

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**ATIVIDADE DA AROMATASE EM CÉLULAS DA GRANULOSA
DE MULHERES COM ENDOMETRIOSE SUBMETIDAS A
TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA**

Lauriane Giselle de Abreu

**Ribeirão Preto, São Paulo
2005**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**ATIVIDADE DA AROMATASE EM CÉLULAS DA GRANULOSA
DE MULHERES COM ENDOMETRIOSE SUBMETIDAS A
TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA**

Lauriane Giselle de Abreu

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, para obtenção do título
de Mestre em Medicina na área de concentração:
Tocoginecologia

Orientador: Prof. Dr. Marcos Dias de Moura

Ribeirão Preto, São Paulo
2005

Ficha catalográfica

Abreu, Lauriane Giselle de

**Atividade da Aromatase em Células da Granulosa de Mulheres com Endometriose Submetidas a Técnicas de Reprodução Assistida/
Lauriane Giselle de Abreu. Ribeirão Preto, São Paulo, 2005.**

xix, 97p., il.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Universidade de São Paulo, Departamento de Tocoginecologia.

Data da Defesa: 31/05/2005

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcos Dias de Moura

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Profa. Dra. Rosana Maria dos Reis

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. Mauri Piazza

Julgamento: _____

Assinatura: _____

“Sejam quais forem os sentimentos e os interesses humanos, o intelecto é, também ele, uma força. Esta não consegue prevalecer imediatamente, mas por fim os seus efeitos revelam-se ainda mais peremptórios. A verdade que mais fere acaba sempre por ser notada e por se impor, assim que os interesses que lesa e as emoções que suscita tenham esgotado a sua virulência.”

Sigmund Freud

DEDICATÓRIAS

Ao meu pai, Luiz Antonio.

À minha mãe, Rosemarie.

Dedico a vocês, com muito amor, este trabalho e todas as minhas realizações. Minha enorme gratidão pela confiança e apoio que sempre me ofereceram.

Aos meus irmãos, Luciana e Júnior, pelo apoio.

Ao meu companheiro, Marcelo, pela confiança e paciência.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof Dr. Marcos Dias de Moura, agradecimento especial pela confiança na realização deste trabalho. Minha total admiração pelo seu talento como docente, como médico, como pesquisador e grande cientista. Também minha gratidão pela orientação e pela amizade e gentileza sempre presentes.

Ao Prof. Dr. Marcos Felipe Silva de Sá, chefe da pós-graduação na área de Tocoginecologia, grande mestre, toda a admiração por seu trabalho como docente e cientista e minha gratidão pelo apoio científico e confiança neste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Fernando Mangieri Sobrinho e Prof. Inácio Teruo Inoue; pela amizade, estímulo para a carreira científica e confiança.

Aos Profs. Rosana Maria dos Reis e Rui Alberto Ferriani, pela atenção e incentivo para a realização deste trabalho.

A todos os docentes do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP, pela imensa colaboração em minha formação.

À sra. Maria Albina Verceze Bortoliero, que me ensinou a técnica do cultivo celular e realizou as dosagens hormonais, minha enorme gratidão pelo seu carinho, dedicação e auxílio em todo o processo.

À sra. Ilza Rezende Mazzocato, minha gratidão pela amizade e auxílio.

Às sras. Renata Maria Rebouças, Maria Cristina Piccinato Araújo; Maria Auxiliadora Pádua, Sandra Viana, Maria Aparecida Carneiro Vasconcelos, Marilda Hatsumi Yamada Dantas, pelo auxílio prestado neste trabalho, disponibilidade e amizade.

Aos meus colegas de pós-graduação: Luciana de Barros Duarte, Carolina Sales Vieira, Alessandra Marcolin, Laura Ferreira Santana, Arlene de Oliveira Fernandes, e todos em geral, pela amizade e apoio.

SUMÁRIO

Abreviaturas.....	x
Lista de tabelas.....	xii
Lista de figuras	xiv
Resumo	xv
Summary	xvii
1. Introdução	19
1.1. Etiopatogenia da Endometriose	19
1.2. Aromatase e Endometriose	27
2. Objetivo	34
3. Pacientes e Métodos	35
3.1. Delineamento do estudo	35
3.2. Amostra	35
3.3. Local de realização do estudo	35
3.4. Comitê de ética	35
3.5. Seleção de pacientes	35
3.5.1. Critérios de inclusão para os dois grupos	36
3.5.2. Critérios de inclusão para o grupo-estudo	36
3.5.3. Critérios de exclusão para o grupo-estudo	36
3.5.4. Critérios de inclusão para o grupo-controle	36
3.5.5. Critérios de exclusão para o grupo-controle	36
3.6. Protocolo de Hiperestimulação Ovariana Controlada	37

SUMÁRIO

3.7. Captação de oócitos	38
3.8. Cultivo de Células da Granulosa	40
3.8.1. Procedimento do Cultivo Celular	42
3.9. Atividade da aromatase	45
3.10. Experimentos realizados	46
3.11. Dosagens hormonais	47
3.11.1 Estradiol	47
3.11.2. Progesterona	47
3.12. Análise Estatística	48
4. Resultados	49
4.1. Características clínicas das pacientes do estudo	49
4.2. Dosagens Hormonais nos Fluidos de Cultivos Celulares	56
4.2.1. Estradiol	56
4.2.2. Atividade da aromatase	57
4.2.3. Progesterona	63
5. Discussão	67
6. Conclusão	71
7. Referências Bibliográficas	72
Apêndice 01	82
Apêndice 02	84
Anexos	86

ABREVIATURAS

- A** → androstenediona
- Bax** → proteína anti-apoptótica denominada proteína X associada à Bcl-2
- Bcl-2** → proteína anti-apoptótica derivada da célula B CLL/linfoma 2
- CC** → citrato de clomifeno
- E1** → estrona
- E2** → estradiol
- FIV** → Fertilização In Vitro
- FMRP** → Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
- FSH** → hormônio folículo-estimulante
- FSHr** → hormônio folículo-estimulante recombinante
- GnRH** → hormônio liberador de gonadotrofinas
- GnRHa** → análogos do GnRH
- hCG** → gonadotrofina coriônica humana
- HMG ou HMG** → gonadotrofinas menopausais humanas
- ICSI** → Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide
- IGF-1** → fator de crescimento insulina símile tipo 1
- IL** → interleucina
- IUI** → Inseminação Intra uterina
- LH** → hormônio luteinizante
- M** → concentração molar
- mICAM** → molécula de adesão intercelular forma de membrana

ABREVIATURAS

MMTPs → metaloproteinases

NK → células de citotoxicidade natural

PCR → reação em cadeia de polimerase

P4 → progesterona

P450 → termo genérico para denominar a família de enzimas oxidativas contendo o pigmento 450 cuja absorvância muda enquanto é reduzido

P450 arom → aromatase P450

RNA_m → ácido ribonucléico mensageiro

ROS → espécies reativas de oxigênio

SD → desvio padrão

sICAM → molécula de adesão intercelular tipo solúvel

sTAR → proteína de regulação aguda da esteroidogênese

TEC → transferência de embriões congelados

TIMPs → inibidores das metaloproteinases

Th1 → subpopulação de linfócitos T auxiliares tipo 1

Th2 → subpopulação de linfócitos T auxiliares tipo 2

TGF → fator de crescimento tumoral

TNF → fator de necrose tumoral

USG → ultrassonografia

UI → unidades internacionais

VEGF → fator de crescimento vascular endotelial

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Preparo dos meios para cultivo de células da granulosa.

Tabela 2 – Características clínicas das mulheres do grupo controle: idade, tempo de infertilidade, tratamentos de infertilidade prévios e causa da infertilidade.

Tabela 3 - Características clínicas das mulheres do grupo com endometriose: idade, tempo de infertilidade, tratamentos de infertilidade prévios, classificação da endometriose e antecedente familiar de endometriose.

Tabela 4 – Características da hiperestimulação ovariana controlada para FIV ou ICSI das pacientes do grupo com endometriose e controle.

Tabela 5 – Características da captação de oócitos e transferência embrionária para FIV e ICSI nos grupo controle e endometriose.

Tabela 6 – Valores em média das dosagens de estradiol em pg/ml de fluidos de cultivos de células da granulosa de mulheres sem endometriose (grupo controle) submetidas à reprodução assistida.

LISTA DE TABELAS

Tabela 7 - Valores em média das dosagens de estradiol em pg/ml de fluidos de cultivos de células da granulosa de mulheres com endometriose submetidas à reprodução assistida.

Tabela 8 – Valores em média das dosagens de progesterona em ng/ml de fluidos de cultivos de células da granulosa de mulheres sem endometriose (grupo controle) submetidas à reprodução assistida.

Tabela 9 – Valores em média das dosagens de progesterona em ng/ml de fluidos de cultivos de células da granulosa de mulheres com endometriose submetidas à reprodução assistida.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Possíveis alterações fisiopatológicas na cavidade peritoneal de mulheres com endometriose.

Figura 2 – mecanismo de estresse oxidativo na endometriose.

Figura 3 – Inativação defectiva de estradiol na endometriose.

Figura 4 – Esquema de hiperestimulação ovariana controlada para FIV ou ICSI

Figura 5 – Esquema do procedimento de cultivo de células da granulosa.

Figura 6 – Níveis de P4 (ng/ml) produzidos em condições basais e em resposta à adição de testosterona ($2 \times 10^{-6}M$ e $2 \times 10^{-5}M$) em cultivo de células da granulosa do grupo de mulheres com endometriose e controle.

Gráfico 1 – Níveis de E2 (pg/ml) em fluido de cultivo de células da granulosa do grupo de mulheres com endometriose e controle, em condições basais.

Gráficos 2 e 3 – Atividade da aromatase expressa em níveis de E2 (pg/ml) produzidos em resposta à adição de testosterona na concentração de $2 \times 10^{-6}M$ (**Gráfico 2**) e $2 \times 10^{-5}M$ (**Gráfico 3**) em cultivo de células da granulosa de mulheres com endometriose e controle.

RESUMO

Abreu LG. Atividade da aromatase em células da granulosa de mulheres com endometriose submetidas a técnicas de reprodução assistida. 2005. 97p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Endometriose significa presença de tecido endometrial fora da cavidade uterina. Sua associação com infertilidade é inequívoca, entretanto, os mecanismos envolvidos ainda permanecem não totalmente esclarecidos e aberrações moleculares emergem como possíveis alvos de defeitos. Acredita-se em comprometimento poligênico com alterações de citocinas, moléculas do estresse oxidativo e enzimas relacionadas à esteroidogênese como a aromatase. Esta é responsável por catalisar a transformação de andrógenos em estrógenos; está presente em vários tecidos e na célula da granulosa é de primordial importância para a foliculogênese. Em mulheres com endometriose, foram encontradas alterações da aromatase tanto em implantes endometrióticos como no endométrio tópico, além de redução de sua atividade em células da granulosa, com possível comprometimento da qualidade oocitária. Este trabalho tem por objetivo medir a atividade da aromatase nas

células da granulosa *in vitro* de mulheres com endometriose submetidas à reprodução assistida.

Pacientes e Métodos: Estudo caso-controle, com 8 pacientes com endometriose e 8 com outras causas de infertilidade submetidas à FIV ou ICSI. Coletaram-se células da granulosa a partir de folículos pré-ovulatórios no dia da captação oocitária e realizou-se cultivo destas células por 24 horas, na presença ou não de testosterona nas concentrações de 2×10^{-6} M e 2×10^{-5} M; FSH (50 ng/ml) e IGF-1 (50 ng/ml) e foi feita dosagem posterior de estradiol (radioimunoensaio) e progesterona (quimioluminescência) nos fluidos de cultivo.

Resultados: Houve redução da atividade da aromatase nas células da granulosa de mulheres com endometriose quando comparadas ao controle, quando houve adição de testosterona na concentração de 2×10^{-6} M ($p=0,0303$). A produção de estradiol e progesterona, basal ou estimulada por IGF-1 e FSH, não mostrou nenhuma diferença entre os grupos. Também não houve nenhuma diferença na produção de progesterona mediante adição de testosterona.

Palavras-chave: Aromatase; endometriose; células da granulosa; reprodução assistida.

SUMMARY

Abreu LG. **Aromatase activity in granulosa cells of women with endometriosis undergoing assisted reproduction techniques.** 2005. 97p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Endometriosis represents the presence of endometrial tissue outside the uterine cavity. The infertility-endometriosis association is unequivocal; however, the mechanisms involved are still not totally elucidated and molecular aberrations have been proposed as possible targets. There is a belief that a polygenic insult results in molecular alterations of cytokines, molecules of the oxidative stress and enzymes related to steroid synthesis, such as aromatase. This enzyme is responsible for converting androgens to estrogens, is present in several tissues and in granulosa cells and is of primordial importance for folliculogenesis. In women with endometriosis, aromatase alterations have been found both in endometriotic implants and in topic endometrium, as well as reduced activity in granulosa cells, with possible oocyte damage. The aim of this study was to measure aromatase activity in granulosa cells of women with endometriosis undergoing assisted reproductive techniques.

Patients and Methods: A case-control study was conducted on 8 patients with endometriosis and 8 with other infertility causes submitted to IVF or ICSI. Granulosa cells were obtained from a pre-ovulatory follicle during oocyte retrieval and cultured for 24 hours in the presence or absence of testosterone at 2×10^{-6} M and 2×10^{-5} M concentration, FSH (50 ng/ml) and IGF-1 (50 ng/ml). Estradiol (radioimmunoassay) and progesterone (quimioluminescence) were then measured in culture fluids.

Results: Reduced aromatase activity was detected in granulosa cells of women with endometriosis compared to control when testosterone was added at 2×10^{-6} M concentration ($p=0.0303$). The production of estradiol and progesterone under basal conditions or in the presence of stimulation with IGF-1 and FSH did not differ between groups. Also, no difference in progesterone production was observed in the presence of testosterone.

Key-words: aromatase; endometriosis; granulosa cells; assisted reproduction techniques.

1. Introdução

1.1. Etiopatogenia da Endometriose

Endometriose, por definição, significa presença de endométrio (com glândula e estroma) fora da cavidade uterina (Noble et al., 1996 Speroff et al., 1999). Clinicamente, apresenta-se sob a tríade: dor pélvica crônica, dismenorréia e infertilidade, porém, não se encontra correspondência entre estágio da doença e severidade dos sintomas, de maneira que pequenas lesões podem causar sintomas exuberantes e vice-versa (Moura et al., 1999). Atinge preferencialmente mulheres no menacme, sendo infreqüente antes da menarca e após a menopausa (Schenken, 1996; Moura et al., 1999; Neme et al., 2001) e representa uma doença crônica e de elevada morbidade, a qual acomete cerca de 10% das mulheres em idade reprodutiva e 25 a 35% das inférteis (Wheeler, 1989; Schenken, 1996; Moura et al., 1999; Speroff et al., 1999). Na verdade, a prevalência da endometriose depende muito do método empregado para seu diagnóstico e a população estudada. Wheeler (1989) demonstrou prevalência de aproximadamente 10% em achados cirúrgicos em mulheres em idade reprodutiva com outros diagnósticos, Hess (1988), por sua vez, encontrou 9,4% de endometriose em mulheres submetidas à laparoscopia por algia pélvica crônica (Neme et al., 2001). Quando se analisam mulheres com infertilidade e dor pélvica associadas, pode-se encontrar até 50% de prevalência de endometriose (Cornillie et al., 1990), por outro lado, mulheres assintomáticas apresentam incidência de cerca de 1-2% (Moura et al., 1999).

Admite-se que a etiopatogenia de endometriose seja multifatorial e existem várias teorias para tentar explicá-la (Pellicer et al., 1998; Bulun et al., 2002). De acordo com a teoria de Sampson, a mais aceita, os debris menstruais que refluem para a cavidade peritoneal possuem células endometriais viáveis que potencialmente podem formar um implante endometriótico. Entretanto, por que existe refluxo em 90% das mulheres e somente 10% delas têm endometriose? Acredita-se que algumas destas células endometriais das pacientes com endometriose apresentam características singulares geneticamente determinadas que possam aumentar sua probabilidade de implantar-se, bem como a existência de um mecanismo imunológico aberrante que possa aumentar a sobrevivência destas células e favorecer a formação de implante endometriótico (Zeitoun et al., 1999; Bulun et al., 2002).

