

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

**EXPRESSÃO DO GENE DA AROMATASE (CYP19A1) NAS CÉLULAS
DA GRANULOSA MURAI LUTEINIZADAS DE MULHERES COM
ENDOMETRIOSE SUBMETIDAS A TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO
ASSISTIDA**

Lauriane Giselle de Abreu

**Ribeirão Preto, SP
2009**

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

**EXPRESSÃO DO GENE DA AROMATASE (CYP19A1) NAS CÉLULAS
DA GRANULOSA MURAI LUTEINIZADAS DE MULHERES COM
ENDOMETRIOSE SUBMETIDAS A TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO
ASSISTIDA**

Lauriane Giselle de Abreu

Tese de Doutorado apresentada à
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, para obtenção do título
de Doutor em Medicina na área de concentração:
Tocoginecologia

Orientador: Prof. Dr. Marcos Felipe Silva de Sá

Ribeirão Preto, SP
2009

Ficha catalográfica

Abreu, Lauriane Giselle de

Expressão do Gene Da Aromatase (CYP19A1) nas Células da Granulosa Murais Luteinizadas de Mulheres com Endometriose Submetidas a Técnicas De Reprodução Assistida/ Lauriane Giselle de Abreu. Ribeirão Preto, São Paulo, 2009.

xvii, 90 p., il. 30cm.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Universidade de São Paulo, Departamento de Tocoginecologia.

1. Aromatase; 2. CYP19A1; PCR em tempo real, 3. Endometriose; 4. Células da granulosa; 5. Reprodução assistida; 6. Infertilidade.

Data da defesa: 26/03/2009

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcos Felipe Silva de Sá

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dra. Rosana Maria dos Reis

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dra. Ester Silveira Ramos

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. Paulo Cesar Serafini

Julgamento: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, Luiz Antonio.

À minha mãe, Rosemarie.

Dedico a vocês, com muito amor, este trabalho e todas as minhas realizações. Minha gratidão pelo apoio sempre presente e por me proporcionarem a oportunidade de seguir os meus projetos e minha vocação.

Aos meus irmãos, Luciana e Junior, pelo carinho e apoio.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof Dr. Marcos Felipe Silva de Sá, agradecimento especial pela confiança na realização deste trabalho. Minha admiração como mestre, líder, médico e pesquisador. Obrigada pela oportunidade de sua orientação, pelo estímulo e experiência da bolsa sanduíche. Enfim, por todo o aprendizado e oportunidades que me proporcionou durante esse período.

A prof Dra Ester Silveira Ramos, agradecimento especial pela co-orientação no presente trabalho, pela parceria e contribuição científica à minha formação na área de Genética em Reprodução Humana.

Ao Prof Dr. Carlos Alberto Scrideli, agradecimento especial pelo auxílio e gentileza em disponibilizar seu laboratório e equipe para realização dos experimentos de PCR em tempo real, bem como com os resultados.

AGRADECIMENTOS

*Ao **Prof. Dr. Rui Alberto Ferriani**, minha admiração e agradecimento especial pela confiança e apoio científico. Obrigada pelo imenso auxílio para o estágio no exterior e por suas contribuições científicas fundamentais para minha formação em Reprodução Humana. Obrigada pelas orientações e gentileza sempre presentes.*

*À **Prof. Dra. Rosana Maria dos Reis**, agradeço pela oportunidade junto ao setor de Reprodução Humana da FMRP, USP. Minha admiração e agradecimento especial pelo apoio científico, contribuições e constante auxílio durante estágio no exterior, além de orientações para a minha carreira.*

*Ao **Prof. Dr. Antonio Alberto Nogueira**, chefe da pós-graduação na área de Tocoginecologia, minha gratidão pelo apoio científico e confiança.*

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof Dr Marcos Dias de Moura**, minha admiração e gratidão pelo estímulo científico, amizade e gentileza sempre presentes.

Ao **prof Dr Júlio César Rosa e Silva**, pelas contribuições a esse trabalho.

Aos profs. **Ricardo Pereira e Inacio Inoue**, da Universidade Estadual de Londrina, pela estímulo à carreira científica e confiança.

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

À **Vanessa da Silva Silveira**, do laboratório de Oncopediatria, pela ajuda na realização dos experimentos de PCR em tempo real, além de gentileza e amizade sempre presentes. À **Rosane Queiroz**, do laboratório de Oncopediatria, pelo auxílio e gentileza quanto à realização e análise dos dados de PCR em tempo real.

A **Álvaro Fabrício Lopes Rios**, do Depto de Genética, pela contribuição e auxílio quanto ao design dos primers do estudo.

A **Maria Cristina Picinato Araújo e Roberta Giorgenon**, e aos Profs. **Rodrigo Alves Ferreira, Luiz Alberto Manetta e Stael Porto Leite** pelo apoio e auxílio na coleta das amostras, gentileza e amizade.

À **sra. Maria Albina Verceze Bortoliero**, por sua ajuda e apoio em todas as etapas de realização dos experimentos. A **Sandra Cavichiollo Vianna, Maria Auxiliadora Pádua, Maria Aparecida C. Vasconcelos, Marilda H. Yamada Dantas**, pelo auxílio prestado neste trabalho, disponibilidade e amizade.

A **Suelen Bezerra Soares, Fátima Breda, Luci Pugin, Ilza Rezende Mazzocato**, pelo auxílio e gentileza.

Aos meus colegas de pós-graduação, pela amizade e apoio.

“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, in 'As Palavras de Freud'

RESUMO

Abreu LG. **Expressão do Gene da Aromatase (CYP19A1) nas células da granulosa murais luteinizadas de mulheres com endometriose submetidas a técnicas de reprodução assistida. 2009.** 90 p. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

Introdução: Até 60% das mulheres com endometriose apresentam como sintoma a infertilidade. Entretanto, os mecanismos envolvidos ainda permanecem não totalmente esclarecidos, especialmente quando não há distorção da anatomia pélvica. A etiologia multifatorial e comprometimento poligênico nesta doença têm sido amplamente aceitos. A aromatase é uma molécula das mais estudadas e há evidências de aumento da expressão do seu gene no endométrio eutópico e ectópico na endometriose. Esta enzima, codificada pelo gene CYP19A1, converte andrógenos a estrógenos e está presente normalmente nas células da granulosa, onde é fundamental para a produção esteroidogênica intrafolicular. Estudos *in vitro* por cultivo de células da granulosa, mostraram redução da atividade da aromatase em mulheres com endometriose. Devido à escassez de estudos que analisem a expressão do seu gene (CYP19A1) nessas células foi o que estimulou a proposta deste estudo. Este trabalho tem por objetivo medir a expressão do gene da aromatase por PCR em tempo real nas células da granulosa luteinizadas murais de mulheres com endometriose submetidas a técnicas de reprodução assistida. **Pacientes e Métodos:** Estudo caso-controle, com 11 mulheres com endometriose e 11 com os fatores tubáreo ou masculino de infertilidade, submetidas à hiperestimulação

ovariana controlada (HOC) para reprodução assistida, num total de 12 ciclos para o grupo com endometriose e 11 para o controle. Não houve diferença entre as características clínicas dos dois grupos quanto à idade e parâmetros do ciclo de HOC. As células da granulosa murais foram coletadas de folículos pré-ovulatórios maduros no dia da captação oocitária e isoladas. Posteriormente, procedeu-se à extração do RNA (clorofórmio/ isopropanol) e à transcrição reversa. A PCR em tempo real foi realizada para quantificar os níveis de RNA mensageiro produzidos para o gene da aromatase, normalizados aos produtos do gene endógeno, β -actina (expressão relativa). Todos os experimentos foram realizados em duplicata. **Resultados:** não houve diferença na expressão do gene CYP19A1 nas células da granulosa luteinizadas murais de mulheres com endometriose quando comparadas ao grupo controle ($p>0,05$; Mann Whitney), mesmo na comparação combinada considerando-se separadamente os diferentes graus de endometriose (controle vs. endometriose mínima/leve vs. endometriose moderada/grave, $p>0,05$; Kruskal Wallis). **Conclusão:** Os resultados deste estudo sugerem que a aromatase apresenta um mecanismo complexo de controle para sua expressão gênica nas células da granulosa e, apesar de evidências prévias de sua reduzida atividade nessas células na endometriose, a expressão de seu gene parece não estar afetada pela doença, de acordo com o presente estudo.

Palavras-chave: Aromatase; CYP19A1; PCR em tempo real, Endometriose; Células da granulosa; Reprodução assistida; Infertilidade.

