epigenetics in human melanoma. **Cancer Control**, v. 16, n. 3, p. 200-18, Jul 2009. ISSN 1073-2748.

HUANG, J. C. et al. Changes in histone acetylation during postovulatory aging of mouse oocyte. **Biol Reprod**, v. 77, n. 4, p. 666-70, Oct 2007. ISSN 0006-3363 (Print) 0006-3363.

HUANG, Z.; WELLS, D. The human oocyte and cumulus cells relationship: new insights from the cumulus cell transcriptome. **Mol Hum Reprod**, v. 16, n. 10, p. 715-25, Oct 2010. ISSN 1360-9947.

HUGHES, E. G.; FEDORKOW, D. M.; COLLINS, J. A. A quantitative overview of controlled trials in endometriosis-associated infertility. **Fertil Steril**, v. 59, n. 5, p. 963-70, May 1993. ISSN 0015-0282 (Print) 0015-0282.

HUTT, K. J.; ALBERTINI, D. F. An oocentric view of folliculogenesis and embryogenesis. **Reprod Biomed Online**, v. 14, n. 6, p. 758-64, Jun 2007. ISSN 1472-6483 (Print) 1472-6483 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17579993> >.

KODAMAN, P. H. Current strategies for endometriosis management. **Obstet Gynecol Clin North Am**, v. 42, n. 1, p. 87-101, Mar 2015. ISSN 0889-8545.

LATHAM, K. E.; SCHULTZ, R. M. Embryonic genome activation. **Front Biosci**, v. 6, p. D748-59, Jun 01 2001. ISSN 1093-9946 (Print) 1093-4715.

LI, H. et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. **Bioinformatics**, v. 25, n. 16, p. 2078-9, Aug 15 2009. ISSN 1367-4811 (Electronic) 1367-4803 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19505943> >.

LI, X.; PEEGEL, H.; MENON, K. M. In situ hybridization of high density lipoprotein (scavenger, type 1) receptor messenger ribonucleic acid (mRNA) during folliculogenesis and luteinization: evidence for mRNA expression and induction by human chorionic gonadotropin specifically in cell types that use cholesterol for steroidogenesis. **Endocrinology**, v. 139, n. 7, p. 3043-9, Jul 1998. ISSN 0013-7227 (Print) 0013-7227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9645674> >.

LIANG, X. W. et al. Loss of methylation imprint of *Snrpn* in postovulatory aging mouse oocyte. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 371, n. 1, p. 16-21, Jun 20 2008. ISSN 0006-291x.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biol**, v. 15, n. 12, p. 550, 2014. ISSN 1474-760X (Electronic) 1474-7596 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25516281> >.

MANOSALVA, I.; GONZALEZ, A. Aging changes the chromatin configuration and histone methylation of mouse oocytes at germinal vesicle stage. **Theriogenology**, v. 74, n. 9, p. 1539-47, Dec 2010. ISSN 0093-691x.

MARTINS, W. P. et al. Ultrasound for monitoring controlled ovarian stimulation: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Ultrasound Obstet Gynecol**, v. 43, n. 1, p. 25-33, Jan 2014. ISSN 1469-0705 (Electronic) 0960-7692 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23873633> >.

MIETTINEN, H. E.; RAYBURN, H.; KRIEGER, M. Abnormal lipoprotein metabolism and reversible female infertility in HDL receptor (SR-BI)-deficient mice. **J Clin Invest**, v. 108, n. 11, p. 1717-22, Dec 2001. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11733567> >.

MOTTA, P. M. et al. Oocyte follicle cells association during development of human ovarian follicle. A study by high resolution scanning and transmission electron microscopy. **Arch Histol Cytol**, v. 57, n. 4, p. 369-94, Oct 1994. ISSN 0914-9465 (Print) 0914-9465.

NAFEE, T. M. et al. Epigenetic control of fetal gene expression. **Bjog**, v. 115, n. 2, p. 158-68, Jan 2008. ISSN 1470-0328.

NNOAHAM, K. E. et al. Impact of endometriosis on quality of life and work productivity: a multicenter study across ten countries. **Fertil Steril**, v. 96, n. 2, p. 366-373.e8, Aug 2011. ISSN 0015-0282.