Outras teorias tentam explicar a presença de lesões de endometriose fora da cavidade pélvica. Em 1927, Meyer (1924) propôs que a endometriose seria resultado de uma metaplasia das células da linhagem peritoneal; esta teoria explica a endometriose em homens, em pré-púberes, mulheres que nunca menstruaram e lesões em sítios atípicos, como cavidade pleural e meninges.

A constatação da presença de células endometriais viáveis na luz de vasos sanguíneos e linfáticos por Halban e Sampson (1925) levou-os a especular que focos distantes de endometriose poderiam surgir a partir da disseminação de células endometriais por via hematogênica ou linfática. Esta teoria explicaria lesões na pleura, umbigo, espaço retroperitoneal, vagina e colo do útero.

Acredita-se que a endometriose também represente uma doença poligênica com envolvimento de alterações moleculares, principalmente as

citocinas (Wu & Ho, 2003); enzimas relacionadas à esteroidogênese como a aromatase (Zeitoun et al., 1999; Bulun et al., 2002) e moléculas envolvidas com o estresse oxidativo celular (Langendonck et al., 2002; Szczepanska et al., 2003).

Kao e colaboradores (2003), através da análise de *microarrays* em amostras de endométrio de mulheres com endometriose, encontraram 91 genes com expressão aumentada e 115 reduzidos significativamente nestas mulheres; entre estes genes alterados incluem aqueles envolvidos com resposta imune e apoptose celular, receptor de progesterona, fatores angiogênicos e o gene da aromatase. Arvanitis e colaboradores (2003) também encontraram a presença de um polimorfismo no gene da aromatase associado com endometriose.

Com relação ao sistema imune, encontram-se alterações tanto na imunidade celular quanto humoral na endometriose, de maneira que ocorra um ambiente peritoneal favorável à maior sobrevivência das células endometriais após o fluxo retrógrado para formação dos implantes endometrióticos (Pellicer et al., 1998; Wu & Ho, 2003). O fluido peritoneal de pacientes com endometriose apresenta um maior número e maior atividade macrofágica; entretanto, estes apresentam atividade fagocítica reduzida e produzem maior quantidade de fatores de crescimento e citocinas que estimulam a adesão celular e expressão de metaloproteinases (substâncias modeladoras da matriz extracelular), favorecendo a formação dos implantes endometrióticos (Olive et al., 1985; Zeller et al., 1987; Dunselman et al., 1988). As células NK (Natural Killer) também apresentam atividade de citotoxicidade reduzida na endometriose, levando a uma menor capacidade de clearance das células endometriais refluídas (Oosterlynck et al., 1991; Wilson et al., 1994). Entre os linfócitos, há uma dominância na

atividade dos linfócitos da subpopulação Th2 em relação à Th1 (Wu & Ho, 2003). Quanto à imunidade humoral, sugere-se a associação entre endometriose e doenças auto-imunes (Gallová et al., 2002). Em estudo realizado com 313 mulheres inférteis com endometriose (261 estágios I e II; 62 estágios III e IV) comparativamente a 101 mulheres inférteis sem endometriose, houve maiores níveis de auto-anticorpos do tipo antifosfolípide contra inositol, cardiolipina, etanolamida e β 2glicoproteína nas pacientes com endometriose, sendo mais exuberante naquelas nos estágios I e II. E em 40% das pacientes com endometriose graus leve e mínimo apresentaram anticorpos antizona pelúcida (Gallová et al., 2002).

Além disso, níveis elevados de citocinas no fluido peritoneal de pacientes com endometriose foram relatados em diversos estudos. Entre elas estão IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, VEGF, $TNF\alpha$, $TGF\beta$ (Wu & Ho, 2003). (Figura 1)

Destaque merece ser dado à IL-6, que corresponde a uma interleucina das mais importantes na etiopatogenia da endometriose. Está envolvida com a produção esteroidogênica ovariana, foliculogênese e implantação embrionária, apresenta atividade multifuncional e possui efeitos angiogênicos, induzindo a expressão de VEGF. Além disso, por estímulo de IL-1, ocorre produção de IL-6 em células endometriais de pacientes com endometriose, porém não em pacientes sem a doença. A IL-6 também estimula a produção da aromatase em células adiposas (Witz et al., 2000), e, em elevadas concentrações, é embriotóxica em ratos (Wu & Ho, 2003). (Figura 1)

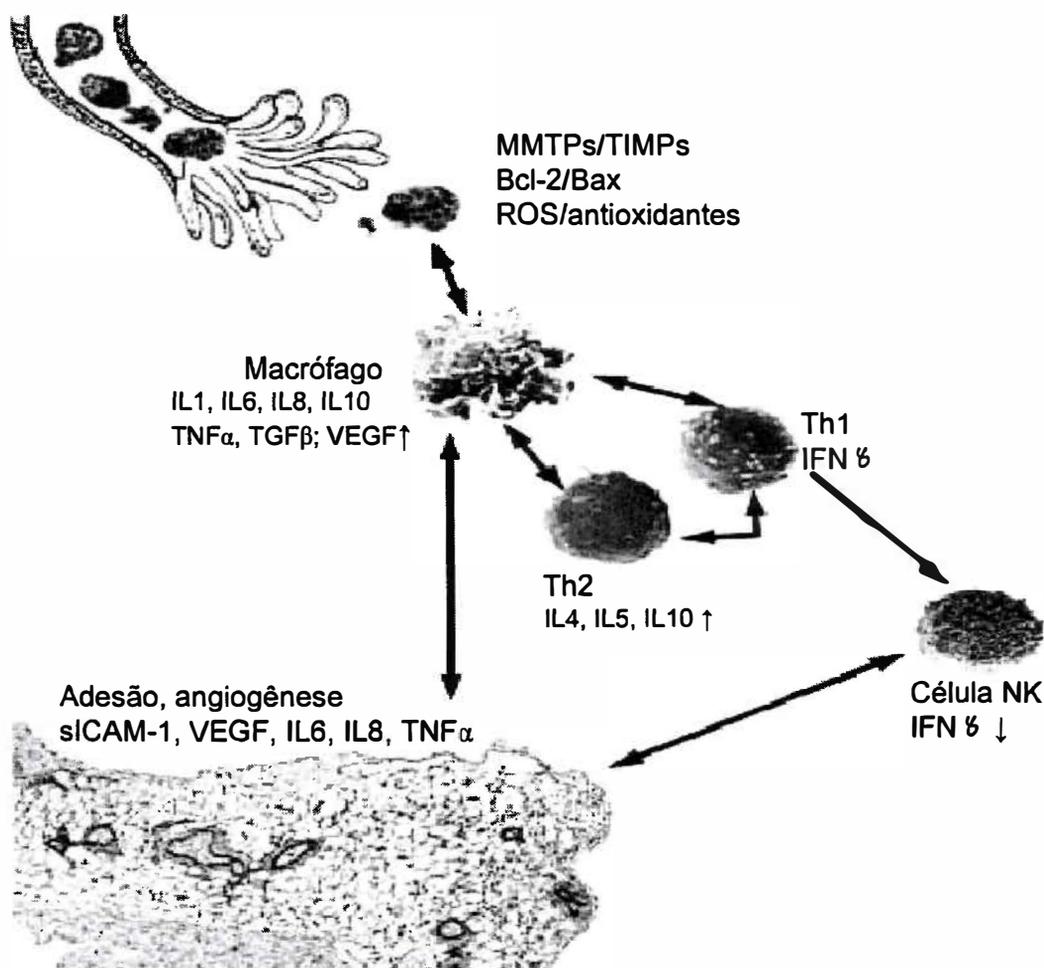


Figura 1 – Possíveis alterações fisiopatológicas na cavidade peritoneal de mulheres com endometriose. O endométrio anormal da endometriose em ROS (espécies reativas de oxigênio), antioxidantes, metaloproteinases e seus inibidores (MMPs e TIMPs). Th1 = subpopulação de linfócitos 1; Th2 = subpopulação de linfócitos 2. sICAM-1: molécula de adesão intercelular forma solúvel. VEGF = fator de crescimento vascular endotelial. Bcl-2 e Bax = proteínas anti-apoptóticas. (adaptado de Wu & Ho, 2003).

Pesquisa-se também a presença de alterações nos mecanismos de controle de proliferação celular do endométrio de pacientes com endometriose. A "homeostase tecidual" normalmente é produto de um equilíbrio entre mecanismos de destruição ou degradação celular (apoptose) e de proliferação celular. Na endometriose parece haver um desbalanço nesta homeostase, com maior proliferação celular nas lesões endometrióticas e menor apoptose, permitindo a sobrevivência e crescimentos das lesões. (Fujishita et al., 1999; Dmowski et al., 200; Braun et al., 2002; Toya et al., 2002). As proteínas anti-apoptóticas Bcl2 e Bax apresentam aumento de sua expressão em macrófagos e células endometriais de pacientes com endometriose (Wu & Ho, 2003).

Ainda, acredita-se que a cavidade peritoneal de pacientes com endometriose represente um ambiente pró-oxidante, com produção de substâncias denominadas espécies reativas de oxigênio (ROS) que podem contribuir para a reação inflamatória associada à endometriose (Langendonck et al., 2002).

Existem algumas evidências de estresse oxidativo na endometriose: (1) A enzima óxido nítrico-sintetase encontra-se superexpressa levando a uma maior produção de óxido nítrico (substância pró-oxidante); (2) aumento da peroxidação lipídica com produção de produtos reativos como o malonaldeído e lisofosfatidilcolina; (3) expressão aumentada de enzimas antioxidantes no endométrio de pacientes com endometriose, que ocorreria em resposta à presença de maior quantidade de espécies reativas de oxigênio; (4) níveis reduzidos de vitamina E no fluido peritoneal de mulheres com endometriose consumida durante reações de oxidação; (5) presença de indutores potenciais de estresse oxidativo na cavidade peritoneal como eritrócitos, debris celulares e

os macrófagos (Langendonckt et al., 2002; Szczepanska et al., 2003). (Figura 2). Os efeitos sobre a fertilidade residem sobre a toxicidade do fluido peritoneal sobre os espermatozóides, ovulação, sobre o desenvolvimento embrionário pré-implantação e na implantação (Langendonckt et al., 2002) (Figura 2).

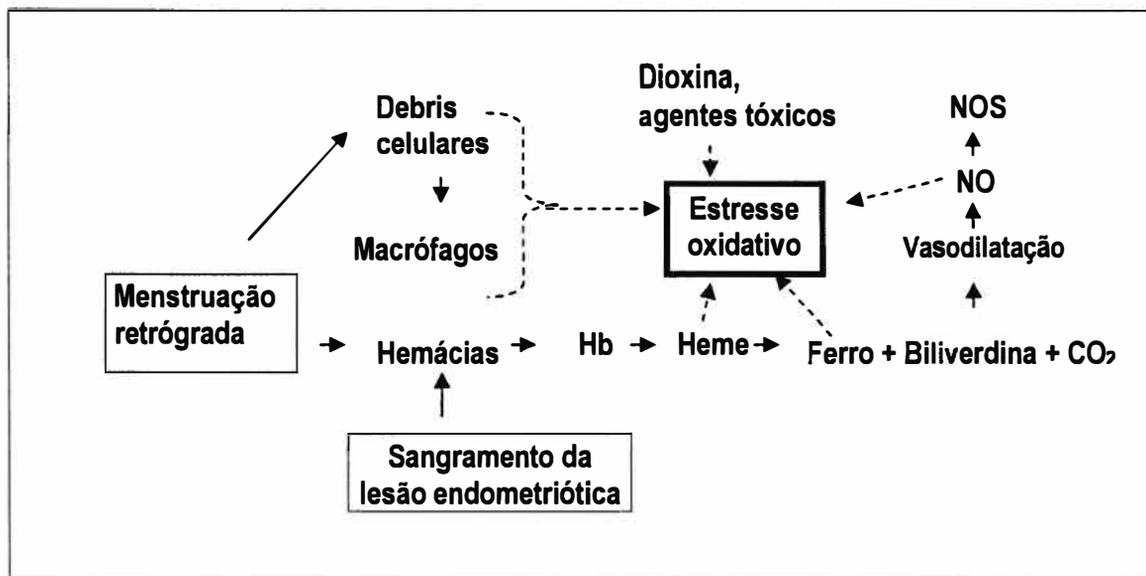


Figura 2 – mecanismo de estresse oxidativo na endometriose. (adaptado de Langendonckt et al., 2002). (Hb = hemoglobina; CO₂ = dióxido de carbono; NO = óxido nítrico; NOS = óxido nítrico sintase).

Outras moléculas também se mostraram como alvos de alterações na endometriose: (1) Metaloproteinases - as metaloproteinases (MMP) e seus inibidores (TIMPs) são reguladores fisiológicos da remodelação da matriz extracelular. Um desbalanço entre eles pode produzir uma doença invasiva e favorecer a implantação endometrial no peritônio. Na endometriose, pode ocorrer uma falta de inibidores das metaloproteinases, bem como aumento dos níveis das próprias metaloproteinases do tipo 1 e 2, como já foi detectado. A MMP2 é considerada um marcador de possível invasão por tumores epiteliais e

encontra-se aumentada na endometriose (Wu & Ho, 2003). (2) Moléculas de adesão (ICAM, SICAM) - molécula de adesão intercelular, é fortemente expressa em células endometriais e sua forma de expressão de membrana (mICAM) é importante para interação com o sistema imune e para a eliminação destas células do peritônio. Entretanto, existe uma forma solúvel (sICAM) que se liga às células imunológicas, impedindo-as de interagir com a mICAM, em última instância, prevenindo a destruição das células endometriais do peritônio. A elevação de níveis séricos e no fluido peritoneal de sICAM foi detectada na endometriose. A presença desta molécula (sICAM) corresponde a mais um mecanismo das células endometriais na endometriose de escapar da ação imune e aumentar sua sobrevivência no ambiente peritoneal favorecendo sua implantação em sítios ectópicos (Wu & Ho, 2003).

Além da etiopatogenia, também existem controvérsias sobre o comportamento da endometriose e sua classificação. Nisolle & Donnez (1997) defendem a hipótese das três doenças, ou seja, que a endometriose peritoneal, a ovariana e a de septo retovaginal representariam três doenças distintas com comportamentos clínicos e histopatológicos diferentes. Brosens (2000), por sua vez, classifica a endometriose de acordo com sua topografia, em superficial e profunda: a forma superficial ou adenomiose seguiria o trajeto dos ductos müllerianos incluindo útero, fôrnices vaginais, septo retovaginal e ligamentos uterinos; as lesões profundas seriam aquelas localizadas fora da extensão dos ductos de Müller e incluiriam lesões peritoneais e ovarianas.

1.2. Aromatase e Endometriose

Como já foi relatado, emerge a teoria de que a endometriose represente uma doença poligênica hereditária com envolvimento de alterações moleculares com expressão aberrante de citocinas e enzimas relacionadas à esteroidogênese como a 17beta-hidróxi-esteróide-desidrogenase e a aromatase (Zeitoun & Bulun, 1999; Attia et al., 2001; Neme et al., 2001; Bulun et al., 2002).

De fato, evidências apontam neste sentido, especialmente no caso da aromatase (Bulun et al., 1995; Noble et al., 1996; Zeitoun & Bulun, 1999; Neme et al., 2001; Bulun et al., 2002).

Esta é uma enzima codificada pelo gene CYP 19 localizado no cromossomo 15 (Meinhart & Mullis, 2002), corresponde a um complexo enzimático do citocromo P450 responsável por catalisar a transformação de andrógenos (testosterona, androstenediona) em estrógenos (estradiol, estrona, respectivamente) (Zeitoun & Bulun, 1999; Neme et al., 2001; Bulun et al., 2002; Karaer et al., 2004). Ela está presente em vários tecidos: ovários (células da granulosa), testículo, tecido adiposo, placenta, cérebro, músculo, fibroblastos da pele e do tecido ósseo (Karaer et al., 2004). Vários promotores tecido-específicos regulam a sua expressão, e, apesar da presença de primeiros exons alternativos e de promoters tecido-específicos que permitem a regulação local da enzima, a proteína expressa é a mesma (Meinhart & Mullis, 2002; Karaer et al., 2004). Na célula da granulosa, a aromatase apresenta um papel essencial na foliculogênese e produção de estradiol: sua expressão aumenta à medida que o desenvolvimento folicular progride (Tetsuka & Hillier, 1997; Guet et al., 1999), sob influência do FSH, segundo a teoria das duas células-duas

gonadotrofinas (Speroff et al., 1999). Portanto, a aromatase é uma enzima de primordial importância na célula da granulosa e responsável por produzir um microambiente estrogênico folicular, essencial ao seu processo de desenvolvimento e maturação (Speroff et al., 1999).