ABSTRACT

Abreu LG. **Aromatase gene expression (CYP19A1) in mural lutein-granulosa cells of women with endometriosis undergoing assisted reproduction techniques.** 2009. 90 p. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

Background: Up to 60% of women with endometriosis have infertility symptoms. However, mechanisms remain unclear, mainly when there is no distortion of pelvic anatomy. The multifactorial etiology and polygenic involvement of this disease have been widely accepted. Aromatase is one of the most studied molecules and there are evidences of increased expression of its gene (CYP19A1) on eutopic and ectopic endometrium in endometriosis. This enzyme, codified by the CYP19A1 gene, converts androgens to estrogens and is normally present in granulosa cells, where it plays an essential role for the intrafollicle steroidogenic production. *In vitro* studies by granulosa cells culture have demonstrated reduced aromatase activity in women with endometriosis. The scarcity of studies assessing expression of the aromatase gene (CYP19A1) on these target cells stimulated the proposal of this research. The aim of this study is to quantify aromatase gene expression, by real-time PCR, in mural lutein-granulose cells of women with endometriosis undergoing assisted reproduction techniques. **Patients and Methods:** a case-control study was conducted on 11 women with endometriosis and 11 with male or tubal causes of infertility submitted to ovarian hyperstimulation (HOC), with a total of 12 cycles for endometriosis and 11 for the control group. There was no difference between the groups regarding age or HOC

parameters. Mural lutein-granulosa cells were harvested from pre-ovulatory follicles during oocyte retrieval and properly isolated. Later, RNA extraction (chloroform/isopropanol) and reverse transcription were performed. Real-time PCR was run to quantify RNA products of aromatase gene normalized to those from the control gene, beta-actin (relative expression). All experiments were carried out in duplicate. **Results:** there was no difference between the groups regarding the gene expression of CYP19A1 (aromatase) gene on mural lutein-granulosa cells ($p > 0.05$, Mann Whitney), even if we consider separately the different stages of endometriosis (control vs. minimal/mild vs. moderate/severe, $p > 0.05$, Kruskal Wallis). **Conclusion:** These results suggest that aromatase may have a complex control of its gene expression on granulosa cells and, despite of previous evidences showing its reduced activity on these target cells in endometriosis, the gene expression seems not affected by the disease, according to this study.

Key-words: Aromatase; CYP19A1; Real-time PCR, Endometriosis; Granulosa cells; Assisted reproduction; Infertility.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Mecanismo proposto de inativação defeituosa de estradiol na endometriose. Estradiol (E2), estrona (E1) e androstenediona (A) chegam às lesões endometrióticas pela corrente sanguínea, a aromatase (P450 arom) na célula estromal endometriótica catalisa a transformação de A para E1, que, por sua vez, é convertida à E2 pela ação da enzima 17 beta-hidroxiesteroide-desidrogenase1 (17 β HSD-1). E2 normalmente é inativado para E1 pela 17 beta-hidroxi-desidrogenase2 (17 β HSD-2) na célula epitelial glandular. Na célula endometriótica, no entanto, a 17 β HSD-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, estimulam a aromatase, completando um ciclo de feedback positivo. (Adaptado de Zeitoun & Bulun, 1999)..... 27
- Figura 2** – Eletroforese em gel de agarose de amostras de RNA de células da granulosa luteinizadas murais de mulheres com endometriose submetidas a técnicas de reprodução assistida. Bandas 18S e 28S referentes às subunidades ribossomais intactas 42
- Figura 3** – Gráfico de amplificação por PCR em tempo real de cDNA obtido de amostras de células da granulosa murais de mulheres inférteis submetidas à reprodução assistida. As sequências de interesse para os genes da aromatase e da β -actina foram amplificadas, para análise da expressão gênica relativa. Delta RN = Variação da fluorescência detectada. “Cycle number” = número do ciclo de amplificação 50
- Figura 4** - Gráfico da curva de dissociação para o gene da β -actina, obtida por PCR em tempo real (SYBR Green), de amostras de cDNA de células da granulosa de mulheres inférteis submetidas à reprodução assistida..... 51
- Figura 5** - Gráfico da curva de dissociação para o gene da aromatase, obtida por PCR em tempo real (SYBR Green), de amostras de cDNA de células da granulosa de mulheres inférteis submetidas à reprodução assistida..... 52
- Gráfico 1** – Expressão gênica relativa, por PCR em tempo real, da aromatase (gene CYP19A1) em células da granulosa luteinizadas murais de mulheres com endometriose (todos estádios, N=12) vs. mulheres com fatores tubáreo e/ou masculino de infertilidade (N=11), submetidas a técnicas de reprodução assistida. (p>0,05, Mann Whitney). Gráficos representam cálculos quando foram usadas como amostra de referência: a) placenta e b) média do Ct absoluto do grupo controle. Ct=“Threshold cycle” 56
- Gráfico 2** – Expressão gênica relativa, por PCR em tempo real, da aromatase (CYP19A1) em células da granulosa luteinizadas murais de mulheres com endometriose vs. controle submetidas a técnicas de reprodução assistida. A comparação foi realizada entre os grupos (1) controle (fator tubáreo/masculino; N=11); (2) endometriose leve e mínima (N=5); (3) endometriose moderada e severa (N=7). (p>0.05, Kruskal-Wallis com correlação de Dunn). Gráficos representam cálculos quando foram usadas como amostra de referência a) placenta e b) média do Ct absoluto do grupo controle. Ct=“Threshold cycle” 57

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Características do ciclo de hiperestimulação ovariana controlada para FIV ou ICSI de mulheres com fatores tubáreo e/ou masculino de infertilidade (grupo controle; N=11) quanto à idade, número de dias de indução ovariana, quantidade de gonadotrofina usada, número de folículos puncionados e oócitos captados. DP=desvio-padrão48
- Tabela 2** – Características do ciclo de hiperestimulação ovariana controlada para FIV ou ICSI de mulheres com endometriose (todos os estádios, N=12) quanto à idade, número de dias de indução ovariana, quantidade de gonadotrofina usada, número de folículos puncionados e oócitos captados. C1= primeiro ciclo e C2 = segundo ciclo de estimulação ovariana da paciente nº 08; DP=desvio-padrão.....49
- Tabela 3** – Níveis absolutos de “Threshold Cycle” (Ct), em duplicata, obtidos por PCR em tempo real (SYBR Green), para a análise de expressão relativa do gene da aromatase (CYP19A1), normalizada ao da β -actina, em células da granulosa luteinizadas murais de mulheres inférteis por fator tubáreo e/ou masculino (grupo controle) em comparação à mulheres com endometriose (todos os estádios, ASRM) submetidas a técnicas de reprodução assistida (FIV ou ICSI). Placenta como amostra de referência.....53
- Tabela 4** – Valores de expressão gênica relativa obtidos por PCR em tempo real para o gene da aromatase (CYP19A1) após normalização ao da β -actina, em células da granulosa murais de mulheres com fatores tubáreo e/ou masculino, N=11 vs mulheres com endometriose nos graus mínimo/leve (N=5) e moderado/grave (N=7) submetidas à reprodução assistida (FIV ou ICSI). Placenta como amostra de referência.
Ct= “Threshold cycle”. C1=1º e C2=2º ciclos de HOC da paciente 02 (endometriose moderada/severa)54
- Tabela 5** – Valores de expressão gênica relativa obtidos por PCR em tempo real para o gene da aromatase (CYP19A1) após normalização ao da β -actina, em células da granulosa murais de mulheres com fatores tubáreo e/ou masculino; (grupo controle, N=11) vs endometriose nos graus mínimo/leve (N=5) e moderado/grave (N=7) submetidas à reprodução assistida (FIV ou ICSI). Como amostra de referência, aqui representado o próprio grupo controle (média do Ct absoluto).
Ct= “Threshold cycle”. C1=1º e C2=2º ciclos de HOC da paciente 02 (endometriose moderada/severa)55

LISTA DE ABREVIATURAS

A → androstenediona

aGnRH → análogos do GnRH

BMP-15 → proteína óssea morfogenética 15

CC → citrato de clomifeno

C18 → esteróides que contêm 18 carbonos em sua composição química

C19 → esteróides que contêm 19 carbonos em sua composição química

C21 → esteróides que contêm 21 carbonos em sua composição química

Ct → “Threshold cycle”.