NOTHNICK, W.; ALALI, Z. Recent advances in the understanding of endometriosis: the role of inflammatory mediators in disease pathogenesis and treatment. **F1000Res**, v. 5, 2016. ISSN 2046-1402.

OSHLACK, A.; ROBINSON, M. D.; YOUNG, M. D. From RNA-seq reads to differential expression results. **Genome Biol**, v. 11, n. 12, p. 220, 2010. ISSN 1474-7596.

PALHARES, A. C. **Análise, via RNAseq, do transcrito da cana-de-açúcar e identificação de genes expressos em resposta a Sporisorium scitamineum, o agente causal do carvão.** 2014

PAULSON, R. J.; SAUER, M. V.; LOBO, R. A. Factors affecting embryo implantation after human in vitro fertilization: a hypothesis. **Am J Obstet Gynecol**, v. 163, n. 6 Pt 1, p. 2020-3, Dec 1990. ISSN 0002-9378 (Print) 0002-9378.

PEDDINTI, D.; MEMILI, E.; BURGESS, S. C. Proteomics-based systems biology modeling of bovine germinal vesicle stage oocyte and cumulus cell interaction. **PLoS One**, v. 5, n. 6, p. e11240, Jun 21 2010. ISSN 1932-6203.

PELLICER, A. et al. The follicular and endocrine environment in women with endometriosis: local and systemic cytokine production. **Fertil Steril**, v. 70, n. 3, p. 425-31, Sep 1998. ISSN 0015-0282 (Print) 0015-0282.

PELLICER, A. et al. Exploring the mechanism(s) of endometriosis-related infertility: an analysis of embryo development and implantation in assisted reproduction. **Hum Reprod**, v. 10 Suppl 2, p. 91-7, Dec 1995. ISSN 0268-1161 (Print) 0268-1161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8745306> >.

PODGAEC, S. **Manual de endometriose**. São Paulo, SP: FEBRASGO, 2014.

PRIETO, L. et al. Analysis of follicular fluid and serum markers of oxidative stress in women with infertility related to endometriosis. **Fertil Steril**, v. 98, n. 1, p. 126-30, Jul 2012. ISSN 1556-5653. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22578534> >.

RABINOVICI, J. et al. In vitro fertilization and primary embryonic cleavage are possible in 17 alpha-hydroxylase deficiency despite extremely low intrafollicular 17 beta-estradiol. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 68, n. 3, p. 693-7, Mar 1989. ISSN 0021-972X (Print) 0021-972X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2493041> >.

RUSSELL, D. L. et al. Bidirectional communication between cumulus cells and the oocyte: Old hands and new players? **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 62-8, Jul 1 2016. ISSN 0093-691x.

SAITO, H. et al. Endometriosis and oocyte quality. **Gynecol Obstet Invest**, v. 53 Suppl 1, p. 46-51, 2002. ISSN 0378-7346 (Print) 0378-7346.

SAMPSON, J. A. Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation. **Am J Pathol**, v. 3, n. 2, p. 93-110 43, Mar 1927. ISSN 0002-9440 (Print) 0002-9440 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19969738> >.

SANCHEZ, A. M. et al. The distinguishing cellular and molecular features of the endometriotic ovarian cyst: from pathophysiology to the potential endometrioma-mediated damage to the ovary. **Hum Reprod Update**, v. 20, n. 2, p. 217-30, Mar-Apr 2014. ISSN 1355-4786.

SATO, N. et al. Expression of LDL receptor and uptake of LDL in mouse preimplantation embryos. **Mol Cell Endocrinol**, v. 202, n. 1-2, p. 191-4, Apr 28 2003. ISSN 0303-7207 (Print) 0303-7207 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12770750> >.

SELI, E. et al. Minireview: Metabolism of female reproduction: regulatory mechanisms and clinical implications. **Mol Endocrinol**, v. 28, n. 6, p. 790-804, Jun 2014. ISSN 1944-9917 (Electronic) 0888-8809 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24678733> >.

SIGNORILE, P. G.; BALDI, A. Endometriosis: new concepts in the pathogenesis. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 42, n. 6, p. 778-80, Jun 2010. ISSN 1878-5875 (Electronic) 1357-2725 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20230903> >.