O envolvimento da aromatase e a produção de estradiol na etiopatogenia da endometriose tem sido alvo de numerosos estudos (Bulun et al., 1995; Noble et al., 1996; Zeitoun & Bulun, 1999; Neme et al., 2001; Attia et al., 2001; Bulun et al., 2002). Uma vez que a endometriose é considerada uma doença estrogênio-dependente, a expressão da enzima aromatase torna-se essencial para a etiopatogenia da doença. O estrógeno é um mitógeno para os tecidos mullerianos (Bulun et al., 2002) e a possível ação autócrina deste hormônio, ou seja, sua ação local sobre o endométrio de mulheres com endometriose pode ser um facilitador para a implantação e desenvolvimento de implantes na cavidade peritoneal. (Noble et al., 1996; Fang et al., 2002) Foram detectados níveis estrogênicos significativamente aumentados no sangue menstrual de mulheres com endometriose (Neme et al., 2001). Além disso, níveis muito elevados da aromatase em implantes endometrióticos e endometriomas por meio de PCR (*polymerase chain reaction*) (Noble et al., 1996; Kitawaki et al., 2002) e RNAm da aromatase foi detectado em endométrio eutópico de mulheres com endometriose porém não naquelas sem a doença (Bulun et al., 1995). Porém, a quantidade de aromatase encontrada no endométrio tópico de mulheres com endometriose foi menor do que nos implantes peritoneais; a hipótese é que este endométrio defectivo, quando reflui para a cavidade peritoneal, causa uma reação inflamatória que aumenta exponencialmente a expressão da aromatase, já que a prostaglandina E2 é o mais potente

estimulador desta enzima. Desta forma, se estabelece um ciclo vicioso de produção de estradiol e prostaglandinas que facilita a formação dos implantes endometrióticos e perpetua este mecanismo fisiopatológico que favorece as características proliferativas e inflamatórias da endometriose (Zeitoun & Bulun, 1999; Bulun et al., 2002) (Figura 3). A proteína sSTAR (*steroidogenic acute regulatory protein*) também encontra-se alterada nos tecidos endometrióticos e também sofre estímulo das prostaglandinas (Sun et al., 2003).

Além disso, acredita-se numa resistência à ação da progesterona na endometriose (Zeitoun & Bulun, 1999; Bulun et al., 2002). A progesterona estimula a ação da enzima denominada 17beta-hidróxi-esteróide-desidrogenase tipo 2, que faz a inativação do estradiol para estrona. A expressão desta enzima apresenta-se deficiente nas células endometrióticas glandulares, portanto, o efeito protetor da progesterona é reduzido na endometriose. (Bulun et al., 2002) (Figura 3). Attia et al. (2001) relataram alterações na expressão das isoformas de receptores de progesterona na endometriose: não foi detectada a expressão da isoforma B do receptor de progesterona no tecido endometriótico, responsável por mediar a ação progesterônica nos tecidos-alvo; a isoforma A, cuja função é ser repressora da forma B, apresentou-se expressa na endometriose.

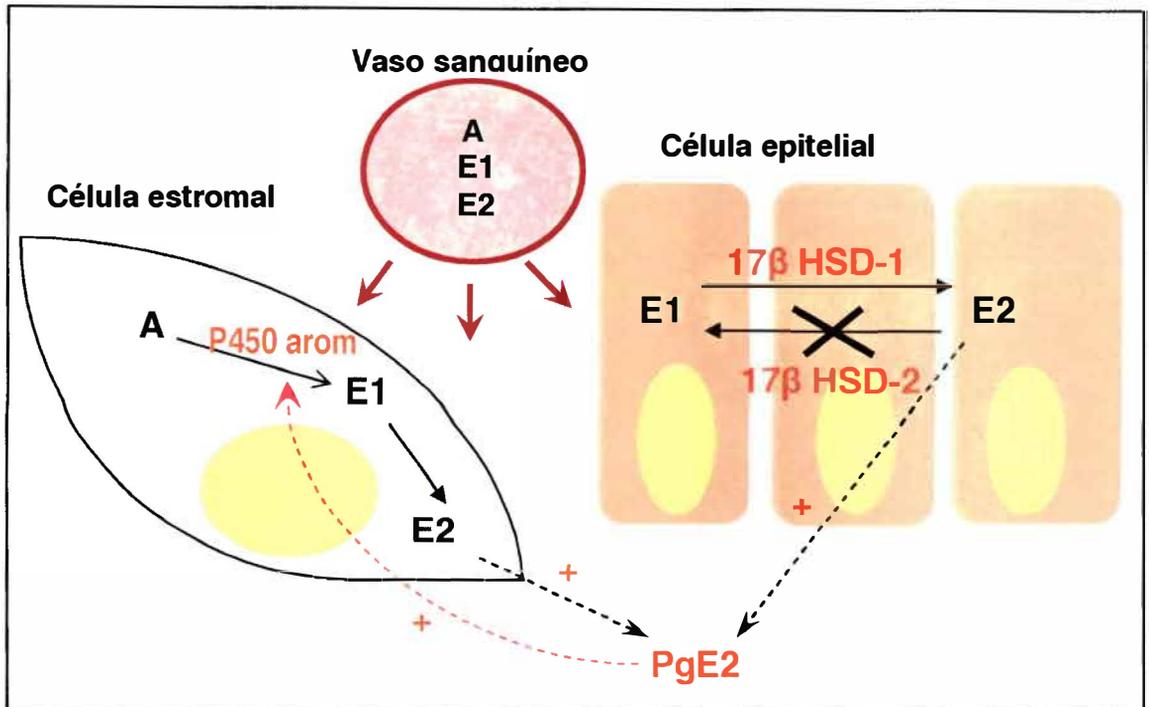


Figura 3 - Inativação defectiva de estradiol na endometriose. Os estrógenos estradiol (E2) e estrona (E1) e a androstenediona (A) chegam às lesões endometrióticas através da corrente sanguínea, a aromatase (P450 arom) na célula estromal endometriótica catalisa a transformação de androstenediona (A) para estrona (E1), que, por sua vez, é convertida à E2 pela ação da enzima 17 beta hidroxisteroidesdesidrogenase tipo1 (17βHSD-1). O E2 normalmente é inativado para E1 através da enzima 17 betadesidrogenasetipo2 (17βHSD-2) na célula epitelial glandular do endométrio tópico na fase secretória. Na célula endometriótica, no entanto, a 17βHSD-2 apresenta-se defeituosa, mantendo E2 em elevados níveis locais. E2 promove crescimento do tecido endometriótico e produção de prostaglandinas (PGE2) que, por sua vez, estimula a aromatase, completando um ciclo de feedback positivo de E2 e PGE2. (Adaptado de Zeitoun & Bulun, 1999)

Em suma, o envolvimento da aromatase com a endometriose se explica da seguinte maneira: em primeiro lugar, a endometriose é uma doença do menacme, portanto, sua etiopatogenia possivelmente se relaciona com a esteroidogênese (Zeitoun & Bulun, 1999; Neme et al., 2001; Bulun et al., 2002) e a aromatase está diretamente envolvida neste processo. Em segundo lugar, alterações da aromatase na endometriose já foram relatadas: níveis muito elevados da aromatase foram encontrados em implantes endometrióticos e em endometriomas (Noble et al., 1996) e também foi detectado RNAm da aromatase em endométrio eutópico de pacientes com endometriose mas não em mulheres sem a doença (Bulun et al., 1995).

Ora, se existe funcionamento aberrante da aromatase em implantes endometrióticos ou endométrio tópico de pacientes com endometriose, por que não ocorreria o mesmo dentro da célula da granulosa com comprometimento da foliculogênese e qualidade oocitária, com conseqüências sobre a fertilidade?

Harlow e cols. (1996) pesquisaram a atividade da aromatase em pacientes com endometriose de graus leve e mínimo através de cultura de células da granulosa na qual avaliaram a produção de estrógeno frente à adição de testosterona ao meio de cultura. Encontraram redução da atividade da aromatase nas pacientes com endometriose em comparação ao controle. A escassez de outros estudos similares, bem como o uso de outros métodos mais específicos para tal avaliação, estimulou a proposta deste estudo.

Se se considerar a associação infertilidade-endometriose, esta é inequívoca, entretanto, os mecanismos envolvidos ainda permanecem não totalmente esclarecidos. Quando há defeito anatômico pélvico não existe dúvida quanto à sua relação com infertilidade, porém, quando isto não ocorre, encontra-se dificuldade para explicá-la (Schenken, 1996; Speroff et al., 1999; Ferriani et al., 2000). Neste caso, os mecanismos propostos compreendem: (1) alterações no microambiente folicular ou no oócito (Schenken, 1996; Speroff et al., 1999; Ferriani et al., 2000; Pellicer et al., 1998); (2) falência na implantação (Ferriani et al., 2000); (3) disfunção ovulatória (Speroff et al., 1999; Ferriani et al., 2000); (4) defeitos imunológicos inclusive relacionados a processo auto-imune (Lucena & Cubillos, 1999); (5) hiperativação dos macrófagos peritoneais (Pellicer et al., 1998; Wu & Ho, 2003); (6) alterações nas citocinas no fluido folicular e sistemicamente particularmente da interleucina 6 (Oliveira, 2002; Pellicer et al., 1998; Witz, 2000; Wu & Ho, 2003); (7) síndrome do folículo luteinizado não roto (Moura et al., 1999; Speroff et al., 1999; Ferriani et al., 2000); (8) alterações no desenvolvimento embrionário precoce (Moura et al., 1999); (9) apoptose celular aumentada em células da granulosa (Toya et al., 2002); além de (10) alterações endócrinas como fase lútea inadequada e hiperprolactinemia (Gomes, 2002; Moura et al., 1999; Ferriani et al., 2000).

A Fertilização in Vitro (FIV) tem se tornado o método de escolha para tratamento da infertilidade associada à endometriose (Neme et al., 2001). Numerosos estudos foram realizados para avaliar se a endometriose afeta os resultados da FIV e seus achados foram controversos (Rinesi et al., 2002). Entretanto, Barnhart e cols (2002) realizaram uma metanálise de 22 estudos sobre o assunto e verificaram que todos os parâmetros encontravam-se

alterados nas pacientes com endometriose quando comparadas àquelas com outras causas de infertilidade, com redução na taxa de fertilização, número de oócitos captados, taxas de implantação e gestação.

Considerando-se as evidências de que o principal fator alterado nas pacientes inférteis com endometriose e submetidas à FIV seja a qualidade oocitária (Pellicer et al., 1998; Barnhart et al., 2002; Diaz et al., 2000) em detrimento de outros fatores como a receptividade endometrial (Diaz et al., 2000); o estudo da atividade da aromatase nas células da granulosa visa a um esclarecimento dos mecanismos responsáveis por este comprometimento oocitário, bem como busca um possível alvo terapêutico.

2. Objetivo

O objetivo deste trabalho é:

- ✓ Medir a atividade da enzima aromatase nas células da granulosa em cultivo *in vitro* de mulheres com endometriose em comparação àquelas sem endometriose submetidas a técnicas de reprodução assistida (FIV ou ICSI).

A hipótese a ser validada é que:

- ✓ Mulheres com endometriose apresentam redução da atividade da aromatase nas células da granulosa *in vitro*.

3. Pacientes e Métodos

3.1. Delineamento do estudo – estudo caso-controle.

3.2. Amostra – 08 pacientes para cada grupo.

3.3. Local de realização do estudo: Serviço de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

3.4. Comitê de Ética em Pesquisa: o presente estudo foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) de acordo com o parecer número 1492/2004. Cada paciente assinou um termo de consentimento antes da realização do procedimento de reprodução assistida e da realização da pesquisa, após os devidos esclarecimentos (vide Anexos).

3.5. Seleção de Pacientes

Foram selecionadas 16 pacientes inférteis com indicação para FIV ou ICSI, com um total 08 para cada grupo (com e sem endometriose). Os critérios para seleção de pacientes de ambos os grupos estão descritos abaixo:

3.5.1. Critérios de inclusão para os dois grupos: estar cadastrada no Programa de Reprodução Assistida do Setor de Reprodução Humana do Departamento de Tocoginecologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; ter idade inferior a 40 anos, apresentar ciclos menstruais regulares e dosagens de LH e FSH (3º dia do ciclo) normais para o menacme.

3.5.2. Critérios de inclusão para o grupo-estudo: presença de endometriose em qualquer estágio de acordo com a classificação da Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva diagnosticada por laparoscopia prévia realizada até 6 meses antes do estudo.

3.5.3. Critérios de exclusão para o grupo-estudo: idade acima de 40 anos, presença de outros fatores de infertilidade ou patologias endócrinas associadas à endometriose.

3.5.4. Critérios de inclusão para o grupo-controle: ausência de endometriose confirmada por laparoscopia prévia há no máximo 6 meses, ausência de doenças endócrinas associadas.

3.5.5. Critérios de exclusão para o grupo-controle: idade acima de 40 anos, presença de outras doenças endócrinas associadas.

3.6. Protocolo de Hiperestimulação Ovariana Controlada

Inicialmente, realizou-se a programação do período menstrual através de uso de anticoncepcionais orais combinados no ciclo prévio àquele da indução da ovulação. Do 1º-3º dia do ciclo de estimulação ovariana, foi realizada uma ultrassonografia (USG) transvaginal para excluir cistos ovarianos e então iniciada a estimulação ovariana controlada com gonadotrofinas: hMG (Menogon®, Ferring, Brasil; Pergonal®, Serono, Brasil) ou FSH recombinante (Puregon®, Organon, Brasil; Gonal-F®, Serono, Brasil) nos primeiros 5 dias na dose de 200 a 450 UI/dia e a partir do 6º dia a dose da gonadotrofina foi ajustada de acordo com o crescimento folicular monitorizado por USG. Quando houve pelo menos 2 folículos com 17 mm de diâmetro, foi administrado hCG intramuscular (Profasi®, Serono, Brasil) 10.000 UI ou hCG recombinante 250µg via subcutânea (Ovidrel®, Serono, Brasil) e após 34 a 36 horas, realizada a captação de oócitos. Para dessensibilização hipofisária, foi utilizado o agonista do GnRH, acetato de leuprolide (Lupron®, Abbott; Reliser®, Serono, Brasil), 10 UI/dia via subcutânea ou nafarelina via nasal 400 µg/dia (Synarel®, Pharmacia, Brasil) conforme protocolo longo, ou seja, iniciado na fase lútea do ciclo prévio ou sete dias antes da menstruação programada (Ferriani et al., 2004). A suplementação lútea foi iniciada a partir do dia da captação oocitária e, no caso de gravidez, até a 12ª semana de gestação (Figura 4); as progesteronas utilizadas foram: diidrogesterona 30 mg/dia (Duphaston®, Solvay; Brasil) ou a progesterona gel uma aplicação diária (Crinone 8%; Serono; Brasil).

3.7. Captação de Oócitos

A captação oocitária foi realizada sob anestesia geral tipo sedação com uso de propofol (Diprivan®, Astra Zeneca, Brasil) associado ao fentanil (Fentanil®, Janssen Cilag, Brasil), administrados por via endovenosa. O procedimento foi feito via vaginal através de punção de fundo de saco e guiado por ultrassonografia. O conteúdo de cada folículo foi aspirado em tubos de Falcon sob pressão de 120-130 mmHg e mantido a 37° e os oócitos manuseados e separados do restante do fluido folicular em capela de fluxo de ar laminar para depois serem mantidos em meio de cultura em incubadora com temperatura controlada a 37°C e concentração de CO2 de 5% .