E1 → estrona

E2 → estradiol

FIV → *fertilização in vitro*

FMRP → Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

FSH → hormônio folículo-estimulante

GnRH → hormônio liberador de gonadotrofinas

GDF-9 → fator de diferenciação de crescimento 9

hCG → gonadotrofina coriônica humana

hMG ou **HMG** → gonadotrofinas menopausais humanas

ICSI → Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide

IGF-1 → fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

IL → interleucina

IUI → Inseminação Intra uterina

LH → hormônio luteinizante

M → concentração molar

NK → células de citotoxicidade natural

PCR → reação em cadeia da polimerase

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

RNAm → ácido ribonucléico mensageiro

ROS → espécies reativas de oxigênio

RT-PCR → PCR em tempo real

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

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Etiopatogenia da Endometriose	18
1.2. Endometriose e infertilidade	23
1.3. Aromatase e Endometriose	24
2. OBJETIVO	33
3. JUSTIFICATIVA	34
4. PACIENTES E MÉTODOS	35
4.1. Delineamento e amostra	35
4.2. Local de realização do estudo	35
4.3. Comitê de Ética em Pesquisa	35
4.4. Seleção de Pacientes	36
4.4.1 Critérios de inclusão para os dois grupos	36
4.4.2. Critérios de inclusão para o grupo-estudo	36
4.4.3. Critérios de inclusão para o grupo-controle	37
4.4.4. Critérios de exclusão para os dois grupos	37
4.4.5. Processo de seleção das mulheres incluídas no estudo	37
4.5. Protocolo de Hiperestimulação Ovariana Controlada	37
4.6. Captação de Oócitos	38
4.7. Coleta e Técnica de Isolamento das Células da Granulosa Murais (Anexo II)	39
4.8. Expressão do gene da aromatase	41
4.8.1. Extração de RNA	41
4.8.2. Síntese de cDNA	42
4.8.3. PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)	43
4.8.4. Amostras de referência	44
4.9. Análise Estatística	45
5. RESULTADOS	46
6. DISCUSSÃO	58
7. CONCLUSÃO	63
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
ANEXOS	73
ANEXO I	74
ANEXO II	80
ANEXO III	82
ANEXO IV	84
ANEXO V	88

PAPER

1.INTRODUÇÃO

1.1. Etiopatogenia da Endometriose

Endometriose significa presença de endométrio (com glândula e estroma) fora da cavidade uterina (NOBLE et al., 1996; SPEROFF; FRITZ, 2005; CROSIGNANI et al., 2006). Representa uma doença crônica e de elevada morbidade, que acomete cerca de 10% das mulheres em idade reprodutiva (WHEELER, 1989; SCHENKEN, 1996; MOURA et al., 1999; D'HOOGHE et al., 2003; KENNEDY et al., 2005; CROSIGNANI et al., 2006). Porém, a prevalência da endometriose depende do método empregado para seu diagnóstico e população estudada. Wheeler (1989) demonstrou prevalência de aproximadamente 10% em achados cirúrgicos em mulheres de idade reprodutiva com outros diagnósticos. Hess et al. (1998), por sua vez, encontraram 9,4% de endometriose em mulheres submetidas à laparoscopia por algia pélvica crônica. Quando se analisa mulheres com infertilidade e dor pélvica associadas, pode-se encontrar até 50% de prevalência de endometriose (CORNILLIE et al., 1990), contra 1-2% em mulheres assintomáticas (MOURA et al., 1999).

A endometriose, por sua complexidade e heterogeneidade em todos os seus aspectos, desde etiopatogenia, apresentação clínica, classificação e abordagem, apresenta inúmeras controvérsias e admite-se que sua etiologia seja multifatorial (PELLICER et al., 1998_{A,B}; BULUN

et al., 2002; GARRIDO et al., 2002; D'HOOGHE et al., 2003; CROSIGNANI et al., 2006; ABREU et al., 2008). Porém, a maioria dos pesquisadores concorda que o fenômeno da menstruação retrógrada seja o ponto de partida para seu estabelecimento, partindo-se das observações de que esta doença ocorre mais frequentemente em mulheres no menacme; naquelas com anomalias müllerianas obstrutivas para o fluxo menstrual, e em mulheres com ciclos menstruais mais curtos ou de maior duração (CROSIGNANI et al., 2006). De acordo com a teoria de Sampson (1927), ainda a mais aceita, os debris mestruais que refluem para a cavidade peritoneal possuem células endometriais viáveis que têm o potencial de formar um implante endometriótico.

Entretanto, questiona-se por que existe refluxo em 90% das mulheres e somente 10% delas têm endometriose (GARRIDO et al., 2002; D'HOOGHE et al., 2003; GUPTA et al., 2008). Acredita-se que esta doença complexa represente uma interação também complexa entre fatores etiopatogênicos: genéticos, imunológicos, hormonais e até ambientais (GARRIDO et al., 2002; D'HOOGHE et al., 2003; CROSGINANI et al., 2006). Todos esses fatores possivelmente conferem às células endometriais de determinadas mulheres características singulares 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 do implante endometriótico (ZEITOUN et al., 1999; BULUN et al., 2002; D'HOOGHE et al., 2003).

Outras teorias tentam explicar a presença de lesões de endometriose fora da cavidade pélvica. Em 1924, Meyer 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, cicatriz umbilical, espaço retroperitoneal, vagina e colo do útero.

Acredita-se que a endometriose também represente uma doença de herança poligênica com envolvimento principalmente das citocinas (GARRIDO et al., 2002; D’HOOGHE et al., 2003; WU; HO, 2003; AGUIAR et al., 2005; GUPTA et al., 2008); enzimas relacionadas à esteroidogênese (ZEITOUN et al., 1999; BULUN et al., 2002) e moléculas envolvidas com o estresse oxidativo celular (LANGENDONCKT et al., 2002; SZCZEPANSKA et al., 2003).

Quanto ao sistema imune, encontram-se alterações tanto na imunidade celular quanto humoral na endometriose, proporcionando um ambiente peritoneal favorável à maior sobrevivência das células endometriais após o fluxo retrógrado (WITZ, 2000; GALLOVÁ et al., 2002; WU; HO, 2003). O fluido peritoneal de mulheres com endometriose apresenta maior número e maior atividade de macrófagos; que, no entanto,

apresentam atividade fagocítica reduzida (OLIVE et al., 1985; ZELLER et al., 1987; DUNSELMAN et al., 1988; AGUIAR et al., 2005; GOMES et al., 2007). As células Natural Killer (NK) também apresentam atividade reduzida na endometriose (OOSTERLYNCK et al., 1991; WILSON et al., 1994). Entre os linfócitos, há evidências da dominância da subpopulação de linfócitos T auxiliares tipo 2 (Th2) em relação aos T auxiliares tipo 1 (Th1) (GALLOVÀ et al., 2002). Além disso, níveis elevados de citocinas no fluido peritoneal e também no fluido folicular de mulheres com endometriose foram relatados em diversos estudos, segundo a revisão de Gupta et al. (2008). A interleucina 6 (IL-6), que corresponde a uma interleucina das mais importantes na etiopatogenia da endometriose, encontra-se também envolvida com a produção esteroidogênica ovariana, foliculogênese e implantação embrionária (WITZ et al., 2000), além de induzir a expressão do VEGF (WU; HO, 2003). Essa interleucina também estimula a produção da aromatase em células adiposas (WITZ et al., 2000).

O mecanismo de apoptose nas células endometriais refluídas seria outro foco de defeito nas mulheres que apresentam endometriose, segundo estudos esse seria um dos mecanismos responsáveis pela maior sobrevivência das células endometriais na cavidade peritoneal, que favorece a formação dos implantes de endometriose. (FUJISHITA et al., 1999; DMOWSKI et al., 2000; BRAUN et al., 2002; TOYA et al., 2002).

Acredita-se ainda que a cavidade peritoneal de pacientes com endometriose represente um ambiente pró-oxidante (LANGENDONCKT et al., 2002; GUPTA et al., 2008). Na endometriose já foram relatados: o

aumento da enzima óxido nítrico-sintetase, que acarreta maior produção de óxido nítrico (substância pró-oxidante); aumento da peroxidação lipídica com produção de produtos reativos como o malonaldeído e lisofosfatidilcolina; aumento de enzimas antioxidantes no endométrio em resposta à maior quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS) e níveis reduzidos de vitamina E no fluido peritoneal (LANGENDONCKT et al., 2002; SZCZEPANSKA et al., 2003). Os efeitos sobre a fertilidade consistem na toxicidade do fluido peritoneal sobre espermatozóides, ovulação, desenvolvimento embrionário pré e durante a implantação (LANGENDONCKT et al., 2002).

Além da etiopatogenia, também existem controvérsias sobre o comportamento clínico da endometriose e sua classificação. Nisolle e Donnez (1997) defendem a hipótese das três doenças, ou seja, que, a endometriose peritoneal, a ovariana e a infiltrativa profunda representariam três doenças distintas com comportamentos clínicos e histopatológicos diferentes. Brosens e Brosens (2000), por sua vez, classificam a endometriose de acordo com sua topografia, em superficial e profunda: a forma superficial ou adenomiose seguiria o trajeto dos ductos mullerianos incluindo útero, fôrnices vaginais, septo retovaginal e ligamentos uterinos; as lesões profundas seriam aquelas localizadas fora da extensão dos ductos de Muller e incluiriam lesões peritoneais e ovarianas. A classificação mais utilizada é da Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (ASRM, 1997), porém a falta de correspondência entre quadro clínico e severidade da doença é um dos fatores mais intrigantes na endometriose (D'HOOOGHE et al., 2003).