SIMON, C. et al. Outcome of patients with endometriosis in assisted reproduction: results from in-vitro fertilization and oocyte donation. **Hum Reprod**, v. 9, n. 4, p. 725-9, Apr 1994. ISSN 0268-1161 (Print) 0268-1161.

SINGH, A. K. et al. Markers of oxidative stress in follicular fluid of women with endometriosis and tubal infertility undergoing IVF. **Reprod Toxicol**, v. 42, p. 116-24, Dec 2013. ISSN 1873-1708. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23994512> >.

STILLEY, J. A.; BIRT, J. A.; SHARPE-TIMMS, K. L. Cellular and molecular basis for endometriosis-associated infertility. **Cell Tissue Res**, v. 349, n. 3, p. 849-62, Sep 2012. ISSN 0302-766x.

SU, Y. Q. et al. Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. **Development**, v. 135, n. 1, p. 111-21, Jan 2008. ISSN 0950-1991 (Print) 0950-1991 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18045843> >.

SUGIURA, K.; PENDOLA, F. L.; EPPIG, J. J. Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism. **Dev Biol**, v. 279, n. 1, p. 20-30, Mar 1 2005. ISSN 0012-1606 (Print) 0012-1606.

SUNG, L. et al. Endometriosis is not detrimental to embryo implantation in oocyte recipients. **J Assist Reprod Genet**, v. 14, n. 3, p. 152-6, Mar 1997. ISSN 1058-0468 (Print) 1058-0468.

SUTTON, M. L.; GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. **Hum Reprod Update**, v. 9, n. 1, p. 35-48, Jan-Feb 2003. ISSN 1355-4786 (Print) 1355-4786.

SUZUKI, T. et al. Impact of ovarian endometrioma on oocytes and pregnancy outcome in in vitro fertilization. **Fertil Steril**, v. 83, n. 4, p. 908-13, Apr 2005. ISSN 0015-0282.

TAMBURINI, B. A.; TYLER, J. K. Localized histone acetylation and deacetylation triggered by the homologous recombination pathway of double-strand DNA repair. **Mol Cell Biol**, v. 25, n. 12, p. 4903-13, Jun 2005. ISSN 0270-7306 (Print) 0270-7306.

TANGHE, S. et al. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. **Mol Reprod Dev**, v. 61, n. 3, p. 414-24, Mar 2002. ISSN 1040-452X (Print) 1040-452X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11835587> >.

TEAM, R. D. C. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing 2008. ISSN 3-900051-07-0. Disponível em: < <http://www.R-project.org> >.

TESARIK, J.; MENDOZA, C. Nongenomic effects of 17 beta-estradiol on maturing human oocytes: relationship to oocyte developmental potential. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 80, n. 4, p. 1438-43, Apr 1995. ISSN 0021-972X (Print) 0021-972X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7714121> >.

TESARIK, J.; MENDOZA, C. Direct non-genomic effects of follicular steroids on maturing human oocytes: oestrogen versus androgen antagonism. **Hum Reprod Update**, v. 3, n. 2, p. 95-100, Mar-Apr 1997. ISSN 1355-4786 (Print) 1355-4786 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9286733> >.

THOMAS, F. H. et al. Follicle-stimulating hormone regulates oocyte growth by modulation of expression of oocyte and granulosa cell factors. **Endocrinology**, v. 146, n. 2, p. 941-9, Feb 2005. ISSN 0013-7227 (Print) 0013-7227.

THOMAS, F. H.; VANDERHYDEN, B. C. Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 4, p. 19, Apr 12 2006. ISSN 1477-7827.

TSUCHIYA, Y.; NAKAJIMA, M.; YOKOI, T. Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human. **Cancer Lett**, v. 227, n. 2, p. 115-24, Sep 28 2005. ISSN 0304-3835 (Print) 0304-3835.

VAN MONTFOORT, A. P. et al. Differential gene expression in cumulus cells as a prognostic indicator of embryo viability: a microarray analysis. **Mol Hum Reprod**, v. 14, n. 3, p. 157-68, Mar 2008. ISSN 1360-9947.

VERCELLINI, P. et al. The 'incessant menstruation' hypothesis: a mechanistic ovarian cancer model with implications for prevention. **Hum Reprod**, v. 26, n. 9, p. 2262-73, Sep 2011. ISSN 0268-1161.