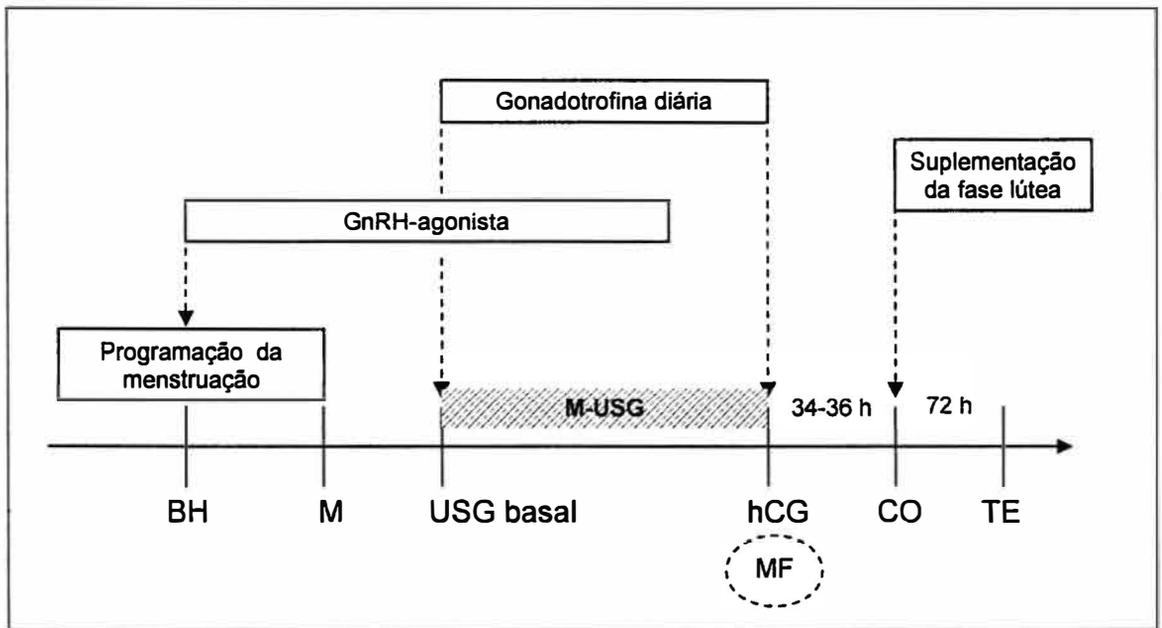


Figura 4 – Esquema de hiperestimulação ovariana controlada para FIV ou ICSI conforme protocolo longo. (BH = Bolqueio hipofisário; M = menstruação; USG = ultrassonografia basal; M-USG = monitorização ultrassonográfica; MF = maturidade folicular; CO = captação oocitária; TE = transferência embrionária). (Adaptado de Ferriani et al., 2004).

3.8. Cultivo de Células da Granulosa

Para o cultivo das células da granulosa foi usada a técnica do Instituto Valenciano de Infertilidade da Universidade de Medicina de Valencia, Espanha (Pellicer e cols., 1998), com algumas modificações (Silva, 1997) descritas abaixo:

Colunas de Percoll: para preparação das colunas de Percoll foram adicionados 9 ml de Percoll® (Pharmacia, Upsala, Suécia) a 1 ml de Meio-199 (Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil), e a estes 10 ml foram adicionados 10 ml de meio de lavado (HAM-F10® com 20% de Soro Fetal Bovino (SFB)®, ambos da Cultilab, Campinas, Brasil). Alíquotas de 5 ml foram distribuídas em quatro tubos, mantidos sob refrigeração a 4° C. (Tabela 1)

Meio de Cultivo: foi usado o Meio-199 com 20% de Soro Fetal Bovino (SFB®) e L-Glutamina 2 mM (Sigma®, Estados Unidos). A preparação do meio de cultivo foi realizada sob fluxo laminar utilizando-se material estéril. O Meio-199 é constituído por uma combinação de vitaminas, aminoácidos, sais inorgânicos e outros componentes como fonte nutritiva definida para cultura celular. O Soro Fetal Bovino, por sua vez, é composto por inúmeras substâncias ainda pouco definidas, porém é necessária sua adição para culturas celulares prolongadas (Fernandes; 2004). Foram adicionados 2 antibióticos ao meio de cultivo com objetivo de evitar contaminação bacteriana: (1) Penicilina Cristalina (Cristalpen®, Biolab, Brasil) na concentração de 100.000 UI/ml e sulfato de estreptomicina (Estreptomicina®, FURP, Brasil) na concentração de 20 mg/ml (Tabela 1).

Tabela 1 – Preparo dos meios para cultivo de células da granulosa.

Meio de Lavado	40 ml
HAM F10	32 ml
SFB 20%	8 ml
Colunas de Percoll	20 ml
Percoll	9 ml
Meio 199	1 ml
Meio de lavado	10 ml
Meio de Cultivo	10 ml
Meio 199	8 ml
SFB 20%	2 ml
Estreptomicina	50 µl
Penicilina	10 µl
L-glutamina	2,92 mg
Antibióticos	
Estreptomicina	1 g
H ₂ O destilada	50 ml
Penicilina cristalina	5.000.000 UI
H ₂ O destilada	50 ml

3.8.1. Procedimento do Cultivo Celular:

Isolamento das Células da Granulosa: Os grumos de células da granulosa, presentes no fluido folicular ou no lavado do aspirado folicular, foram captados com pipeta Pasteur sob visualização em microscópio invertido (Coleman® ST-302L, Brasil), após a espera de que o sangue aspirado se depositasse no fundo das placas de Petri, onde foram vertidos o fluido folicular e o meio de lavado após o isolamento dos oócitos. Os grumos celulares captados, então, foram transferidos para outra placa contendo meio de lavado (HAM F10® e SFB®) onde, novamente, foi aguardado o tempo necessário para que as células sanguíneas se depositassem no fundo da placa de Petri. A seguir, o conteúdo desta placa foi transferido, com pipeta Pasteur, para o tubo de Falcon e centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos a 4°C (centrífuga Spin VI®, Incibrás, Brasil). O sobrenadante foi, então, retirado e foram adicionados 2 ml de meio de lavado ao *pellet*, misturando-se bem com pipeta Pasteur, para que as células se separassem. Este conteúdo, então, foi transferido delicadamente sobre as colunas de Percoll preparadas previamente, e centrifugado a 500 rpm por 30 minutos a 4°C. As células da granulosa ficaram na interface da coluna de Percoll, e foram captadas com pipeta Pasteur e, após, transferidas para outro tubo de Falcon estéril no qual foi adicionado 4 ml de meio de lavado para posterior centrifugação por 10 minutos a 1500 rpm a 4°C. Por fim, deste conteúdo, foi desprezado o sobrenadante e o precipitado foi dissolvido em 1 ml de meio de cultivo, para posterior contagem da viabilidade das células da granulosa.

Contagem e Viabilidade das Células da Granulosa: 50 μ l da suspensão celular anterior foram colocados em tubo de hemólise e adicionados 450 μ l de Azul de Trypan (Trypanblau®, Merck, Alemanha) a 0,4% na diluição 1:10. A seguir, este conteúdo foi colocado em uma câmara de Neubauer para contagem do número de células viáveis. Para calcular o número total, multiplicou-se o número de células vivas contadas por 10^4 e pelo fator de diluição dez. As células mortas mostraram-se coradas pelo Azul de Trypan e as células vivas ficaram brancas com aspecto refringente à visualização no microscópio óptico (Coleman® N107, Brasil). Da suspensão celular obtida, após cálculo do número total das células vivas, calculou-se a concentração das células por placa de maneira que se tivesse uma concentração de 50.000 células por placa de cultivo. Para a realização de todos os experimentos (6 experimentos em triplicata), era necessária uma concentração total de, no mínimo, 900.000 células viáveis.

Cultivo Celular: as células foram cultivadas em placas de cultivo celular 35 x 10 mm. Assim, foram colocadas 50.000 células da granulosa viáveis por placa de cultivo, e foi adicionado meio de cultivo de forma a completar um volume total de 1 ml por placa de cultivo. O ensaio foi realizado em triplicata. Os cultivos celulares foram mantidos em estufa com atmosfera gasosa a 5% de CO₂ e em temperatura de 37°C por um tempo de 24 horas. Após esse período, os meios de cultivo foram aspirados e estocados a -20°C para posterior análise.

Captar os grumos de céls com pipeta de Pasteur

Transferir p/ placa contendo meio de lavado

Transferir p/ tubo cônico

Centrifugar

10 min
1500 rpm

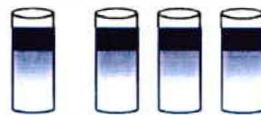


Retirar o sobrenadante

Dissolver o precipitado em 2 ml de meio de lavado

Colocar sobre a coluna de Percoll

Centrifugar



30 min
500 rpm

Captar as CG na interface da coluna de Percoll

Transferir para tubo cônico contendo 4 ml de meio de lavado

Centrifugar



10 min
1500 rpm

Desprezar o sobrenadante

Dissolver o precipitado em 1 ml de meio de cultivo

Contagem das células na Câmara de Neubauer



Figura 5 – Esquema do procedimento de cultivo de células da granulosa (Fernandes, 2004).

3.9. Atividade da Aromatase

A atividade da enzima aromatase nas células da granulosa em cultivo celular *in vitro* foi medida através da produção de estradiol frente à adição de testosterona (substrato da aromatase) ao meio de cultivo. A testosterona® (Sigma, Estados Unidos) foi adicionada ao meio de cultivo nas concentrações finais de 2×10^{-6} M e a 2×10^{-5} M. O tempo de incubação foi de 24 horas em estufa com atmosfera gasosa a 5% de CO₂ e em temperatura de 37°C e, posteriormente, foi dosado o estradiol produzido, através de radioimunoensaio (DPC Medlab, EUA). Para controle, foi avaliada a produção de estradiol quando não foi adicionada testosterona ao meio de cultivo. Este método foi aplicado para os dois grupos (com e sem endometriose).

3.10. Experimentos realizados

Para cada paciente selecionada (tanto no grupo com endometriose como no grupo controle), foram realizados 6 experimentos diferentes, em triplicata, com adição reagentes específicos a cada um deles.

Os reagentes utilizados foram: testosterona (Sigma, Estados Unidos); FSH (*Recombinant human FSH for BIO studies*, Serono, Estados Unidos) e IGF-1 (*Human IGF-1 for BIO studies*, Serono, Estados Unidos), ambos na concentração final de 50 ng/ml. A testosterona foi adicionada como substrato da enzima aromatase (Harlow et al., 1996); e os reagentes FSH e IGF-1 como estimuladores da ação da aromatase (Erickson et al., 1989; deMoura et al., 1997; Fernandes, 2004).

Experimento 1: somente células da granulosa;

Experimento 2: Células da granulosa + Testosterona (2×10^{-6} M);

Experimento 3: Células da granulosa Testosterona a (2×10^{-5} M);

Experimento 4: Células da granulosa + FSH e IGF-1 (50 ng/ml);

Experimento 5: Células da granulosa + Testosterona (2×10^{-6} M) + FSH e IGF-1(50 ng/ml);

Experimento 6: Células da granulosa + Testosterona (2×10^{-6} M) + FSH e IGF-1 (50 ng/ml).

3.11. Dosagens Hormonais

3.11.1. Estradiol

A determinação quantitativa do estradiol no fluido de cultivo celular foi realizada através de radioimunoensaio no laboratório de Ginecologia e Obstetrícia, Hospital das Clínicas, FMRP, Ribeirão Preto, São Paulo. Utilizou-se o kit *Double Antibody*, fase sólida, da DPC, USA, com sensibilidade de 1,4 pg/ml. A medida da radioatividade gama para o isótopo I^{125} foi realizada pelo aparelho Cobra II Auto-Gama®, Brasil. O erro intra-ensaio foi de 5,8%.

Houve amostras que necessitaram de diluição, que foram feitas utilizando-se o meio 199.

3.11.2. Progesterona

A determinação quantitativa de progesterona no fluido de cultivo celular foi realizada através de quimioluminescência no laboratório de Ginecologia e Obstetrícia, Hospital das Clínicas, FMRP, Ribeirão Preto, São Paulo; utilizando-se kit da DPC, USA e leitura no aparelho Immulite 2000®, também da DPC. A sensibilidade foi de 0,2 ng/ml e algumas amostras necessitaram de diluição realizada com meio 199. O erro intra-ensaio foi de 4,9%.

Para excluir a presença de estradiol, progesterona ou testosterona nos meios de cultivo que pudessem interferir nos resultados, foram realizadas as respectivas dosagens em seus componentes: 1)Meio 199®; 2)SFB® ; 3) HAM-F10®, todos indetectáveis através de radioimunoensaio (Fernandes, 2004; Silva, 1997).

3.12. Análise Estatística

Para a análise dos dados, primeiramente foi realizado o teste da normalidade para os dados referentes às dosagens de estradiol e progesterona nos fluidos de cultivo celular. Os dados apresentaram distribuição gaussiana verificados através do teste KS, porém as variâncias foram diferentes em alguns grupos analisados, dessa forma, foi usada a correção de Welch ou a normalização da variável para fins de análise estatística. Os resultados foram comparados entre os dois grupos (controle e endometriose) através do teste T não pareado. Para comparações dentro de um mesmo grupo (controle ou endometriose), foi realizado o teste T pareado.

O programa usado para realização dos cálculos estatísticos foi o GraphPad Prism® versão 3.0.

Considerou-se um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4. Resultados

4.1. Características clínicas das pacientes do estudo

A idade das pacientes variou de 28 a 37 anos de idade, e não houve diferença estatística quanto à idade entre os grupos controle e endometriose ($p=0,1450$) (Tabela 2 e 3). Do total de 16 pacientes, 14 eram nuligestas e 04 já haviam engravidado previamente, 02 do grupo com endometriose tiveram um aborto de primeiro trimestre e 02 pacientes do grupo controle tiveram filhos (uma delas teve uma cesárea prévia e outra, 03 partos vaginais).

Quanto ao tempo de infertilidade, 13 do total de 16 pacientes tinham um tempo de infertilidade superior a quatro anos, somente 03 pacientes tinham tempo inferior a 4 anos (uma delas com 1 ano e outra com 02 anos de infertilidade). Quatorze pacientes já tinham realizado tratamentos prévios de infertilidade e somente 2 delas ainda não tinham realizado nenhum tipo de tratamento. (Tabelas 2 e 3)

Do total de 08 pacientes do grupo controle, 05 delas tinham fator tubáreo (uma delas com laqueadura prévia e as outras com provável etiologia infecciosa) e 03 pacientes apresentavam fator masculino (uma delas com parceiro com oligospermia moderada e as outras 02 pacientes apresentavam parceiros com asteno e teratozoospermia). No grupo com endometriose, 03 pacientes apresentavam endometriose grau leve, 01 tinha grau mínimo, 03 delas grau moderado e 01 grau severo ou grave. (Tabelas 2 e 3)

Tabela 2 - Características clínicas das mulheres do grupo controle: idade, tempo de infertilidade, tratamentos de infertilidade prévios e causa da infertilidade. (DP = desvio-padrão).

PACIENTES No	TEMPO INFERTILIDADE (ANOS)	IDADE (ANOS)	TRATAMENTOS PRÉVIOS DE INFERTILIDADE	CAUSA DA INFERTILIDADE
01	10	32	CC + IUI (1)	Fator masculino
02	05	33	FIV + ICSI(7)	Fator masculino
03	05	28	-	Fator masculino
04	02	33	FIV (1)	Fator tubáreo
05	>4	32	FIV (1)	Fator tubáreo
06	11	37	-	Fator tubáreo
07	>4	35	CC	Fator tubáreo
08	05	34	FIV(1)	Fator tubáreo
Média ± DP	-	33 ± 2,62	-	-

Tabela 3 - Características clínicas das mulheres do grupo com endometriose: idade, tempo de infertilidade, tratamentos de infertilidade prévios, classificação da endometriose e antecedente familiar de endometriose. (DP = desvio-padrão).

PACIENTES No	TEMPO INFERTILIDADE (ANOS)	IDADE (ANOS)	TRATAMENTOS PRÉVIOS DE INFERTILIDADE	CLASSIFICAÇÃO DA ENDOMETRIOSE	ANTECEDENTE FAMILIAR DE ENDOMETRIOSE
01	6	30	CC	leve	Não
02	10	34	FIV(1) + TEC(1)	leve	não
03	11	32	CC	grave	Não
04	08	28	ICSI (1)	moderada	Sim (mãe)
05	01	29	ICSI (1)	moderada	Sim (irmã)
06	02	28	FIV(1) + ICSI(2)	moderada	Não
07	> 4	33	ICSI (1)	mínima	Não
08	04	34	IUI (2)	leve	Não
Média ± DP	-	31 ±2,56	-	-	-

Em relação ao protocolo de hiperestimulação ovariana, os dados estão representados abaixo (tabela 4):

Tabela 4 – Características da hiperestimulação ovariana controlada para FIV ou ICSI das pacientes do grupo com endometriose e controle, quanto à duração do bloqueio hipofisário; tipo da gonadotrofina usada (FSHr ou HMG), dias de indução e unidades totais de gonadotrofinas usadas. * variâncias estatisticamente diferentes.