1.2. Endometriose e infertilidade

Quanto à associação infertilidade-endometriose, esta é inequívoca (D'HOOGHE et al., 2003), e o quadro de infertilidade é presente em quase 60% das mulheres com essa doença (CORNILLIE et al., 1990; D'HOOGHE et al., 2003; MATAILLIOTAKIS et al., 2007). A interferência mecânica, ou seja, a presença de defeito anatômico pélvico associado à endometriose, é o fenômeno mais aceito, entretanto, os mecanismos envolvidos ainda permanecem não totalmente esclarecidos, especialmente nos estágios mínimo e leve da doença (SCHENKEN, 1996; FERRIANI et al., 2000; CROSIGNANI et al., 2006; GUPTA et al., 2008). Neste caso, os mecanismos imunológicos, genéticos e hormonais têm sido estudados e incluem possíveis alterações no microambiente folicular ou no oócito (SCHENKEN, 1996; PELLICER et al., 1998_A ; GARRIDO et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2005; ABREU et al., 2006); bem como nas células da granulosa (HARLOW et al., 1996; OLIVEIRA et al., 2005; ABREU et al., 2005; GOMES et al., 2007, TOYA et al., 2002).

Sem dúvida o advento das técnicas de reprodução assistida representou um importante passo no tratamento da infertilidade associada à endometriose (NEME et al., 2001; CROSIGNANI et al., 2006). Numerosos estudos foram realizados para avaliar se a endometriose afeta os resultados da fertilização *in vitro* (FIV) e seus achados foram controversos (TEMPLETON et al., 1996; RINESI et al., 2002; WRIGHT et al., 2007). Entretanto, Barnhart et al. (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.

O clássico modelo de estudo com mulheres doadoras de oócitos proporcionou uma compreensão fundamental quanto à questão “qualidade oocitária” vs. “receptividade endometrial” em mulheres com endometriose, pois apontou o comprometimento da qualidade oocitária como o principal fator alterado nas mulheres inférteis com endometriose submetidas à FIV em detrimento da receptividade endometrial (PELLICER et al., 1998_B; GARCIA-VELASCO; ARICI, 1999; DIAZ et al., 2000; BARNHART et al., 2002; GARRIDO et al., 2002).

1.3. Aromatase e Endometriose

Como já foi relatado, emerge a teoria de que a endometriose represente uma doença poligênica hereditária com expressão aberrante de citocinas e enzimas relacionadas à esteroidogênese como a aromatase (BULUN et al., 1995; HARLOW et al., 1996; NOBLE et al., 1996; ZEITOUN; BULUN, 1999; ATTIA et al., 2001; NEME et al., 2001; BULUN et al., 2002; GURATES et al., 2003; ABREU et al., 2005; HEILIER et al., 2006).

De fato, evidências apontam neste sentido. Arvanitis et al. (2003) encontraram a presença de um polimorfismo no gene da aromatase

associado com a endometriose. Kao et al. (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; genes como os envolvidos com resposta imune e apoptose celular, fatores angiogênicos e também o gene da aromatase.

A aromatase é uma enzima codificada pelo gene CYP19A1 localizado no cromossomo 15 (15q21.1; Sequência do GeneBank NM_000103) (MEINHART; MULLIS, 2002) e corresponde a um complexo enzimático do citocromo P450 responsável por catalisar a transformação de androgênios (testosterona, androstenediona) em estrogênios (estradiol, estrona, respectivamente) (ZEITOUN; BULUN, 1999; NEME et al., 2001; BULUN et al., 2002; FANG et al., 2002; KARAER et al., 2004; SPEROFF; FRITZ, 2005). É uma enzima-chave para a formação de estrogênio nos tecidos humanos (FANG et al., 2002; MEINHART; MULLIS, 2002) e 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 permitem a regulação local da enzima, porém a proteína expressa é a mesma (MEINHART; MULLIS, 2002; KARAER et al., 2004).

Uma vez que a endometriose é considerada uma doença estrogênio-dependente, a expressão da enzima aromatase torna-se essencial para sua etiopatogenia. O estrógeno é um potente 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 fator facilitador para o desenvolvimento de implantes na cavidade peritoneal (NOBLE et al., 1996; FANG et al., 2002; GURATES et al., 2003) (Vide FIGURA 1).

O envolvimento da aromatase e produção esteroidogênica, bem como sua importância para o estabelecimento da endometriose têm sido alvos de numerosos estudos, principalmente nos endométrios tópicos e ectópicos (BULUN et al., 1995; NOBLE et al., 1996; ZEITOUN; BULUN, 1999; ATTIA et al., 2001; NEME et al., 2001; BULUN et al., 2002; GURATES et al., 2003; ISHIHARA et al., 2003; HEILIER et al., 2006; BUKULMEZ et al., 2008; KYAMA et al., 2008). Níveis muito elevados da aromatase foram detectados em implantes peritoneais e endometriomas (NOBLE et al., 1996; KITAWAKI et al., 2002; BUKULMEZ et al., 2008) e também no endométrio tópico de mulheres com endometriose (BULUN et al., 1995; ZEITOUN; BULUN, 1999; BULUN et al., 2002; KYAMA et al., 2008), mas não em mulheres sem a doença (BULUN et al., 2005).

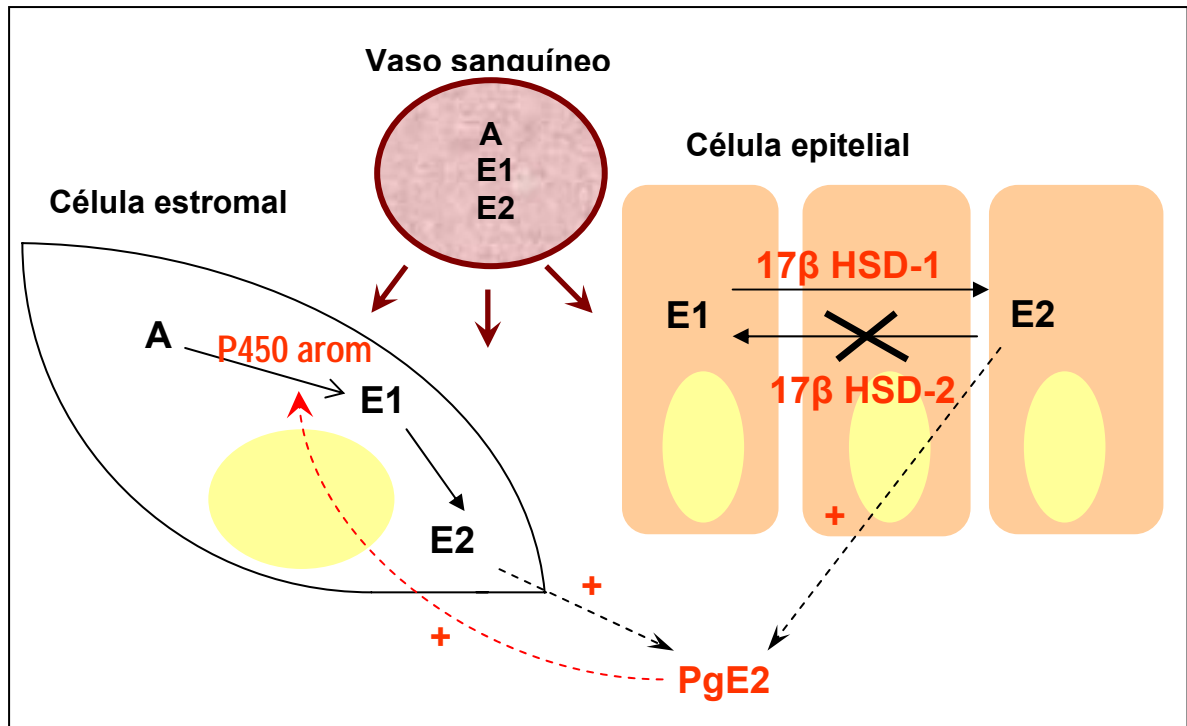


Figura 1 – Mecanismo proposto de inativação deficiente de estradiol na endometriose. Estradiol (E2), estrona (E1) e androstenediona (A) chegam às lesões endometrióticas pela corrente sanguínea, a aromatase (P450 arom) na célula estromal endometriótica catalisa a transformação de A para E1, que, por sua vez, é convertida à E2 pela ação da enzima 17 beta-hidroxiesteroide-desidrogenase1 (17βHSD-1). E2 normalmente é inativado para E1 pela 17 beta-hidroxi-desidrogenase2 (17βHSD-2) na célula epitelial glandular. 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, estimulam a aromatase, completando um ciclo de feedback positivo. (Adaptado de Zeitoun & Bulun, 1999)

Porém, sabe-se que esta enzima também está presente nas células da granulosa e, de fato, exerce um papel fundamental para o processo de maturação folicular e estabelecimento da qualidade oocitária (ERICKSON et al., 1989; FOLDESI et al., 1998; LAMBERT et al., 2000; SPEROFF; FRITZ, 2005).

Ora, se existe funcionamento aberrante da aromatase em lesões de endometriose, por que não ocorreria o mesmo na célula da granulosa com comprometimento da foliculogênese e qualidade oocitária?

Além disso, como já descrito previamente, os dados derivados dos estudos com doadoras apontaram a má qualidade oocitária como o principal fator alterado nas mulheres inférteis com endometriose submetidas à FIV (PELLICER et al., 1998; BARNHART et al., 2002; DIAZ et al., 2000). Qual o papel da aromatase para o desenvolvimento de oócitos de boa qualidade?