VERCELLINI, P. et al. Surgery for endometriosis-associated infertility: a pragmatic approach. **Hum Reprod**, v. 24, n. 2, p. 254-69, Feb 2009. ISSN 0268-1161.

VIGANO, P. et al. Endometriosis: epidemiology and aetiological factors. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 18, n. 2, p. 177-200, Apr 2004. ISSN 1521-6934 (Print) 1521-6934.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nat Rev Genet**, v. 10, n. 1, p. 57-63, Jan 2009. ISSN 1471-0056.

WEBER, J.; SENIOR, A. E. ATP synthesis driven by proton transport in F1F0-ATP synthase. **FEBS Lett**, v. 545, n. 1, p. 61-70, Jun 12 2003. ISSN 0014-5793 (Print) 0014-5793.

YALÇINKAYA, E. et al. Effect of follicular fluid NO, MDA and GSH levels on in vitro fertilization outcomes. **J Turk Ger Gynecol Assoc**, v. 14, n. 3, p. 136-41, 2013. ISSN 1309-0399. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24592092> >.

ZHENG, W. et al. Genetic polymorphism of cytochrome P450-1B1 and risk of breast cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 9, n. 2, p. 147-50, Feb 2000. ISSN 1055-9965 (Print) 1055-9965.

ZHU, B. T.; CONNEY, A. H. Functional role of estrogen metabolism in target cells: review and perspectives. **Carcinogenesis**, v. 19, n. 1, p. 1-27, Jan 1998. ISSN 0143-3334 (Print) 0143-3334.

Anexos

Anexo 1

Tabela - Quantificação e análise de integridade do RNA total das células do cumulus.

ID	Grupo	ng/μl	RIN	ID	Grupo	ng/μl	RIN
2	Controle	3	N/A	44	III/IV - Sem	5,1	N/A
9	Controle	8,4	8,8	48	III/IV - Sem	87	9
11	Controle	98,5	8,9	50	III/IV - Sem	44,4	8,8
12	Controle	24,3	8	60	III/IV - Sem	8	N/A
16	Controle	8	N/A	62	III/IV - Sem	N/Q	N/A
19	Controle	9,4	8,4	77	III/IV - Sem	51	9,4
21	Controle	10	N/A	78	III/IV - Sem	77	9,1
24	Controle	34,6	9	1	III/IV - Com	9,6	N/A
35	Controle	81	8,8	7	III/IV - Com	52	9,2
43	Controle	32,2	9	18	III/IV - Com	36,3	8,5
47	Controle	29,2	9,2	22	III/IV - Com	45,9	8,7
51	Controle	6,7	N/A	23	III/IV - Com	7	7,5
52	Controle	5,2	N/A	28	III/IV - Com	3,6	6,4
55	Controle	69	9,1	33	III/IV - Com	28,5	8,4
65	Controle	10	8,3	37	III/IV - Com	4,3	N/A
66	Controle	7,3	N/A	39	III/IV - Com	77	8,7
74	Controle	34,3	9,1	46	III/IV - Com	4,6	N/A
14	III/IV - Sem	40	7,7	49	III/IV - Com	12	8
15	III/IV - Sem	25,7	8,2	54	III/IV - Com	39,2	N/A
17	III/IV - Sem	26,9	7,7	61	III/IV - Com	37	9
20	III/IV - Sem	30	8,2	63	III/IV - Com	40,3	9,7
26	III/IV - Sem	65	8,9	68	III/IV - Com	31,4	9,4
27	III/IV - Sem	100	9	70	III/IV - Com	2,2	N/A
30	III/IV - Sem	13,8	7,7	72	III/IV - Com	60	9,6
36	III/IV - Sem	12,3	7,9	75	III/IV - Com	24,1	8,6
41	III/IV - Sem	81	9,1	79	III/IV - Com	53	9,8
42	III/IV - Sem	4,5	N/A				

NOTA: ID: identificação da amostra, ng/μl: concentração total em ng/μl, amostras eluídas com total de 20 μl, RIN: RNA *integrity number*, N/Q: não quantificável, N/A: não analisável. Grupos: Controle, Endometriose III/IV sem endometrioma (III/IV - Sem) e Endometriose III/IV com endometrioma (III/IV - Com).