PACIENTES Nº	TEMPO USO GNRHa (DIAS)	TIPO DE GONADOTRO FINA USADA	Nº DIAS DE INDUÇÃO	QUANTIDADE DE GONADOTRO FINA USADA
Controle				
01	21	FSHr	10	2200UI
02	33	FSHr	12	5250UI
03	21	FSHr	09	2250UI
04	22	FSHr	11	2050UI
05	20	FSHr	10	2850UI
06	20	FSHr	08	2400UI
07	20	FSHr	10	3000UI
08	30	FSHr	10	2000UI
Média ± SD	23,38 ± 5,12	-	10 ± 1,19	2750 ± 1072 *
Endometriose				
01	17	HMG	10	2150UI
02	21	FSHr	11	3300UI
03	20	FSHr	08	1800UI
04	21	FSHr	10	2250UI
05	19	FSHr	11	1700UI
06	19	FSHr	08	1600UI
07	19	FSHr	10	2000UI
08	22	FSHr	12	2400UI
Média ± SD	19,75 ± 1,58	-	10 ± 1,41	2150 ± 540,5*

Ainda em relação ao procedimento de hiperestimulação ovariana controlada, não houve diferença significativa quanto ao tempo do bloqueio hipofisário ($p = 0,0766$), dias de indução ($p = 1,0$) e quantidade de gonadotrofina usada ($p = 0,5760$). Das 16 pacientes do estudo, 13 delas utilizaram a nafarelina como agonista do GnRH para bloqueio hipofisário. Somente 03 pacientes utilizaram o acetato de leuprolide. Somente uma paciente com endometriose apresentou a síndrome de hiperestimulação ovariana grau leve.

As características da captação de oócitos e da transferência embrionária estão descritas na tabela 5. Não houve diferença estatística quanto ao número de folículos puncionados ($p = 0,7844$) e número de oócitos captados ($p = 0,6619$) entre os grupos controle e endometriose.

Tabela 5 – Características da captação de oócitos e transferência embrionária para FIV e ICSI nos grupo controle e endometriose.

PACIENTES Nº	Nº FOLÍCULOS PUNÇIONADOS	Nº OÓCITOS CAPTADOS	Nº EMBRIÕES TRANSFERIDOS
Controle			
01	22	14	02
02	05	02	02
03	20	13	03
04	14	09	03
05	16	09	01
06	13	07	01
07	28	16	03
08	25	09	03
Média ± SD	17,88 ± 7,4	9,875 ± 4,42	2,250 ± 0,89
Endometriose			
01	28	15	03
02	13	07	03
03	10	07	03
04	19	11	03
05	30	08	03
06	15	05	03
07	18	07	03
08	18	12	03
Média ± SD	18,88 ± 6,94	9,0 ± 3,34	3,0 ± 0,0

Do grupo com endometriose, 04 pacientes engravidaram: duas delas tiveram gestação gemelar e duas tiveram gestação única. Do grupo controle, 04 pacientes também apresentaram gravidez: uma delas apresentou aborto no primeiro trimestre de gestação; duas pacientes tiveram gestação única e uma gemelar.

4.2. Dosagens Hormonais nos Fluidos de Cultivos Celulares

4.2.1. Estradiol

Os valores das dosagens de estradiol (radioimunoensaio) realizadas nas pacientes do grupo com endometriose e grupo controle, em triplicata, apresentam-se descritas no apêndice 01. As dosagens em média estão na tabela 6 e 7.

A produção basal de estradiol nas células da granulosa, ou seja, sem a adição de nenhum reagente ao meio de cultivo, apresentou diferença entre os grupos controle e endometriose ($p = 0,0390$) (Gráfico 1). A adição de FSH e IGF-1 não acarretou aumento na produção de estradiol tanto no grupo controle ($p = 0,1228$) como no grupo com endometriose ($p = 0,6051$).

4.2.2. Atividade da aromatase

A atividade da aromatase nas células da granulosa *in vitro* foi avaliada através de adição de testosterona ao meio de cultivo (substrato da aromatase) com medida da produção de estradiol frente a esta adição (ver métodos). Neste estudo, foi adicionada a testosterona em duas concentrações ao meio de cultivo. Na concentração final de 2×10^{-6} M houve diferença na produção de estradiol comparando-se o grupo de mulheres com endometriose e controle ($p = 0,303$) (Gráfico 2). No entanto, a testosterona na concentração final de 2×10^{-5} M adicionada não apresentou diferença na produção de estradiol entre controle e endometriose ($p = 0,6759$; Gráfico 3). Além disso, a suplementação de IGF-1 e de FSH ao meio de cultivo juntamente à testosterona em ambas as concentrações não acarretou diferença significativa na produção de estradiol ($p = 0,8322$ quando testosterona a 2×10^{-6} M e $p = 0,8558$ com a concentração de testosterona de 2×10^{-5} M).

Tabela 6 - Valores em média das dosagens de estradiol em pg/ml de fluidos de cultivos de células da granulosa de mulheres sem endometriose (grupo controle) submetidas à reprodução assistida.

Pacientes Nº	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 5	Exp 6
01	269,84	1097,15	5920,43	257,25	710,00	6826,57
02	2267,4	2577,05	10700,38	1453,8	1752,1	7327,20
03	805,10	711,86	1853,17	1380,45	1138,5	2188,53
04	651,29	1071,08	1304,10	1153,03	1397,44	1561,30
05	184,56	370,16	1278,80	197,90	349,50	1490,20
06	143,05	689,45	1244,87	175,40	314,93	1242,03
07	417,96	467,28	1698,90	228,63	278,53	1576,97
08	165,06	332,33	808,56	176,06	306,33	1607,90
Média	613,03	914,54	3101,15	627,81	780,91	2977,58

Experimento 1: Células da granulosa;

Experimento 2: Células da granulosa + Testosterona a $2 \times 10^{-6}M$;

Experimento 3: Células da granulosa + Testosterona a $2 \times 10^{-5}M$;

Experimento 4: Células da granulosa + FSH (50 ng/ml) + IGF-1 (50 ng/ml);

Experimento 5: Células da granulosa + Testosterona a $2 \times 10^{-6}M$ + FSH (50 ng/ml) + IGF-1 (50 ng/ml);

Experimento 6: Células da granulosa + Testosterona a $2 \times 10^{-5}M$ + FSH (50 ng/ml) + IGF-1 (50 ng/ml).

Tabela 7 - Valores em média das dosagens de estradiol em pg/ml de fluidos de cultivos de células da granulosa de mulheres com endometriose submetidas à reprodução assistida.

Pacientes Nº	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 5	Exp 6
01	111,20	120,66	141,66	160,00	120,33	144,53
02	7,43	7,11	7,79	7,69	7,30	9,70
03	436,66	383,00	273,00	402,00	541,00	505,33
04	311,66	262,66	230,00	469,33	300,66	223,50
05	214,50	161,66	165,83	152,00	352,50	646,00
06	170,16	189,26	110,93	213,33	226,50	143,50
07	301,33	192,66	247,00	270,66	330,33	408,33
08	717,25	562,16	253,50	643,33	448,50	382,00
Média	283,77	234,90	178,71	289,79	290,89	307,86

Experimento 1: Células da granulosa;

Experimento 2: Células da granulosa + Testosterona a $2 \times 10^{-6}M$;

Experimento 3: Células da granulosa + Testosterona a $2 \times 10^{-5}M$;

Experimento 4: Células da granulosa + FSH (50 ng/ml) + IGF-1 (50 ng/ml);

Experimento 5: Células da granulosa + Testosterona a $2 \times 10^{-6}M$ + FSH (50 ng/ml) + IGF-1 (50 ng/ml);

Experimento 6: Células da granulosa + Testosterona a $2 \times 10^{-5}M$ + FSH (50 ng/ml) + IGF-1 (50 ng/ml).

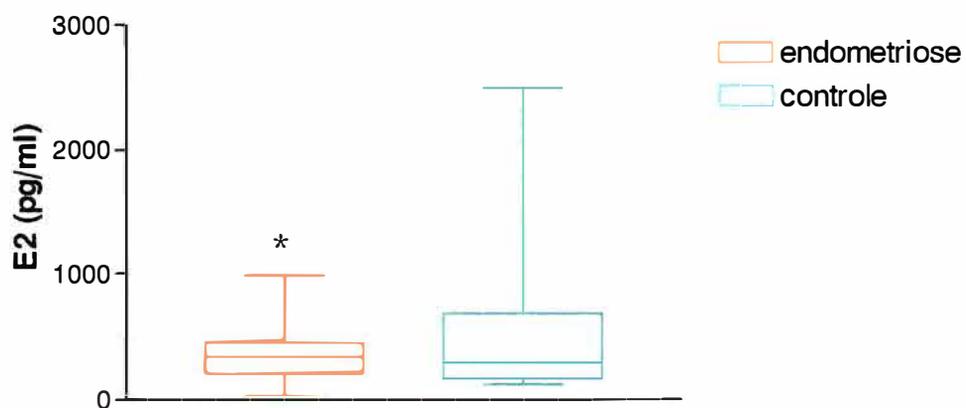


Gráfico 1 - Níveis de E2 (pg/ml) em fluido de cultivo de células da granulosa do grupo de mulheres com endometriose e controle, em condições basais. * $p < 0,05$

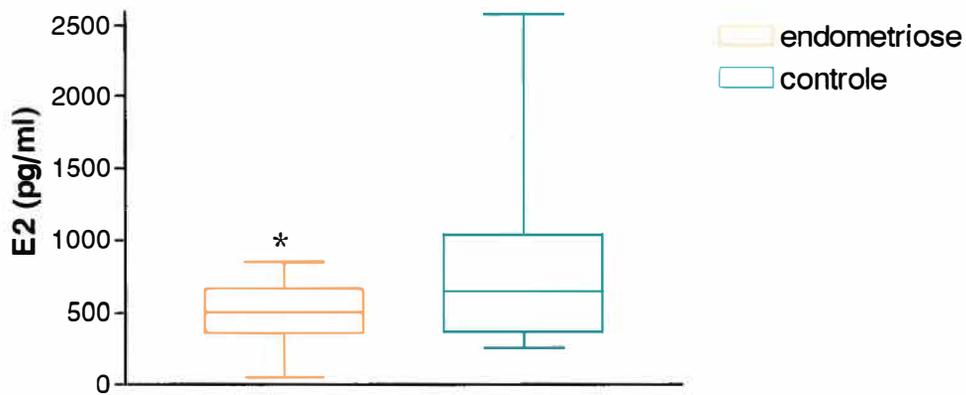


Gráfico 2 - Atividade da aromatase expressa em níveis de E2 em pg/ml produzidos em resposta à adição de testosterona na concentração final de 2×10^{-6} M em cultivo de células da granulosa do grupo de mulheres com endometriose e controle.

* $p < 0,05$

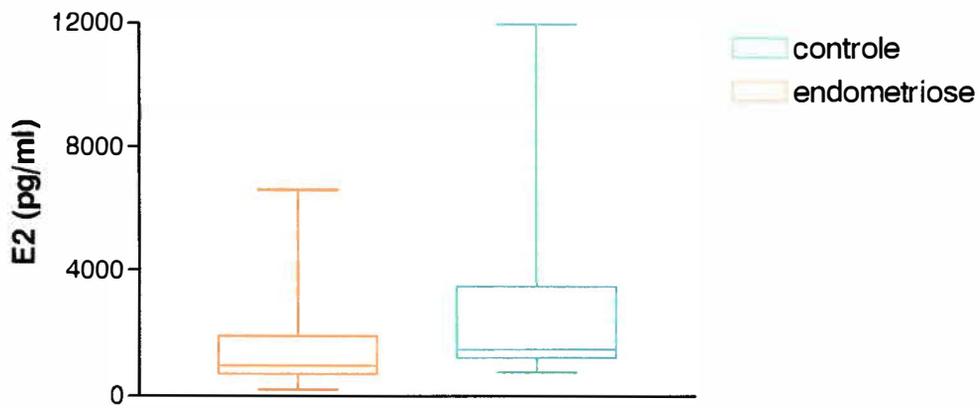


Gráfico 3 - Atividade da aromatase expressa em níveis de E2 (estradiol) em pg/ml produzidos em resposta à adição de testosterona na concentração final de 2×10^{-5} M em cultivo de células da granulosa do grupo de mulheres com endometriose e controle.

4.2.3. Progesterona

Os valores das dosagens de progesterona nos fluidos de cultivos celulares da granulosa de mulheres com endometriose e controle, submetidas à FIV ou ICSI, encontram-se descritas no apêndice 02 (triplicata). Os valores expressos em média estão contidos nas tabelas 8 e 9.

Não foi observada nenhuma diferença na produção de progesterona pelas células da granulosa de mulheres com endometriose e pacientes do grupo controle em condições basais, ou seja, sem adição de nenhum reagente ao meio de cultivo ($p = 0,8830$); ou com adição de testosterona a $2 \times 10^{-6} \text{M}$ ($p = 0,6933$) ou a $2 \times 10^{-5} \text{M}$ ($p = 0,1603$) (Figura 6). Ainda, também não houve diferença nos níveis de progesterona quando foi adicionado IGF-1 ou FSH ao meio de cultivo sozinho ($p = 0,1306$) ou associados à testosterona ($p = 0,6795$ quando à $2 \times 10^{-6} \text{M}$ e $p = 0,5790$ com a concentração de $2 \times 10^{-5} \text{M}$).

Tabela 8 – Valores em média das dosagens de progesterona em ng/ml de fluidos de cultivos de células da granulosa de mulheres sem endometriose (grupo controle) submetidas à reprodução assistida.

Pacientes Nº	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 5	Exp 6
01	182,66	178,33	93,53	145,53	122,10	135,56
02	349,33	256,50	312,16	247,00	303,33	365,33
03	198,33	170,00	236,33	341,00	336,66	338,00
04	391,00	463,33	417,66	489,00	500,00	588,66
05	213,33	235,33	195,33	289,33	272,66	234,66
06	38,47	70,60	42,26	41,3	41,96	28,70
07	210,00	153,50	176,00	141,86	80,26	138,00
08	414,33	406,00	323,00	331,00	355,66	378,66
Média	249,68	241,70	224,53	253,25	251,58	275,95

Experimento 1: Células da granulosa;

Experimento 2: Células da granulosa + Testosterona a $2 \times 10^{-6}M$;

Experimento 3: Células da granulosa + Testosterona a $2 \times 10^{-5}M$;

Experimento 4: Células da granulosa + FSH (50 ng/ml) + IGF-1 (50 ng/ml);

Experimento 5: Células da granulosa + Testosterona a $2 \times 10^{-6}M$ + FSH (50 ng/ml) + IGF-1 (50 ng/ml);

Experimento 6: Células da granulosa + Testosterona a $2 \times 10^{-5}M$ + FSH (50 ng/ml) + IGF-1 (50 ng/ml).

Tabela 9 – Valores em média das dosagens de progesterona em ng/ml de fluidos de cultivos de células da granulosa de mulheres com endometriose submetidas à reprodução assistida.

Pacientes Nº	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 5	Exp 6
01	111,20	120,66	141,66	160,00	120,33	144,53
02	7,43	7,11	7,79	7,69	7,30	9,70
03	436,66	383,00	273,00	402,00	541,00	505,33
04	311,66	262,66	230,00	469,33	300,66	223,50
05	214,50	161,66	165,83	152,00	352,50	646,00
06	170,16	189,26	110,93	213,33	226,50	143,50
07	301,33	192,66	247,00	270,66	330,33	408,33
08	717,25	562,16	253,50	643,33	448,50	382,00
Média	283,77	234,90	178,71	289,79	290,89	307,86

Experimento 1: Células da granulosa;

Experimento 2: Células da granulosa + Testosterona a $2 \times 10^{-6}M$;

Experimento 3: Células da granulosa + Testosterona a $2 \times 10^{-5}M$;

Experimento 4: Células da granulosa + FSH (50 ng/ml) + IGF-1 (50 ng/ml);

Experimento 5: Células da granulosa + Testosterona a $2 \times 10^{-6}M$ + FSH (50 ng/ml) + IGF-1 (50 ng/ml);

Experimento 6: Células da granulosa + Testosterona a $2 \times 10^{-5}M$ + FSH (50 ng/ml) + IGF-1 (50 ng/ml).