Sabe-se que o clímax ovulatório e a qualidade do oócito a ser ovulado são resultados de um processo complexo e orquestrado que tem duração de 85 dias desde a fase de folículo primordial até a fase de folículo pré-ovulatório. Os folículos que iniciam essa “corrida” o fazem primeiramente em uma maneira gonadotrofina-independente e posteriormente, gonadotrofina-dependente. Nessa última, oócito, células da granulosa e FSH interagem de maneira sinérgica e a multiplicação das células da granulosa e a maneira como respondem ao FSH e posteriormente ao LH para a produção de esteróides intrafoliculares são eventos fundamentais desse processo (SPEROFF; FRITZ, 2005). Sabe-se que existem “gap-junctions” entre as células da granulosa, evidência de que há interação molecular entre elas e possivelmente com o próprio oócito, através de moléculas sinalizadoras como o GDF-9 (fator de diferenciação de crescimento 9) e o BMP-15 (proteína óssea morfogenética 15) (ALBERTINI; BARRETT, 2003; COMBELLES et al., 2004; THOMAS; VANDERHYDEN, 2006; HUTT; ALBERTINI, 2007), contudo, muito pouco se conhece sobre essa comunicação entre células da granulosa e oócito.

As células da granulosa se diferenciam em células da granulosa murais e do cumulus durante o processo de foliculogênese, fato que tem estimulado o estudo de seu potencial como células-tronco mesenquimais (GEYTER et al., 2006). No momento em que se atingem o estágio de folículo pré-antral, portanto, as células da granulosa são capazes de sintetizar todas as três classes de esteróides (androgênios, progestagênios e estrogênios) (SPEROFF; FRITZ, 2005).

Porém, as proporções e o momento nos quais estes são produzidos são fundamentais. Sabe-se que o FSH e posteriormente o LH apresentam receptores hormonais nas células da granulosa e existe um sinergismo entre estes receptores e a produção hormonal intrafolicular para a produção de um folículo que carregue um oócito maduro (COSTA et al., 2004; SPEROFF; FRITZ, 2005; SILVA et al., 2008). Os andrógenos, por exemplo, são necessários em pequenas concentrações no início do desenvolvimento folicular como substrato para a produção de estradiol. Segundo a teoria das duas células, as células da teca transformam os componentes C21 (colesterol) até andrógenos, que por sua vez são substratos para a aromatase nas células da granulosa que convertem os andrógenos (C19) a estrógenos (C18). A transformação de um ambiente androgênico para estrogênico é fundamental para que se tenha um oócito apto para ovular (SPEROFF; FRITZ, 2005). 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; FRITZ, 2005). 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; FRITZ, 2005). Além disso, é necessário ressaltar que a aromatase é o ponto final de toda a cascata esteroidogênica ovariana, e a única enzima ovariana capaz de converter andrógenos para estrógenos. Ou seja, se houver um defeito em sua atividade, aquele folículo terá dificuldade em adquirir um status pré-ovulatório normal.

Tanto nos ciclos naturais, bem como nos ciclos estimulados para reprodução assistida, as relações hormonais intrafoliculares são essenciais para o sucesso de todo o processo ovulatório. Em termos de maturação, Costa et al. (2004) analisaram os ciclos estimulados com gonadotrofinas exógenas sem uso de análogo do GnRH e constataram que os folículos que continham oócitos maduros apresentavam um aumento da relação P/T, P/E2 e E2/T no fluido folicular em relação aos imaturos, o que sugere uma diminuição da conversão C21 a C19, mas não na atividade da aromatase. Silva et al. (2008) analisaram essas mesmas relações em folículos de mulheres submetidas também a ciclos estimulados com uso análogo do GnRH e observaram que sua ação se mantém intacta e o efeito mais importante do GnRH foi a redução de andrógenos intrafoliculares, com maiores taxas de fertilização e de maturação.

Portanto, os dados da literatura apontam para a importância da aromatase no processo de maturação e estabelecimento da qualidade oocitária.

Estudos *in vitro*, por cultivo de células da granulosa de mulheres com endometriose submetidas a ciclos de hiperestimulação ovariana controlada demonstraram que essas apresentam um mecanismo defeituoso da atividade da aromatase. Harlow et al. (1996) pesquisaram a atividade da aromatase em pacientes com endometriose de grau 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. Pesquisadores do mesmo grupo (CAHILL et al., 2003) também através de cultivo de células da granulosa, constataram uma menor sensibilidade ao LH nas células da granulosa de mulheres com endometriose.

Em estudo prévio de nosso laboratório (ABREU et al., 2006) encontramos redução na produção de estradiol nas células da granulosa murais luteinizadas *in vitro*, obtidas de mulheres com endometriose, após 24 horas de cultivo celular. Em condições basais ou quando foi suplementado ao meio de cultivo menor concentração de testosterona ($2 \times 10^{-6} \text{M}$), a produção de estradiol foi menor no grupo com endometriose. Entretanto, quando se aumentou a concentração da testosterona (precursor da aromatase) adicionada ao cultivo celular ($2 \times 10^{-5} \text{M}$), não houve diferença entre os grupos controle e endometriose quanto à produção de estradiol.

Diante deste achado, emerge a seguinte pergunta: se esse fenômeno ocorreu devido a um comprometimento da atividade da aromatase ou se devido à menor disponibilidade de seu substrato.

Com o intuito de esclarecer esta questão, bem devido à presença de vários estudos descritos anteriormente que associam a endometriose à defeitos nos mecanismos de controle de seu gene, hipotetizamos que a redução da atividade da aromatase seja resultado de um defeito na expressão de seu gene, CYP19A1.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é:

- ✓ Verificar a expressão do gene da aromatase (CYP19A1) nas células da granulosa murais luteinizadas de mulheres com endometriose submetidas a técnicas de reprodução assistida (FIV ou ICSI).

A hipótese a ser validada é que:

- ✓ Mulheres com endometriose apresentam redução da expressão do gene da aromatase (CYP19A1) nesse tecido-alvo.

3. JUSTIFICATIVA

Estudos prévios, conforme descrito previamente, verificaram a redução da atividade da aromatase na célula da granulosa de mulheres com endometriose através de cultivo celular. Alterações da expressão de seu gene, CYP19A1, também foram demonstradas nos endométrios eutópico e ectópico. A inexistência de estudos que avaliem a sua expressão gênica, especificamente nas células da granulosa de mulheres com endometriose estimulou a realização deste estudo.

4. PACIENTES E MÉTODOS

4.1. Delineamento e amostra: Estudo caso-controle. O grupo-estudo foi composto de 11 mulheres com endometriose e o grupo-controle de 11 mulheres, com fatores masculino ou tubáreo de infertilidade, submetidas à técnicas de reprodução assistida (FIV ou ICSI). O número amostral para este estudo refere-se ao número de ciclos de Hiperestimulação Ovariana Controlada (HOC), no grupo controle foram incluídos 11 ciclos de HOC, e no grupo com endometriose foram 12 ciclos, ou seja, uma das mulheres com endometriose foi submetida a dois ciclos de HOC no período do estudo, ambos incluídos no mesmo.

4.2. Local de realização do estudo: Setor 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.

4.3. Comitê de Ética em Pesquisa: o presente estudo foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) de acordo com o parecer número 15346/2005. 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 III, IV e IV).

4.4. Seleção de Pacientes: Foram selecionadas 22 mulheres inférteis com indicação para FIV ou ICSI, com um total de 11 para o grupo controle e 11 para o grupo com endometriose (uma delas com dois ciclos de estimulação inclusos no estudo), as quais foram entrevistadas e examinadas pelo mesmo observador. Cinco mulheres apresentaram o grau mínimo/leve e seis o grau moderado/grave de endometriose de acordo com a classificação da Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva. Os critérios para seleção de pacientes de ambos os grupos estão descritos abaixo:

4.4.1 Critérios de inclusão para os dois grupos: estar cadastrada no Programa de Reprodução Assistida do Setor de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; ter idade igual ou inferior a 40 anos, apresentar ciclos menstruais regulares e dosagem de FSH normal para o menacme.

4.4.2. Critérios de inclusão para o grupo-estudo: presença de endometriose em qualquer estadio de acordo com a classificação da Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (Fertil Steril 1997;67: 817–821), diagnosticada por laparoscopia realizada nos seis meses anteriores à realização do estudo.

4.4.3. Critérios de inclusão para o grupo-controle: ausência de endometriose confirmada por laparoscopia prévia. Fatores tubáreo ou masculino de infertilidade.

4.4.4. Critérios de exclusão para os dois grupos: presença de doenças endócrinas associadas, mulheres ooforectomizadas.

4.4.5. Processo de seleção das mulheres incluídas no estudo: No período do presente estudo, foram atendidas 50 mulheres com diagnóstico de endometriose submetidas à FIV ou ICSI. Destas, 24 cumpriam os critérios de inclusão para o estudo e foram selecionadas de maneira consecutiva, porém 12 não concordaram em participar do estudo. Portanto, o total foi de 12 mulheres com endometriose incluídas no estudo. Para o grupo controle, a seleção também ocorreu de maneira consecutiva.