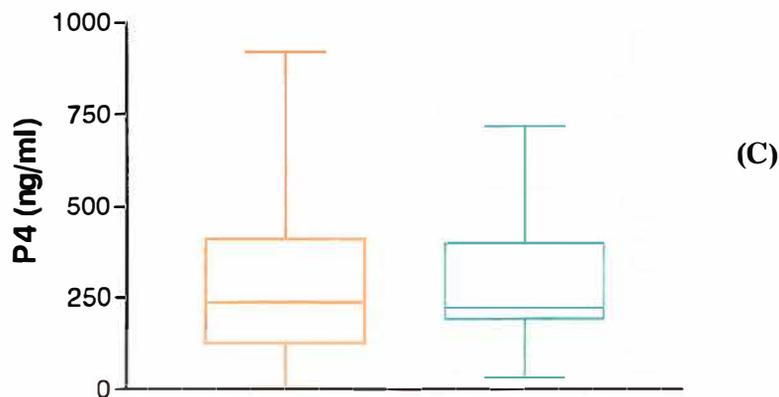
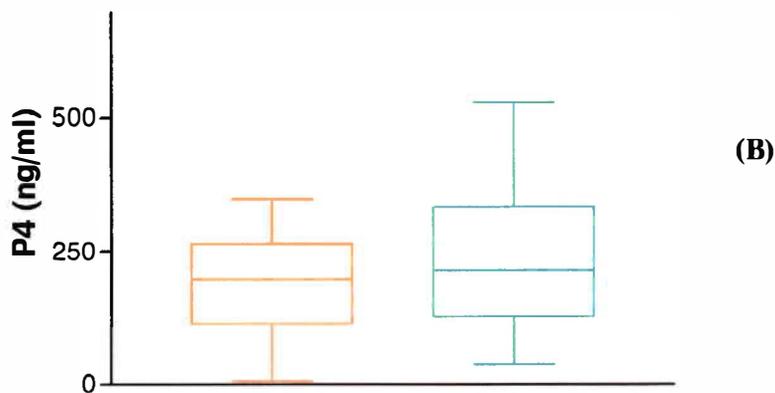
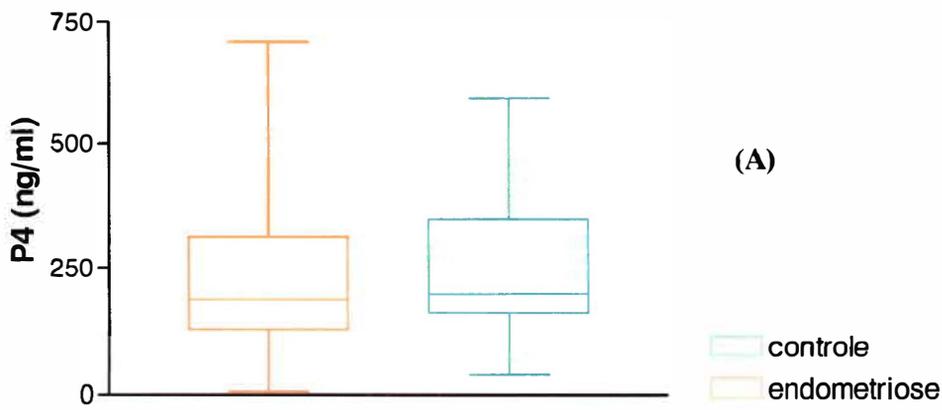


Figura 6 - Níveis de P4 (ng/ml) produzidos em condições basais (gráfico A); em resposta à adição de testosterona na concentração final de 2×10^{-6} M (gráfico B) e 2×10^{-5} M (gráfico C) em cultivo de células da granulosa do grupo de mulheres com endometriose e controle.

Discussão

Aromatase é uma enzima que se tornou alvo de crescente interesse em reprodução humana. Primeiramente porque representa uma enzima “chave” no processo de foliculogênese com envolvimento direto com a qualidade oocitária (Guet et al., 1999); em segundo lugar, seu envolvimento na etiopatogenia da endometriose vem sendo extensivamente estudado com evidências importantes de alterações em sua expressão nos tecidos endometrióticos, bem como no endométrio tóxico de mulheres com endometriose (Bulun et al., 2002), além de possível defeito genético envolvendo polimorfismos do seu gene associados com a endometriose (Arvanitis et al., 2003). E, em terceiro lugar, o impacto que representa esta enzima sobre o tratamento da infertilidade e endometriose com o advento de drogas denominadas inibidoras da aromatase (Neme et al., 2001; Karaer et al., 2004).

Estas drogas inibidoras da enzima aromatase têm apresentado resultados favoráveis como indutores de ovulação. O mecanismo de ação se baseia no fato de que esta droga levaria ao bloqueio do estradiol no início do ciclo menstrual, reduzindo o “feedback” central, com elevação dos níveis de gonadotrofinas (Mitwally & Casper; 2002). Ainda, com o bloqueio da conversão de andrógenos a estrógenos no ovário, os andrógenos acumulados na fase inicial de desenvolvimento folicular parecem ter um efeito estimulatório sobre a ação do FSH, aumentando a expressão de seus receptores (Mitwally & Casper, 2002; 2004). Neste sentido, os inibidores da aromatase podem substituir o uso do clomifeno no futuro, com as vantagens de não apresentar os efeitos anti-estrogênicos deste. Contudo, os estudos ainda apresentam casuísticas

limitadas, com estudos não randomizados nem placebo-controlados (Mitwally & Casper, 2002).

Em adição, o acúmulo de andrógenos no folículo na fase inicial do ciclo menstrual também pode estimular o IGF-1, agindo em sinergismo com o FSH no processo de foliculogênese (Mitwally & Casper, 2002; 2004). Com isso, encontra-se uma possível associação entre aromatase, sistema IGF-1 e FSH; todos agindo de maneira parácrina no folículo. A alteração deste sinergismo com a expressão aberrante da aromatase como provavelmente acontece na endometriose, pode comprometer a foliculogênese e produzir oócitos de má qualidade (Harlow et al., 1996). De fato, neste estudo observou-se a produção basal de estradiol reduzida na endometriose em relação ao controle, na progesterona, entretanto, não houve diferença.

No presente estudo, encontrou-se redução da atividade da aromatase nas mulheres com endometriose em comparação àquelas do grupo controle. Porém, esta diferença foi encontrada somente quando a concentração de testosterona adicionada ao meio de cultivo foi de $2 \times 10^{-6}M$, achado concordante com o estudo de Harlow et al. (1996). Na maior concentração utilizada neste estudo, de $2 \times 10^{-5}M$, não foi encontrada diferença entre os dois grupos, apesar de os valores de produção de estradiol (pg/ml) em média apresentarem-se superiores no grupo controle em relação ao grupo com endometriose. Poderá existir algum mecanismo intrínseco enzimático de regulação da atividade da enzima, como a própria saturação de seus receptores, que impeça que mesmo adições crescentes de substrato, neste caso a testosterona, não acarrete aumento da atividade da aromatase como esperado.

Quanto à suplementação de FSH e IGF-1 ao meio de cultivo, há a descrição de seus efeitos estimulatórios sobre a aromatase (Erickson et al., 1989; Fernandes, 2004). No presente estudo não encontramos qualquer diferença quanto à atividade da aromatase quando foram adicionados os reagentes FSH e IGF-1 ao meio de cultivo. Uma das hipóteses desse achado no grupo com endometriose seria o comprometimento, nesta doença, da responsividade das células da granulosa a agentes estimulatórios como o FSH e IGF-1 (Cahill et al., 2003). Outra hipótese seria a baixa densidade celular no meio de cultivo. Em nosso estudo utilizamos placas de 35 x 10 mm, com um volume total de 1 ml. DeMoura et al. (1997) relataram que a menor densidade celular pode afetar estímulos autócrinos ou parácrinos devido ao menor contato entre as células no cultivo na placa. Ainda, outro fator envolvido poderia ser o tempo de cultivo. DeMoura et al. (1997) encontraram uma correlação positiva do IGF-I (50ng/ml) e do FSH (20 ng/ml) em placas de cultivo contendo 2×10^6 células viáveis/placa num período de 72 h; no presente estudo utilizamos 50.000 células viáveis/placa e um tempo de cultivo de 24 horas. Esta redução no número de células/placa bem como no tempo de cultivo podem ter ocasionado interferência nos resultados encontrados, com discordância quanto aos dados da literatura sobre o papel sinérgico do IGF-I e FSH sobre a esteroidogênese ovariana. Fernandes (2004) também não encontrou qualquer efeito estimulatório do IGF-1 e FSH sobre a produção de estradiol e progesterona ovarianos *in vitro* através de cultivo celular da granulosa usando a mesma densidade de células do presente estudo (50.000 células viáveis/placa), com um tempo de cultivo de 48 horas.

Ainda em relação à aromatase e endometriose, essa enzima apresenta importância indiscutível na etiopatogenia da endometriose. E nesta doença, caracterizada por diversas interações moleculares em seu processo fisiopatológico, o tratamento clínico hormonal ainda não se apresenta satisfatório (Neme et al., 2001). Os inibidores de aromatase representam uma emergente modalidade terapêutica na endometriose, pois atuam diminuindo os níveis séricos de estrógenos com inibição do crescimento do tecido endometriótico e também atuam reduzindo a expressão do gene da aromatase (Neme et al., 2001)

Diante deste intenso envolvimento fisiopatológico entre aromatase e endometriose, espera-se que a expressão desta enzima possa ser implementada no processo de diagnóstico da endometriose, com o advento de técnicas sensíveis e específicas que possam identificar até mesmo estágios iniciais desta doença.

6. Conclusão

Observou-se no presente estudo a redução da atividade da aromatase nas células da granulosa *in vitro* em mulheres com endometriose comparadas às pacientes do grupo controle, submetidas à reprodução assistida (FIV e ICSI) quando houve adição de testosterona a 2×10^{-6} M. A produção basal de estradiol também foi menor no grupo com endometriose. A suplementação de FSH e IGF-1, entretanto, não mostrou quaisquer diferenças entre os grupos controle e endometriose.

7. Referências Bibliográficas

Arvanitis DA, Koumantakis GE, Goumenou AG, Matalliotakis IM, Koumantakis, EE, Spandidos DA. CYP1A1, CYP19, and GSTM1 polymorphisms increase the risk of endometriosis. *Fertil Steril* 2003; 79: 702-09.

Attia GR, Zeitoun K, Edwards D, Johns A, Carr BR, Bulun SE. Progesterone Receptor Isoform A but not B is Expressed in Endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:2897-902.

Barnhart K, Dunsmoor SU, Coutifaris C. Effect of Endometriosis on In Vitro Fertilization. *Fertil Steril* 2002; 77:1148-55.

Braun DP, Ding J, Shen J, Rana N, Fernandez BB, Dmowski WP. Relationship between apoptosis and the number of macrophages in eutopic endometrium from women with and without endometriosis. *Fert Steril* 2002; 78: 830-35.

Brosens IA, Brosens JJ. Redefining endometriosis: is deep endometriosis a progressive disease? *Hum Reprod* 2000; 15:1-13.

Bulun SE, Gurates B, Fang Z, Tamura M, Sebastian S, Zhou J, Amin S, Yang S. Mechanisms of Excessive Estrogen Formation in Endometriosis . *J Reprod Immunol* 2002; 55: 21- 33.

Bulun SE, Mahendroo MS, Simpson ER. Polymerase Chain Reaction

Amplification Fails to Detect Aromatase Cytocrome P450 Transcripts in Normal Human Endometrium or Decidua. *J Endocrinol Metabol* 1995; 76: 1458-63.

Cahill DJ, Harlow CR, Wardle PG. Pre-ovulatory Granulosa Cells of Infertile Women with Endometriosis are Less Sensitive to Luteizing Hormone. *AJRI* 2003; 49:66-69.

Cornillie FJ, Oosterlynck D, Lauweryns JM, Koninckx PR. Deeply infiltrating pelvic endometriosis: histology and clinical significance. *Fertil Steril* 1990; 53: 978-83.

deMoura MD, Choi D, Adashi EY, Payne DW. Insulin-like growth factor-I mediates amplification of follicle-stimulating hormone supported progesterone accumulation by cultured rat granulosa cells: enhancement of steroidogenic enzyme activity and expression. *Biol Reprod* 1997; 56: 946-53.

Diaz I, Navarro J, Blasco L, Simón C, Pellicer A, Remohi J. Impact of Stage III-IV Endometriosis on Recipients of Sibling Oocytes: Matched Case-control Study. *Fertil Steril* 2000; 74: 31-34.

Dmowski WP, Ding J, Shen J, Rana N, Fernandez BB, Braun DP. Apoptosis in endometrial glandular and stromal cells in women with or without endometriosis. *Hum Reprod* 2001; 16: 1802-08.

- Dunselman GA, Hendrix MG, Bouckaert PX, Evers JL. Functional aspects of peritoneal macrophages in endometriosis of women. *J Reprod Fertile* 1988; 82: 707-10.
- Erickson GF, Garzo VG, Magoffin DA. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) regulates aromatase activity in human granulosa and granulosa luteal cells. *J Endocrinol Metabol* 1989; 69:716-24.
- Fang Z, Yang S, Gurates B, Tamura M, Simpson E, Evans D, Bulun S. Genetic or Enzymatic Disruption of Aromatase Inhibits the Growth of Ectopic Uterine Tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 3460-66.
- Fernandes AO. Papel da leptina na esteroidogênese ovariana estimulada pelo IGF-I e FSH em mulheres submetidas a técnicas de reprodução assistida [Dissertação de mestrado]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto 2004; 115 p.
- Ferriani RA, Petta CA, Abrão MS. Papel Atual da Reprodução Assistida na Endometriose. In: Abrão MS. Endometriose – uma visão contemporânea. Rio de Janeiro: Revinter 2000; 169-75.
- Ferriani RA, Moura MD, Reis RM, Romão GS, Ferreira RA, Rosa e Silva ACJS, Navarro PAAS. Protocolos. In: Ferriani RA, Navarro PAAS. Protocolos de

Conduas em Infertilidade Conjugal. São Paulo: Conexão Brasil 2004; 77-89.

Foldesi I, Breckwold M, Neulen J. Oestradiol production by luteinized human granulosa cells: evidence of the stimulatory action of recombinant human follicle stimulating hormone. Hum Reprod 1998; 13: 1455-60.

Fujishita A, Hauso A, Khan KN Masuzaki H et al. Immunohistochemical study of angiogenic factors in endometrium and endometriosis. Gynecol Obstet Invest 1999; 48: 36-44.

Gallová UZ, Bouse V, Svábek L, Turek J et al. Endometriosis in Reproductive Immunology. Am J Reprod Immunol 2002; 47: 269-74.

Gomes FM. Efeito da Endometriose na Secreção de Progesterona pelas Células da Granulosa Humana: o Papel do Fluido Peritoneal. [Dissertação de Mestrado]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto 2002; 93 p.

Guet P, Royère D, Paris A, Lansac J, Driancourt MA. Aromatase Activity of Human Granulosa Cells In Vitro: Effects of Gonadotrophins and Follicular Fluid. Hum Reprod 1999; 14: 1182-89.

Halban J. Metastatic hysteroadenosis. Zentralb Gynakol 1925;7: 378-91.

Harlow CR, Cahill LA, Maile WM, Talbot J, Mears PG, Hull MGR. Reduced Preovulatory Granulosa Cell Steroidogenesis in Women Endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 426-429.

Hess R, Alam V, Salinas R, Miranda C. Endometriosis: Algunos aspectos clínicos. *Endometriosis y Esterilidad* 1998; 139-49.

Kao LC, Germeyer A, Tulac S, Lobo S, Yang JP, Taylor RN, Osteen K, Lessey BA, Giudice LC. Expression profiling of endometrium from women with endometriosis reveals candidate genes for disease-based implantation failure and infertility. *Endocrinology* 2003; 144:2870-81.

Karaer O, Oruç S, Koyuncu FM. Aromatase inhibitors: possible future applications. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2004; 83:699-706.

Kitawaki J, Kado N, Ishihara H, Koshiba H, Kitaoka Y, Honjo H. Endometriosis: the pathophysiology as an estrogen-dependent disease. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002; 83: 149-55.

Langendonckt AV, Casanas-Roux F, Donnez J. Oxidative stress and peritoneal endometriosis. *Fert Steril* 2002; 77: 868-78.

Lucena E, Cubillos BS. Immune Abnormalities in Endometriosis Compromising Fertility in FIV-ET Patients. *J Reprod Med* 1999; 44: 458-64.