4.5. Protocolo de Hiperestimulação Ovariana Controlada

Primeiramente, realizou-se a programação do período menstrual através de uso de anticoncepcionais orais combinados no ciclo prévio àquele da indução da ovulação. 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. 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) na dose de 200 a 400 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.

4.6. Captação de Oócitos

A captação oocitária foi realizada sob anestesia geral tipo endovenosa 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 37º e os oócitos manuseados em capela de fluxo de ar laminar com temperatura controlada a 37ºC e concentração de CO₂ de 5%, após separação do fluido folicular, o qual continha as células da granulosa luteinizadas murais, utilizadas no presente estudo.

4.7. Coleta e Técnica de Isolamento das Células da Granulosa Murais (Anexo II)

O método utilizado para a técnica de isolamento das células da granulosa murais luteinizadas de mulheres submetidas a técnicas de reprodução assistida foi baseado no método utilizado pelos autores Chang et. al. (2005), com algumas modificações. O procedimento está descrito a seguir:

Para a realização do estudo, foi utilizado pelo menos um aspirado folicular de cada ovário de cada mulher incluída no estudo, ou seja, o aspirado correspondente a 2 folículos maduros (>17mm diâmetro), sem contaminação visual por células sanguíneas. Depois de separado o complexo cumulus-oócito, sob fluxo laminar e temperatura a 37°C, o restante do conteúdo presente no tubo de Falcon (15ml), que continha o fluido folicular e as células da granulosa murais, foi então transferido para placas de Petri e lavado com meio HTF Modificado (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA). Após lavagem, todo este material foi então transferido para um novo tubo de 15 ml e centrifugado por 10 minutos a 2500 rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” ressuspenso em 0,6 ml de meio HTF Modificado e cuidadosamente transferido sobre a superfície de 4 ml de Histopaque 1077 (Sigma, St. Louis, MO, USA) previamente preparado em um novo tubo. Este conteúdo foi então centrifugado por 10 min a 1700 rpm e 4°C, com o objetivo de separar as células sanguíneas das células da granulosa murais. As células da granulosa formaram uma fina camada entre o Histopaque e o meio de

cultivo, enquanto que as células sanguíneas que ainda estavam presentes ficaram coletadas no fundo do tubo. A interface meio-histopaque contendo, portanto, as células da granulosa murais, foi então cuidadosamente aspirada com pipeta Pasteur e a seguir transferida a um novo tubo contendo 2 ml de HTF-M para lavagem do material. Este material foi também centrifugado por 10 minutos a 2500 rpm e 4^oC. A seguir, descartou-se o sobrenadante e o pellet foi então ressuspenso em 500 µl de meio de cultivo PBS (Irvine Scientific) para finalmente ser dividido e estocado em 2 microtubos de 1.5 ml cada, contendo cada um dos tubos 250 µl da suspensão celular e 750 µl de Trizol LS Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), resultando em um volume total de 1 ml em cada tubo. Por meio de agitação manual, foi realizada a lise celular do material contido em cada microtubo e rapidamente armazenado a -80^o C, até a realização da extração de RNA.

A presença e isolamento das células da granulosa foram confirmados através de visualização por microscópio ótico invertido (Coleman® ST-302L, Brasil), e verificada sua vitalidade através da coloração por Trypan Blue (Trypanblau®, Merck, Whitehouse Station, NJ, USA).

É importante ressaltar também que todos os cuidados foram tomados para evitar contaminação no material estudado. Toda a equipe utilizou luvas estéreis e o material de consumo como tubos e pipetas eram livres de RNase e estéreis. O material foi sempre mantido sobre gelo para que se pudesse evitar a degradação do RNA durante os passos descritos anteriormente.

4.8. Expressão do gene da aromatase

A expressão quantitativa do gene da aromatase (CYP19A1), ou seja, a quantificação da expressão dos níveis de RNA mensageiro da aromatase em relação ao gene da β -actina, nas células da granulosa luteinizadas murais das mulheres incluídas no estudo foi analisada pelo método de PCR em tempo real quantitativo, como descrito a seguir.

4.8.1. Extração de RNA

O RNA total das células da granulosa foi extraído utilizando-se o Trizol LS Reagent® (Invitrogen). O procedimento foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante. Brevemente, depois do descongelamento, as amostras, que já haviam sido previamente armazenadas em Trizol LS Reagent, foram então homogeneizadas e mantidas à temperatura ambiente por 5 minutos. A cada tubo foi então adicionado 0,2 ml de clorofórmio (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA). Após homogeneização e incubação à temperatura ambiente por 3 minutos, o material foi centrifugado a 13.000 rpm por 15 minutos a 4⁰C. O sobrenadante foi aspirado e transferido a um novo tubo contendo 0,5 ml de isopropanol (Merck). Após homogeneização, o material foi incubado “overnight” a -20⁰C.

No próximo dia, após descongelamento, o material de cada tubo foi submetido à centrifugação por 30 minutos a 13.000 rpm e 4⁰C, o

sobrenadante foi então descartado e ao “pellet” foi adicionado 1 ml de etanol 75% (Merck) para lavagem e após secagem completa do etanol, ao pellet em cada tubo foi adicionada 20 µl de água livre de RNase e estocado a -80°C.

A integridade do RNA foi verificada através de eletroforese em gel de agarose a 1% corada com brometo de etídio. (Figura 2)

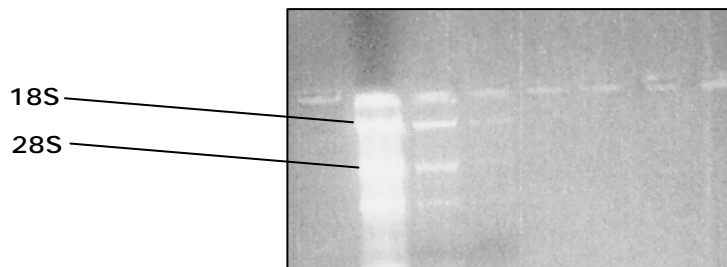


Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose de amostras de RNA de células da granulosa luteinizadas murais de mulheres com endometriose submetidas a técnicas de reprodução assistida. Bandas 18S e 28S referentes às subunidades ribossomais intactas.

4.8.2. Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA foi usado o kit High capacity cDNA archive kit (Applied Biosystems, Los Angeles, CA) associado à enzima inibidora de RNase (RNasin Plus®, Promega, Wisconsin, MD, USA). O procedimento realizado para cada amostra conforme as instruções e orientações contidas no kit.

Após a síntese de cDNA, que resultou em um volume final de 20 µl de cDNA, o mesmo foi aliquotado (5 µl cada) e estocado a -20°C.

4.8.3. PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

A reação de qRT-PCR foi realizado com as amostras de cDNA de células da granulosa murais das mulheres incluídas no presente estudo, previamente armazenadas a -80°C . Foram utilizados os reagentes do tipo SYBR Green PCR Core reagents (Applied Bio-systems, Foster City, CA) com análise de curva de dissociação e o sistema de detecção ABI Sequence Detection System 5000 (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Los Angeles, CA). Todos os experimentos referentes a cada paciente foram realizados em duplicata e os dados normalizados em relação ao gene endógeno da β -actina. As sequências de interesse foram amplificadas utilizando-se os seguintes “primers” (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA):

Para o gene da aromatase CYP19A1:

- (Forward) (FW): 5'CCTTgCCAATAgTgTCATCC3'
- (Reverse) (RV) 5'TAgCCTggTTCTCTggTgTg 3'

Para o gene endógeno β -actina:

- (Forward) (FW):5' TCgTgATggACTCCggTgAC3'
- (Reverse) (RV): 5'CgTggTggTgAAgCTgTAg3'

A sequência dos primers foi definida através do software Gene Runner (Hastings softwares Inc, New York, NY, USA), seguindo-se as recomendações para a PCR em tempo real.

4.8.4. Amostras de referência

Diluições seriadas de uma amostra de placenta humana de uma mulher hígida com gestação a termo foram utilizadas para a realização da curva padrão e essa amostra também foi usada como amostra de referência. A escolha da placenta como amostra de referência foi pelo fato de ser um órgão conhecido pela expressão da aromatase e pelo fato de já ter sido usada previamente por outros pesquisadores (ACIÈN et al., 2007).

Houve porém a necessidade de se utilizar uma outra amostra de referência, que foi o próprio grupo controle do presente estudo, pois a placenta apresentou uma expressão da aromatase muito elevada em comparação com as células da granulosa murais, que representaram portanto uma amostra de referência mais fidedigna.

O cálculo da normalização da expressão gênica ao gene endógeno e cálculo da expressão gênica relativa foi realizado pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ conforme fórmula a seguir: (Ct=threshold cycle)

$$\Delta Ct = Ct(\text{CYP19A1}) - Ct(\beta\text{-actina});$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ amostra de interesse} - \Delta Ct \text{ amostra de referência.}$$

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ = fórmula utilizada para quantificação da expressão relativa do gene da aromatase em relação ao gene da β -actina, usando como amostra de referência a placenta ou as células da granulosa do grupo controle do presente estudo (LIVAK et al., 2001).

Os cálculos estão representados detalhadamente em cada amostra do estudo no ANEXO I.

4.9. Análise Estatística

Para o cálculo amostral, foi usado o programa encontrado no website: <http://www.lee.dante.br/pesquisa/amostragem/amostra.html> O valor considerado para o cálculo amostral foi a média do desvio-padrão do Ct em ambos os grupos, a qual foi 2,884 (controle 2,836 e endometriose 2,933). Para uma diferença de 15% entre os grupos e nível de significância de 5%, seriam necessárias 09 pacientes para cada grupo.

O programa usado para cálculo dos dados das pacientes e da RT-PCR (PCR em tempo real) foi o GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Para a análise dos dados do HOC, foi utilizado o teste T não pareado em todas as comparações.

Com relação à análise dos dados da RT-PCR, quando foram comparados dois grupos, foi usado o teste de Mann-Whitney e, quando realizada a comparação simultânea entre os três grupos, o teste de Kruskal-Wallis com correlação de Dunn. Em todos os casos, considerou-se um nível de significância de 5% ($p < 0.05$).

5. RESULTADOS

A idade das mulheres incluídas no estudo variou de 27 a 40 anos de idade. Não houve diferença entre os grupos quanto à idade ou parâmetros do ciclo de hiperestimulação ovariana controlada para reprodução assistida (Tabelas 1 e 2). A média de idade das mulheres do grupo controle e endometriose foi 34,73 e 32,64, respectivamente ($p=0,17$). Para os outros parâmetros do ciclo de hiperestimulação ovariana, as médias encontradas para os grupos controle e endometriose foram respectivamente: dias de indução, 9,00 vs. 9,08 ($p=0,90$); quantidade de gonadotrofinas usadas em unidades, 2502 vs. 2354 ($p=0,65$); n° de folículos puncionados, 11,18 vs. 11,50 ($p=0,87$) e n° oócitos captados, 5,82 vs. 6,83 ($p=0,39$).

Quanto aos resultados da RT-PCR, as curvas de amplificação e de dissociação estão representadas nas figuras 4, 5 e 6, respectivamente. O “Threshold” usado foi de 0,2 e foram realizadas curvas-padrão para ambos os genes.

A análise do Ct absoluto, ou seja, sem a normalização para o gene endógeno da β -actina, demonstrou uma distribuição gaussiana de seus valores (com exceção da análise da aromatase no grupo com endometriose). As médias e mediana do grupo que não apresentou distribuição normal, bem como os respectivos desvio-padrões estão representados na Tabela 3.

Quanto aos valores de Ct para o gene da aromatase após normalização para o gene endógeno beta-actina, os dados estão

representados nas Tabelas 4 e 5. Os valores da tabela 4 representam os dados calculados utilizando-se a placenta como amostra de referência. Na tabela 5, no entanto, são demonstrados os dados quando foi utilizada a média do Ct absoluto do grupo controle como amostra de referência. O cálculo da expressão gênica relativa foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta}$ Ct, conforme descrito na seção Métodos e no ANEXO I.

Não houve diferença entre os grupos controle e endometriose no que diz respeito à análise quantitativa relativa da expressão do gene da aromatase (CYP19A1) nas células da granulosa luteinizadas murais ($p=0,5254$ e $0,3099$, Mann Whitney, quando normalizados à placenta e grupo controle, respectivamente; vide Gráfico 1). Na comparação entre os três grupos (controle, endometriose mínima/leve e moderada/grave), também não foi encontrada diferença segundo o teste Kruskal-Wallis com correlação de Dunn ($p=0,4254$ quando normalizados à placenta e ao grupo controle, respectivamente; vide Gráfico 2). A análise comparativa entre os grupos endometriose leve/mínima vs. moderada/grave também foi efetuada e novamente não foi encontrada nenhuma diferença significativa entre os grupos ($p=0,4318$, Mann Whitney, quando normalizados à placenta e também ao grupo controle).

Tabela 1 – Características do ciclo de hiperestimulação ovariana controlada para FIV ou ICSI de mulheres com fatores tubáreo e/ou masculino de infertilidade (grupo controle; N=11) quanto à idade, número de dias de indução ovariana, quantidade de gonadotrofina usada, número de folículos puncionados e oócitos captados. DP=desvio-padrão.

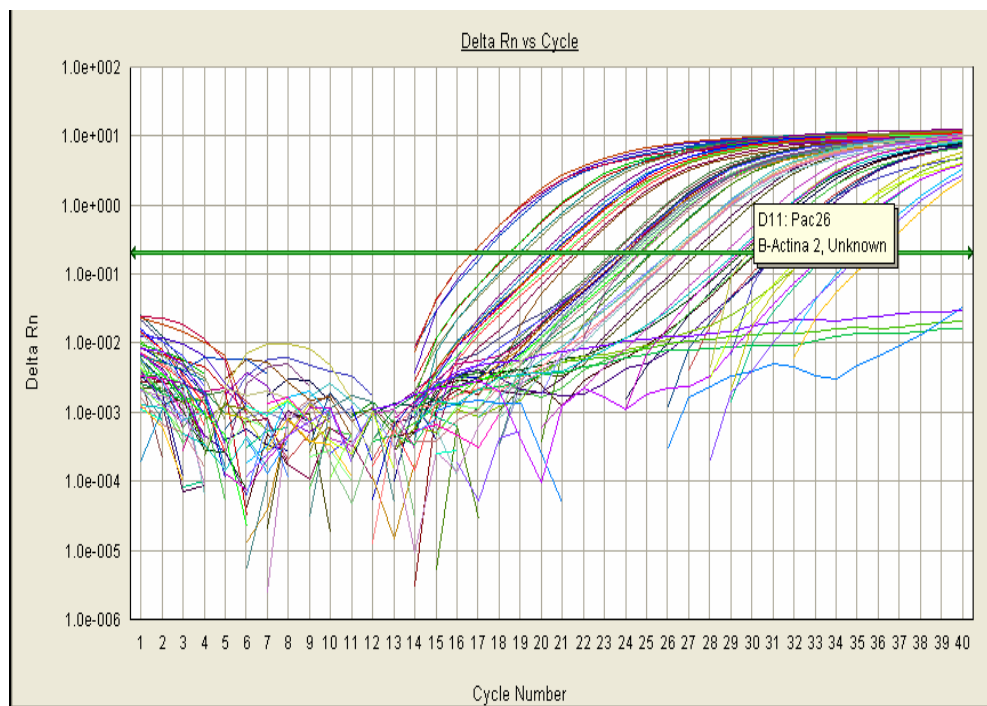
	IDADE	Nº DIAS DE INDUÇÃO	QUANTIDADE GONADOTROFI NA USADA	Nº FOLÍCULOS PUNÇIONADOS	Nº OÓCITOS CAPTADOS
01	37	07	4175UI	8	4
02	31	09	2595UI	17	8
03	36	11	3000UI	14	8
04	39	08	2800UI	5	2
05	27	09	2200UI	6	2
06	33	09	1750UI	15	7
07	33	10	1400UI	20	7
08	40	08	2250UI	15	10
09	32	09	1950UI	13	9
10	36	12	3300UI	5	4
11	38	07	2100UI	5	3
Média± DP	34,73±3,90	9,00±1,55	2502± 786,3	11,18±5,51	5,82±2,892

Tabela 2 – Características do ciclo de hiperestimulação ovariana controlada para FIV ou ICSI de mulheres com endometriose (todos os estádios, N=12) quanto à idade, número de dias de indução ovariana, quantidade de gonadotrofina usada, número de folículos puncionados e oócitos captados.

	<i>IDADE</i>	<i>Nº DIAS DE INDUÇÃO</i>	<i>QUANTIDADE GONADOTROFI NA USADA</i>	<i>Nº FOLÍCULOS CAPTADOS</i>	<i>Nº OÓCITOS CAPTADOS</i>
01	35	08	2400UI	10	7
02	34	09	1675UI	13	9
03	30	10	3000UI	7	4
04	36	10	2850UI	13	7
05	28	08	1200UI	10	7
06	37	08	3000UI	21	11
07	34	09	2700UI	8	6
08	32				
C1		09	2700UI	13	10
C2		12	3450UI	12	1
09	32	06	1150UI	10	7
10	32	09	2475UI	10	6
11	29	11	1650UI	11	7
Média± DP	32,64±2,87	9,08± 1,56	2354± 755,3	11,50±3,55	6,83± 2,62

Legenda: C1= primeiro ciclo e C2 = segundo ciclo de estimulação ovariana da paciente nº 08; DP=desvio-padrão.

Figura 3 – Gráfico de amplificação por PCR em tempo real de cDNA obtido de amostras de células da granulosa murais de mulheres inférteis submetidas à reprodução assistida. As sequências de interesse para os genes da aromatase e da β -actina foram amplificadas, para análise da expressão gênica relativa.