Meinhart U, Mullis PE. The Essential Role of the Aromatase/p450arom. *Semin Reprod Med* 2002; 20: 277-84.

Meyer R. Zur frage der heterotopen epithelwucherung insbesondere des peritoneal epithels und in die ovarien. *Virchows Arch* 1924; 250: 595-610.

Mitwally MF, Casper RF. Aromatase Inhibition improves ovarian response to follicle-stimulating hormone in poor responders. *Fert Steril* 2002; 77: 776-80.

Mitwally MF, Casper RF. Aromatase inhibitors in ovulation induction. *Semin Reprod Med* 2004; 22:61-78.

Moura MD, Pereira TN, Nogueira AA, Ferriani RA, Sala MM, Reis RM. Avaliação do Tratamento Clínico da Endometriose. *RBGO* 1999; 21: 85-90.

Neme RM, Abrão MS, Sapienza DA, Petta CA, Ferriani RA. Atuação das Aromatases na Endometriose Pélvica. *Reprodução e Climatério* 2001; 16: 227-30.

Nisolle M, Donnez J. Endometriosis and infertility. In: *Peritoneal, ovarian and recto-vaginal endometriosis are three distinct entities*. New York: Parthenon 1997; 25-7.

- Noble LS, Simpson E, Johns A, Bulun SE. Aromatase Expression in Endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 174-79.
- Olive DL, Weinberg JB, Haney AF. Peritoneal macrophages and infertility: the association between cell number and pelvic pathology. *Fertil Steril* 1985; 44: 772-7.
- Oliveira VA. Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF) em Mulheres com Endometriose Submetidas a Técnicas de Reprodução Assistida [Dissertação de Mestrado]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto 2002; 57 p.
- Oosterlynck DJ, Cornillie FJ, Waer M, Vandeputte M, Koninckx PR. Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. *Fertil Steril* 1991; 56: 45-51.
- Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1927; 14: 422-69.
- Schenken RS. Treatment of Human Infertility: The Special Case of Endometriosis. In: Adashi EY, Rock JA, Rosenwaks Z. *Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology*. vol. 2. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers 1996; p. 2121-37.

Silva ALA. Esteroidogênese das células da granulosa humana *in vitro* após estimulação *in vivo* com gonadotrofinas associadas ou não a agonista do GnRH (acetato de leuprolide) [Tese de Doutorado]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo -Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto 1997; 89 p.

Sun HS, Hsiao KY, Hsu CC, Wu MH, Tsai SJ. Transactivation of steroidogenic acute regulatory protein in human endometriotic stromal cells is mediated by the prostaglandin EP2 receptor. *Endocrinology* 2003; 144: 3934-42.

Szczepanska M, Kozlik J, Skrzypczak J, Mikolajczyk M. Oxidative stress may be a piece in the endometriosis puzzle. *Fertil Steril* 2003; 79: 1288-93.

Pellicer A, Albert C, Mercader A, Bonilla-Musoles F, Remohi J, Simón C. The Follicular and Endocrine Environment in Women with Endometriosis: Local and Systemic Cytokine Production. *Fertil Steril* 1998; 70: 425-30.

Pellicer A, Valbuena D, Bauset C, Albert C, Bonilla-Musoles F, Remohi J, Simón C. The Follicular Environment in Stimulated Cycles of Women with Endometriosis: Esteroid Levels and Embryo Quality. *Fertil Steril* 1998; 69: 1135-41.

Rinesi L, Morente C, Botti G, Miechi H, Figueroa-Casas PR, Tozzini R. Results of Assisted Reproductive Technologies in Patients with Endometriosis. *Fertil Steril* 2002; 77: 190-91.

Speroff L, Glass RH, Kase NG. Regulation of the Menstrual Cycle. In: Speroff L, Glass RH, Kase NG. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. 6. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins 1999; p. 201-46.

Speroff L, Glass RH, Kase NG. Endometriosis. In: Speroff L, Glass RH, Kase NG. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. 6. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins 1999; p.1057-73.

Tetsuka M, Hillier SG. Differential regulation of aromatase and androgen receptor in granulosa cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1997; 61: 233-9.

The American Fertility Society. Revised American Fertility Society for Reproductive Medicine Classification of Endometriosis. *Fertil Steril* 1997; 67: 817-21.

Toya M, Saito H, Ohta N, Saito T, Kaneko T, Hiroi M. Moderate and Severe Endometriosis is Associated With Alterations in the Cell Cycle of Granulosa Cells in Patients Undergoing In Vitro Fertilization and Embryo Transfer. *Fertil Steril* 2002; 73: 344-50.

Wilson TJ, Hertzog PJ, Angus D, Munnery L, Wood EC, Kola I. Decreased natural killer cell activity in endometriosis patients: relationship to disease pathogenesis. *Fertil Steril* 1994; 62: 1086-8.

Witz CA. Interleukin 6: Another Piece of the Endometriosis-Cytokine Puzzle. *Fertil Steril* 2000; 73: 212-14.

Wheeler JM. Epidemiology of Endometriosis-Associated Infertility. *J Reprod Med* 1989; 34: 41-46.

Wu MY, Ho HN. The Role of Cytokines in Endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 2003; 49: 285-96.

Zeitoun K.M, Bulun SE. Aromatase: a Key Molecule in the Pathophysiology of Endometriosis and a Therapeutic Target. *Fertil Steril* 1999; 72: 961-69.

Zeller LM, Henig I, Radwanska E, Dmowski WP. Enhancement of human monocyte and peritoneal macrophage chemiluminescence activities in women with endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 1987; 13: 78-82.

PACIENTES Nº	GRUPO 1 (CONTROLE)	GRUPO 2 (ADIÇÃO DE TESTOSTE RONA 2x10 ⁻⁵ M)	GRUPO 3 (ADIÇÃO DE TESTOSTE RONA 2x10 ⁻⁵ M)	GRUPO 4 (ADIÇÃO DE IGF-1 E FSH) 50NG/µL	GRUPO 5 (ADIÇÃO DE IGF-1 E FSH 50NG/µL E TESTOSTE RONA 2x10 ⁻⁶ M)	GRUPO 6 (ADIÇÃO DE IGF-1 E FSH 50NG/µL E TESTOSTE RONA 2x10 ⁻⁵ M)
01	201	199	121	92,6	113	113
	154	177	87,8	220	80,3	208
	193	159	71,8	124	173	85,7
02	401	161,5	450	225	238	266
	399	348	257	306	420	454
	248	260	229,5	210	252	376
03	166	150	181	415	295	265
	207	169	199	297	386	410
	222	191	329	311	329	339
04	427	580	349	x	333	319
	714,5	401	375	433	507	691
	355	409	529	545	660	756
05	207	254	170	259	320	101
	221	258	267	345	267	343
	212	194	149	264	231	260
06	46,2	x	42,1	32,5	43,7	23,1
	x	104	37,5	36,7	50,7	36,5
	30,75	37,2	47,2	54,7	31,5	26,5
07	188	x	136	98,6	70,4	165
	285	150	130	225	82,5	135
	157	157	262	102	87,9	114
08	495	347	405	339	395	576
	397	593	338	366	381	240
	351	278	226	288	291	320

Apêndice 02 - Níveis de progesterona em ng/ml de fluidos de cultivo celular de células da granulosa de mulheres inférteis sem endometriose (grupo controle) submetidas à reprodução assistida (FIV ou ICSI). x = valores desconsiderados.

PACIENTES Nº	GRUPO 1 (CONTROLE)	GRUPO 2 (ADIÇÃO DE TESTOSTERO NA 2x10⁻⁶M)	GRUPO 3 (ADIÇÃO DE TESTOSTERO NA 2x10⁻⁵M)	GRUPO 4 (ADIÇÃO DE IGF-1 E FSH) 50NG/µL	GRUPO 5 (ADIÇÃO DE IGF-1 E FSH 50NG/µL E TESTOSTERO NA A 2x10⁻⁶M)	GRUPO 6 (ADIÇÃO DE IGF-1 E FSH 50NG/µL E TESTOSTERO NA A 2x10⁻⁵M)
01	116	113	139	203	127	149
	131	111	143	120	100	97,6
	86,6	138	143	157	134	187
02	8,48	9,05	6,69	6,97	8,35	6,29
	9,24	5,84	8,92	8,39	5,04	12
	4,56	6,44	7,76	7,71	8,52	10,8
03	489	408	348	548	468	773
	442	311	209	167	x	381
	379	430	262	491	614	362
04	301	271	278	465	283	231
	271	229	197	356	256	216
	363	288	215	587	363	x
05	318	177	272	138	390	520
	189,5	142,5	115	173	478	653
	136	165,5	110,5	145	189,5	765
06	136	314	108,5	253	149,5	118,5
	253	106,8	125,5	254	281	154
	121,5	147	98,8	133	249	158
07	444	192	303	317	512	224
	222	171	206	281	266	684
	238	215	232	214	213	317
08	919,5	487	240	962	421	513
	x	707,5	x	265	x	318
	515	492	267	703	476	315

Apêndice 02 - Níveis de progesterona em ng/ml de fluidos de cultivo celular de células da granulosa de mulheres inférteis com endometriose submetidas à reprodução assistida (FIV ou ICSI). x = valores desconsiderados.

PACIENTES Nº	GRUPO 1 (CONTROLE)	GRUPO 2 (ADIÇÃO DE TESTOSTERO NA 2x10 ⁻⁵ M)	GRUPO 3 (ADIÇÃO DE TESTOSTERO NA 2x10 ⁻⁵ M)	GRUPO 4 (ADIÇÃO DE IGF-1 E FSH 50NG/µL	GRUPO 5 (ADIÇÃO DE IGF-1 E FSH 50NG/µL E TESTOSTERO NA A 2x10 ⁻⁶ M)	GRUPO 6 (ADIÇÃO DE IGF-1 E FSH 50NG/µL E TESTOSTERO NA A 2x10 ⁻⁵ M)
01	304,00	1053,30	6497,90	230,17	594,80	6907,00
	259,75	1141,00	4986,70	295,16	732,40	7904,20
	245,76	x	6276,70	246,43	802,80	5668,50
02	2514,00	x	10904,00	1206,80	1696,60	7828,50
	2020,80	2573,40	9206,40	1700,80	x	x
	x	2580,70	11990,75	x	1807,60	6825,90
03	724,40	552,30	1956,50	x	1096,50	2231,00
	852,15	846,60	1671,90	1572,00	1148,60	2337,00
	838,74	736,70	1931,10	1188,90	1170,40	1997,60
04	634,24	1247,04	1207,6	1401,24	1230,00	1435,3
	x	960,08	1170,1	1142,57	1420,85	1656,1
	668,34	1006,12	1534,6	915,28	1541,46	1592,5
05	193,9	379,0	1220,1	210,7	372,3	x
	185,1	374,8	1114,7	189,9	332,9	1480,7
	174,7	356,7	1501,6	193,1	343,3	1499,7
06	x	x	1220,1	181,3	322,9	1165,1
	125,4	1023,5	1242,9	191,8	341,6	1119,0
	160,7	355,4	1271,6	153,1	280,3	1442,0
07	394,9	x	1992,0	259,6	190,0	1676,0
	436,6	457,3	1341,6	237,5	263,6	1561,6
	422,4	477,26	1763,1	188,8	382,0	1493,3
08	174,7	295,2	812,2	175,6	328,4	1739,9
	168,2	434,0	848,7	179,1	294,8	1761,6
	152,3	267,79	764,8	173,5	295,8	1322,2

Apêndice 01 - Níveis de estradiol em pg/ml de fluidos de cultivo celular de células da granulosa de mulheres inférteis sem endometriose (grupo controle) submetidas à reprodução assistida (FIV ou ICSI). x = valores desconsiderados.

PACIENTES Nº	GRUPO 1 (CONTROLE)	GRUPO 2 (ADIÇÃO DE TESTOSTE RONA 2x10⁻⁶M)	GRUPO 3 (ADIÇÃO DE TESTOSTE RONA 2x10⁻⁵M)	GRUPO 4 (ADIÇÃO DE IGF-1 E FSH) 50NG/μL	GRUPO 5 (ADIÇÃO DE IGF-1 E FSH 50NG/μL E TESTOSTE RONA 2x10⁻⁶M)	GRUPO 6 (ADIÇÃO DE IGF-1 E FSH 50NG/μL E TESTOSTERO NA 2x10⁻⁵M)
01	175,58	560,20	6379,00	x	542,30	4857,20
	99,86	488,00	6601,20	157,82	537,90	4487,40
	119,28	674,26	5904,20	156,12	539,30	5801,90
02	52,20	59,10	191,50	52,93	117,30	414,10
	64,89	50,90	331,60	82,46	96,80	389,80
	30,15	76,80	276,80	80,93	89,30	302,15
03	987,20	838,78	914,8	884,85	1449,9	1597,9
	x	852,70	1070,9	907,0	1503,0	1139,1
	708,20	x	1006,7	865,89	1530,32	938,80
04	460,07	652,60	2633,5	541,61	681,15	2484,6
	404,98	778,75	2115,2	470,19	658,03	2045,6
	556,17	703,39	2283,8	713,87	767,84	1874,7
05	305,2	619,24	1692,5	250,31	512,13	2520,6
	347,76	513,18	1818,8	292,88	x	3040,0
	252,39	577,62	1794,1	259,34	642,62	3244,0
06	358,7	x	834,2	x	351,9	1123,9
	478,7	496,3	943,8	349,7	388,6	1255,3
	370,9	302,8	1149,0	300,85	411,8	1260,2
07	386,0	384,4	752,9	x	568,2	613,1
	403,0	373,5	745,9	358,7	443,9	903,0
	336,1	363,2	634,9	340,5	388,6	812,9
08	350,2	424,1	556,4	436,1	339,4	746,6
	648,7	x	919,7	311,7	x	731,8
	273,8	x	578,1	334,9	775,5	519,5

Apêndice 01 - Níveis de estradiol em pg/ml de fluidos de cultivo celular de células da granulosa de mulheres inférteis com endometriose submetidas à reprodução assistida (FIV ou ICSI). x = valores desconsiderados.

ANEXOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____

abaixo assinado, tendo sido devidamente esclarecida sobre todas as condições do documento “ESCLARECIMENTO AO SUJEITO DA PESQUISA” (anexo 2), de que se trata o Projeto de Pesquisa intitulado “ATIVIDADE DA AROMATASE EM CÉLULAS DA GRANULOSA DE PACIENTES COM ENDOMETRIOSE SUBMETIDAS À TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA”, que tem como pesquisadora responsável a mestranda Lauriane Giselle de Abreu, sob orientação do Prof. Dr. Marcos Dias de Moura, especialmente no que diz respeito ao objetivo da pesquisa, aos procedimentos a que serei submetida, aos riscos e benefícios, à forma de ressarcimento no caso de eventuais despesas, bem como a forma de indenização por danos decorrentes da pesquisa, declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram asseguradas, a seguir relacionadas:

1. A garantia de obter resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas com a pesquisa e o tratamento a que serei submetida;
2. A liberdade de retirar o meu consentimento e deixar de participar do estudo a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo à continuidade do meu tratamento;

3. A segurança de que não serei identificada e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada à minha privacidade;
4. O compromisso de que será prestada informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar a minha vontade de continuar dele participando;
5. O compromisso de que serei devidamente acompanhada e assistida durante todo o período de minha participação no projeto, bem como de que será garantida a continuidade do meu tratamento após a conclusão dos trabalhos da pesquisa.

Declaro, ainda, que concordo inteiramente com as condições que foram apresentadas e que, livremente, manifesto a vontade de participar do referido projeto.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de _____.

Assinatura da paciente

ESCLARECIMENTO AO SUJEITO DA PESQUISA

1. TÍTULO DA PESQUISA:

“ATIVIDADE DA AROMATASE EM CÉLULAS DA GRANULOSA DE PACIENTES COM ENDOMETRIOSE SUBMETIDAS A TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA”

2. PESQUISADORA RESPONSÁVEL:

LAURIANE GISELLE DE ABREU, CRM/SP Nº 111.248 (ALUNA de MESTRADO NA USP/RIBEIRÃO PRETO)

3. ORIENTADOR :

PROFESSOR DOUTOR MARCOS DIAS DE MOURA, CRM Nº 49.816/SP

4. PROMOTORA DA PESQUISA:

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO.

Vimos, por meio desta, solicitar sua participação neste estudo.

Ele tem como objetivo testar a hipótese de que a aromatase (uma enzima, ou seja, uma substância que o organismo produz normalmente que se relaciona com o funcionamento do oócito, ou óvulo), e que estaria alterada nas células da granulosa (células componentes do oócito), presentes no fluido folicular (líquido que fica junto ao oócito). Isto será verificado em pacientes

normais (sem endometriose) e naquelas que possuem endometriose (doença na qual as células do endométrio, que correspondem à camada interna do útero, se implantam em outros locais fora do útero).

Estamos propondo este estudo pois pesquisas similares apontam para esta alteração nestas pacientes com endometriose e isto poderia ser um fator correlacionado à infertilidade e resultados insatisfatórios apresentados por estas pacientes nas Técnicas de Reprodução Assistida (FIV - Fertilização in Vitro e ICSI – Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide, ou seja, técnica em que se injeta o espermatozóide dentro do óvulo).

Desta maneira, estamos propondo este estudo que constará de 2 grupos: (1) grupo de pacientes sem endometriose e (2) grupo de pacientes com endometriose, todas submetidas a técnicas de reprodução assistida (FIV ou ICSI). No final do estudo, realizaremos a comparação entre estes dois grupos e checaremos se há diferença na atividade da aromatase nas células da granulosa destas pacientes e também se há diferenças nos resultados da FIV ou da ICSI.

Participando deste projeto, você receberá o tratamento da mesma forma que as pacientes que não participam, com todos os exames e recursos disponíveis para melhor atendê-la.

Durante a coleta de oócitos para a FIV ou ICSI, é aspirado o fluido folicular que contém o oócito que será utilizado. Este fluido, normalmente, depois é desprezado. Neste projeto pretendemos, com o seu consentimento, usar este fluido contendo as células da granulosa para pesquisar a atividade da enzima aromatase, como já foi exposto previamente. Não será necessário

submeter-se a nenhum procedimento adicional, além do que já ocorre normalmente no processo da FIV ou da ICSI.

Informamos que seu nome e seus dados pessoais não aparecerão no trabalho ou em outro meio de informação, ou seja, o sigilo será mantido.

Além disso, a qualquer momento você poderá solicitar sua saída do trabalho, se assim desejar, sem nenhum prejuízo à continuação de seu tratamento neste serviço.

Ficamos à disposição para esclarecer todas as dúvidas que surgirem, inclusive sobre o andamento da pesquisa e seus resultados.

Os pesquisadores.

Protocolo de Pesquisa

Grupo	<input type="checkbox"/> Caso	<input type="checkbox"/> Controle
Procedimento	<input type="checkbox"/> FIV	<input type="checkbox"/> ICSI
Nome		Idade anos
RG	Paridade G.....P.....C.....A.....	Filhos Vivos
Diagnóstico	Endometriose <input type="checkbox"/> mínima <input type="checkbox"/> leve <input type="checkbox"/> moderada <input type="checkbox"/> grave	
	<input type="checkbox"/> fator masculino – <input type="checkbox"/> oligo <input type="checkbox"/> terato <input type="checkbox"/> asteno	
	<input type="checkbox"/> fator tubáreo	
	<input type="checkbox"/> ESCA <input type="checkbox"/> outros -

Antecedentes Pessoais

Cirurgias Prévias

Antecedente Familiar	<input type="checkbox"/> endometriose	Grau de Parentesco
Tempo de Infertilidade anos		
Tratamentos de infertilidade anteriores	<input type="checkbox"/> sim - <input type="checkbox"/> Clomifeno <input type="checkbox"/> IUI	<input type="checkbox"/> FIV.....	<input type="checkbox"/> ICSI
	<input type="checkbox"/> não		
Laparoscopia (descrição)	Data - .../.../,,,,,		
Anátomo patológico	<input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim
Histeroscopia	Data - .../.../....
Histerossalpingografia	Data - .../.../....
Epermogramaml Nº Milhões/ml Vitalidade % Nº spz móveis no recuperado Nº.....		
	A.....% B.....% C.....%		
	D.....% Morfologia% (Kruger)		Milhões/ml
FSH	Data .../.../....	nível ng/dl	

Protocolo de indução	Nº dias		
Medicamento	<input type="checkbox"/> FSHr -dose.....	<input type="checkbox"/> outros – nome -	
	<input type="checkbox"/> HMG –dose.....	- dose	
Análogo GnRH	<input type="checkbox"/> agonista – nome.....	<input type="checkbox"/> antagonista – nome	Nº dias
Fóliculos puncionados	Nº de óocitos captados %

		Qualidade:	1
N° de embriões	formados.....		2
	transferidos.....		3
			4
Endométrio no dia da	Transferência	mm	
Passagem do catéter	() fácil	() difícil –	especificar:
Complementação lútea	() dufaston 30 mg/dia	() crinone gel 8%	() outro

Cultivo N°

No de células

Data da incubação/...../.....

Data da retirada/...../.....

Dosagem estradiol	1.1	ng/ml	1.2	1.3	Média	Mediana
	2.1		2.2	2.3		
	3.1		3.2	3.3		
	4.1		4.2	4.3		
	5.1		5.2	5.3		
	6.1		6.2	6.3		

β HCG () pos () neg

Gravidez clínica () sim () não

N° sacos () 1 () 2 () 3 ou **Aborto** () não () sim

gestacionais +

Intercorrências

Grupos:

1. Célula + meio cultivo
2. Célula + 20 µl solução mãe Testosterona + meio de cultivo
3. Célula + 200 µl solução mãe Testosterona + meio de cultivo
4. Célula + 10 µl FSH + 10 µl IGF-1 + meio de cultivo
5. Célula +20 µl de solução mãe Testosterona + 10 µl FSH + 10 µl IGF-1 + meio de cultivo
6. Célula + 200µl de solução mãe Testosterona + 10 µl FSH + 10 µl IGF-1 + meio de cultivo



CEP. 14048-900
RIBEIRÃO PRETO - S.P.
BRASIL

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CAMPUS UNIVERSITÁRIO - MONTE ALEGRE
FONE: 602-1000 - FAX (016) 633-1144

Ribeirão Preto, 01 de setembro de 2004

Ofício nº 2501/2004
CEP/SPC

PROCESSO HCRP nº 5694/2004

Senhor Professor:

O Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 187ª Reunião Ordinária realizada em 30/08/2004, tomou conhecimento e aprovou a recomendação solicitada pela CONEP, em Parecer nº 1492/2004, referente ao Projeto de Pesquisa intitulado: "ATIVIDADE DA AROMATASE EM CÉLULAS DA GRANULOSA DE PACIENTES COM ENDOMETRIOSE SUBMETIDAS A TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA".

Aproveito a oportunidade para renovar a Vossa Senhoria protestos de estima e consideração.

~~PROF. DR. SÉRGIO PEREIRA DA CUNHA~~
~~Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa~~
~~do HCRP e da FMRP-USP~~

Ilustríssimo Senhor
PROF. DR. MARCOS DIAS DE MOURA
LAURIANE GISELLE DE ABREU (Aluna)
Depto. de Ginecologia e Obstetria
Em mãos



FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO-USP
DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA

Av. Bandeirantes, 3900 - 1º andar - Ribeirão Preto-SP - CEP 14049- 900

Fone (016) 633-0216 - Fax (016) 633-0946

Setor de Reprodução Humana

REPRODUÇÃO ASSISTIDA

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu.....
e meu marido.....
nos submetemos livremente a participar de procedimentos que visam a obtenção de uma gestação devido a infertilidade conjugal. Fomos informados dos diversos aspectos médicos, éticos e jurídicos que envolvem os diferentes tratamentos, assim como dos resultados já obtidos nessa unidade de tratamento. Como participantes do Programa de Fertilização Assistida do HCRP-USP damos livre e voluntariamente nosso consentimento e autorização ao Setor de Reprodução Humana do HCRP da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, seus diretores, médicos e assistentes a realizarem os seguintes procedimentos assinalados:

INSEMINAÇÃO INTRA-ÚTERO

SIM
 NÃO
 NÃO SE APLICA

Para a realização de inseminação intra-útero (IUI) autorizamos a indução da ovulação e o preparo do sêmen do meu marido (capacitação) para posterior inseminação intra-útero. Para a realização desse procedimento entendo que deverei utilizar drogas que podem ter efeitos colaterais, os quais me foram devidamente esclarecidos, sendo os principais a Síndrome de Hiperestimulação Ovariana e a Multiparidade (gravidez múltipla). Isentamos a equipe de qualquer responsabilidade sobre as complicações ou efeitos colaterais que venham a ocorrer.

Em algumas situações pode ocorrer excessiva resposta aos medicamentos utilizados e nesse casos o tratamento pode ser interrompido ou ser mudado para outro procedimento como a fertilização *in vitro* (FIV). Seremos informados dessa situação e poderemos realizar a opção de continuarmos o tratamento com a FIV ou interromper a inseminação intra-útero sem prejuízo para futuras inseminações.

FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* (FIV) E MICROMANIPULAÇÃO DE GAMETAS (ICSI)

SIM
 NÃO
 NÃO SE APLICA

Fomos informados de que para a realização de FIV e/ou ICSI são necessárias diversas etapas, a saber: 1. indução da ovulação que visa a obtenção de um grande número de óvulos a partir da utilização de medicações (gonadotrofinas); 2. monitorização da ovulação feita por ultra-sonografia transvaginal seriada; 3. captação de óvulos que se constitui da aspiração dos folículos feita através da punção transvaginal guiada pelo ultra-som sob anestesia gemi endovenosa; 4. inseminação e cultivo dos óvulos captados por meio de FIV ou ICSI, feita no laboratório; 5. transferência de até 4 embriões ao útero, de acordo com meu consentimento no dia da transferência; 6. fase lútea que se constitui da utilização de medicações para suplementar a produção de hormônios dos ovários. Autorizamos a realização de todas estas etapas acima descritas e nos responsabilizamos pela adequada utilização das medicações prescritas.

Fomos orientados de que podem ocorrer falhas em diversos pontos do processo para realização de FIV e/ou ICSI: falha de resposta à indução da ovulação, ausência ou reduzido número de óvulos captados e falha ou baixa taxa de fertilização dos óvulos inseminados, o que pode resultar em poucos ou nenhum embrião a ser(em) transferido(s). Ausentamos a equipe de profissionais responsáveis pelo nosso tratamento de quaisquer destas intercorrências que possam vir a ocorrer durante o nosso tratamento. Fomos também esclarecidos das taxas de gestação deste serviço.

Fomos informados de que podem ocorrer efeitos colaterais e/ou complicações decorrentes do uso das medicações indutoras da ovulação (Síndrome de Hiperestimulação Ovariana), da captação oocitária (sangramento no local da punção e risco anestésico) e dos riscos de gestações múltiplas. Isentamos a equipe de toda e qualquer responsabilidade sobre as complicações ou efeitos colaterais que venham a ocorrer.

A micromanipulação (ICSI) é uma técnica onde é realizada a injeção de um único espermatozoide no interior de um óvulo. Concordamos que a indicação de FIV ou ICSI será de responsabilidade da equipe médica e de embriologistas responsáveis pelo nosso tratamento. Fomos informados de que a ICSI é técnica introduzida desde 1991 e até o momento os dados sobre aumento dos casos de malformações fetais nas crianças nascidas após esta técnica não são conclusivos, mas não sugerem haver este aumento em relação ao esperado em gestações espontâneas. Isentamos a equipe de profissionais responsáveis pelo nosso tratamento de qualquer distúrbio gestacional e anomalia congênita ou malformação fetal que por ventura venham a ocorrer, tanto da realização de FIV como de ICSI.

CONGELAMENTO DE EMBRIÕES

SIM
 NÃO
 NÃO SE APLICA

No decorrer de um ciclo de fertilização in vitro (FIV) ou de micromanipulação de gametas (ICSI) pode ser produzido um número maior de embriões do que o número que pode ser transferido no mesmo ciclo. Caso existam embriões excedentes, os mesmos poderão ser congelados. Concordamos com o congelamento no dia a ser determinado pela equipe médica. Estamos cientes que após descongelamento, alguns ou todos os embriões podem não sobreviver ao processo de congelamento.

Concordamos com a estocagem dos embriões congelados por um período máximo de 3 anos. Após 3 anos de estocagem dos embriões congelados, caso não desejemos a transferência dos embriões descongelados e viáveis, concordamos com a doação anônima dos embriões para outro(s) casal(is) que deseje(m) gravidez.

Caso ocorra o falecimento de um dos cônjuges ou de ambos, divórcio ou doenças graves em um ou em ambos os cônjuges, que incapacitem o(s) mesmo(s) a tomar(em) decisões, autorizamos a doação anônima de todos os embriões criopreservados para outro(s) casal(is) que deseje(m) gravidez.

No dia da realização do congelamento dos embriões nos será fornecido um novo termo de consentimento informado, onde constará o número total de embriões que foram efetivamente congelados, onde daremos ciência.

Fomos informados de que, caso não concordemos com a realização de congelamento de possíveis embriões remanescentes, optamos pela inseminação de um número máximo de 5 óvulos (se for produzido um número maior, os óvulos deverão ser descartados ou doados, conforme consentimento específico sobre doação de óvulos).

DOAÇÃO DE ÓVULOS

SIM
 NÃO
 NÃO SE APLICA

Concordamos com a doação anônima de óvulos, que será feita apenas quando o número de óvulos obtidos for superior a 8, ou superior a 5 se decidimos não congelar embriões. Estamos cientes de que as crianças nascidas a partir da doação de óvulos são moral e legalmente de seus pais que a geraram, não havendo de nossa parte nenhum interesse em conhecer a sua evolução nem de pedir direitos legais sobre estas crianças. Fomos informados de que a autorização para doarmos ou não óvulos em nada influenciará a conduta da equipe de profissionais deste Serviço perante o nosso tratamento de infertilidade.

A doação não terá caráter lucrativo ou comercial e os doadores não devem conhecer a identidade dos receptores e vice-versa. Em situações especiais, as informações sobre os doadores, por motivo médico, podem ser fornecidas exclusivamente para médicos, resguardando-se a identidade civil do doador. O Serviço de Reprodução Humana mantém um registro de dados clínicos de caráter geral, a fim de evitar que um doador tenha produzido mais do que duas gestações, de sexos diferentes, numa área de um milhão de habitantes. A escolha de doadores é de responsabilidade da unidade e, dentro do possível deverá garantir que o doador tenha a maior semelhança com a receptora.

DOAÇÃO DE EMBRIÕES

SIM
 NÃO
 NÃO SE APLICA

Concordamos com a doação de embriões que não serão utilizados por nós. Estamos cientes de que as crianças nascidas a partir de embriões doados são moral e legalmente dos pais que vão gerar o(s) filho(s), não havendo de nossa parte nenhum interesse em conhecer a sua evolução nem de pedir direitos legais sobre estas crianças. A autorização para doarmos ou não embriões em nada influenciará a postura da equipe de profissionais deste Serviço perante o nosso tratamento de infertilidade.

A doação não terá caráter lucrativo ou comercial e os doadores não devem conhecer a identidade dos receptores e vice-versa. Em situações especiais, as informações sobre os doadores, por motivo médico, podem ser fornecidas exclusivamente para médicos, resguardando-se a identidade civil do doador. O Serviço de Reprodução Humana mantém um registro de dados clínicos de caráter geral, a fim de evitar que um doador tenha produzido mais do que duas gestações, de sexos diferentes, numa área de um milhão de habitantes. A escolha de doadores é de responsabilidade da unidade e, dentro do possível deverá garantir que o doador tenha a maior semelhança com a receptora.

Tendo lido com atenção e compreendido todas as informações contidas nas duas páginas deste documento, recebido informações adicionais e esclarecimentos, concordamos espontaneamente em participar do Programa de Fertilização Assistida do HCRP. Nós entendemos que em todo tratamento médico, bem como na Reprodução Assistida existem riscos e efeitos colaterais aos quais estamos expostos, tendo sido esclarecidos todas as nossas dúvidas em relação ao procedimento. É de nosso conhecimento que o tratamento proposto poderá ser suspenso a critério médico e que também poderemos nos recusar a continuar o tratamento, sem nos isentarmos dos custos ou responsabilidades já assumidas. Eximimos a equipe médica de qualquer responsabilidade em eventuais ocorrências de complicações como abortamento, malformações fetais ou patologias maternas em caso de gravidez.

Não havendo dúvidas, datamos e abaixo assinamos:

Casal : Sr.
 Sr.
Testemunhas :

Ribeirão Preto, de de 20().....