Legenda: Delta RN = Variação da fluorescência detectada.
"Cycle number" = número do ciclo de amplificação.

Figura 4 - Gráfico da curva de dissociação para o gene da β -actina, obtida por PCR em tempo real (SYBR Green), de amostras de cDNA de células da granulosa de mulheres inférteis submetidas à reprodução assistida.

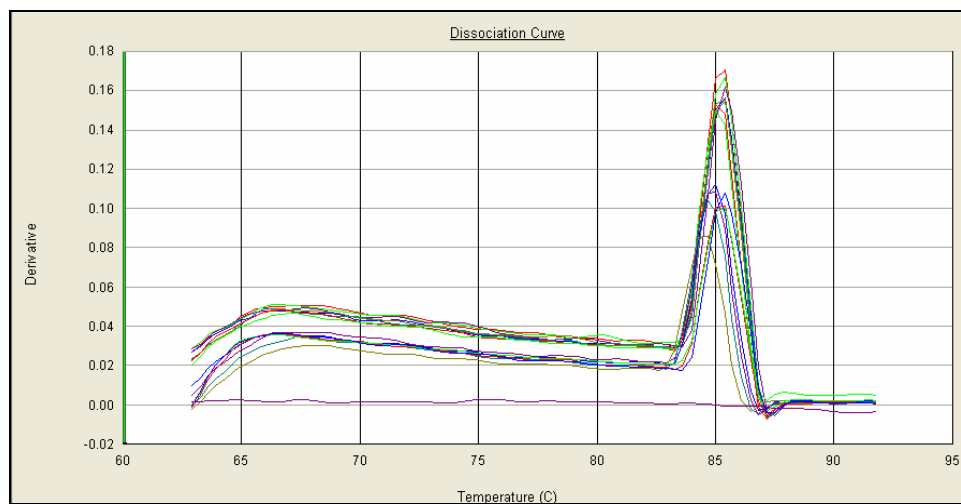


Figura 5 - Gráfico da curva de dissociação para o gene da aromatase, obtida por PCR em tempo real (SYBR Green), de amostras de cDNA de células da granulosa de mulheres inférteis submetidas à reprodução assistida.

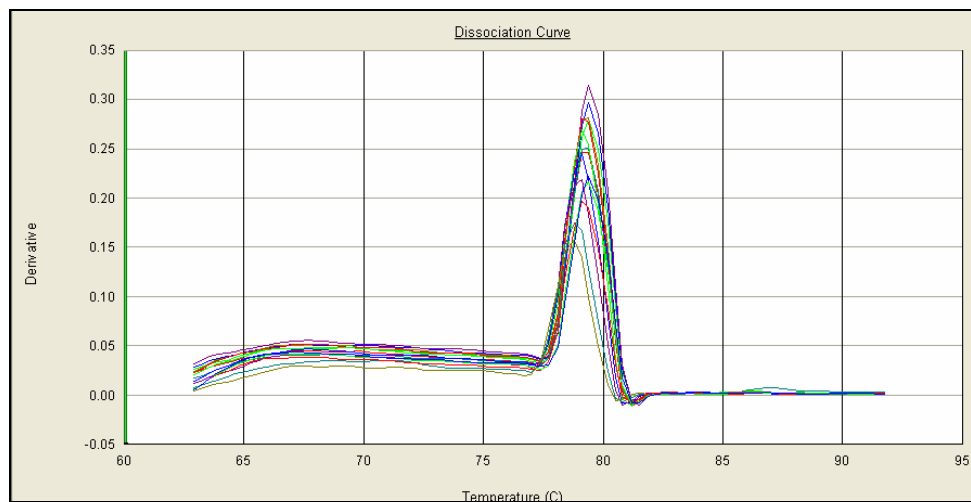


Tabela 3 – Níveis absolutos de “Threshold Cycle” (Ct), em duplicata, obtidos por PCR em tempo real (SYBR Green), para a análise de expressão relativa do gene da aromatase (CYP19A1), normalizada ao da β -actina, em células da granulosa luteinizadas murais de mulheres inférteis por fator tubáreo e/ou masculino (grupo controle) em comparação à mulheres com endometriose (todos os estádios, ASRM) submetidas a técnicas de reprodução assistida (FIV ou ICSI). Placenta como amostra de referência.

GRUPO CONTROLE	Ct	Ct	GRUPO ENDOMETRIOSE	Ct	Ct
	Aromatase (CYP19A1)	β-actina		Aromatase (CYP19A1)	β-actina
01	27,6026	22,5086	01	27,1022	24,5945
	27,5947	22,5086		27,3753	24,6631
02	26,0095	19,9746	02	26,6939	20,9338
	26,2485	20,1802		26,6903	20,9338
03	23,9989	20,2362	03	30,1604	24,6380
	23,9763	20,4424		29,4138	24,8973
04	20,8751	18,0222	04	32,6201	24,4042
	20,8211	17,6097		32,5394	24,4951
05	26,4174	21,5941	05	29,7922	26,5925
	25,9648	21,7820		30,8459	26,3038
06	27,0075	21,4559	06	30,0930	24,3469
	26,6059	21,5778		31,0035	23,6951
07	26,2209	20,2611	07	21,5139	19,0755
	26,1272	20,3337		21,7205	18,8909
08	29,5236	23,6901	08		
	29,9585	24,1536		C1	26,5984
09				26,2491	21,3561
			C2	31,0822	24,0759
10				31,1929	24,0364
			09	0	32,9751
11				0	33,1153
			10	28,1726	23,0111
			28,7905	23,6560	
			11	27,8934	18,5017
				28,0277	18,3280
Média ± DP	26,42± 2,836	21,69± 2,175	Média ± DP	26,07 ± 8,503	23,71 ±3,745
			Mediana±DP	28,10± 8,503	
PLACENTA	17,209 17,041	20,0306 20,5047			

Tabela 4 – Valores de expressão gênica relativa obtidos por PCR em tempo real para o gene da aromatase (CYP19A1) após normalização ao da β -actina, em células da granulosa murais de mulheres com fatores tubáreo e/ou masculino, N=11 vs mulheres com endometriose nos graus mínimo/leve (N=5) e moderado/grave (N=7) submetidas à reprodução assistida (FIV ou ICSI). Placenta como amostra de referência.

Ct Aromatase CYP19 (Normalizado β - actina) Pacientes N^o	Grupo Controle	Endometriose Mínima/Leve	Endometriose Moderada/Severa	Endometriose Todos Estádios
01	0,003324	0,003491106	0,003193491	0,003491106
02	0,001705	0,007739467	0,003431607 (C1) 0,000836092 (C2)	0,003431607(C1) 0,000836092(C2)
03	0,009031	0,001227637	0,000151505	0,001227637
04	0,013842	0,00040417	0,00209193	0,00040417
05	0,004994	0,01824127	0,018547904	0,01824127
06	0,002894		0,000000000	0,003193491
07	0,001927			0,007739467
08	0,002005			0,000151505
09	0,005534			0,00209193
10	0,02400			0,018547904
11	0,001636			0,003193491
12				0,000000000
Média \pmDP	0,006445 \pm 0,006932	0,006221 \pm 0,007298	0,004709 \pm 0,006900	0,005396 \pm 0,006762
Mediana	0,003324	0,003491	0,002643	0,003193

Legenda: Ct= "Threshold cycle". C1=1^o e C2=2^o ciclos de HOC da paciente 02 (endometriose moderada/severa).

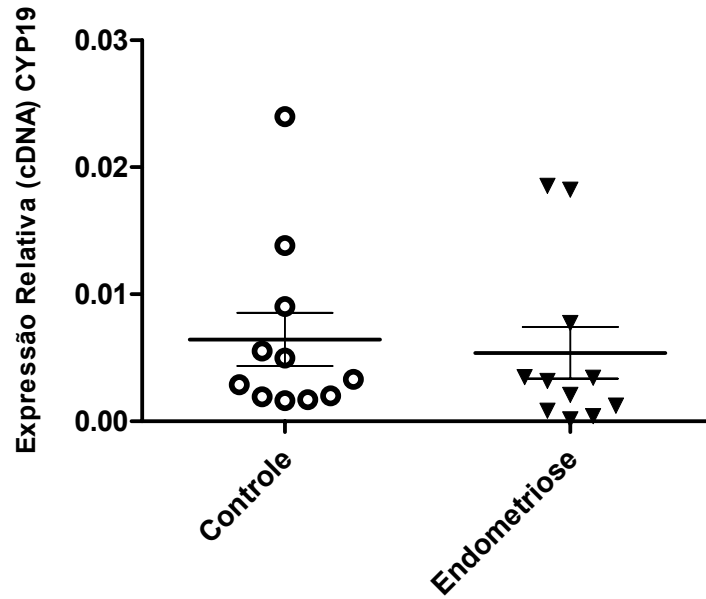
Tabela 5 – Valores de expressão gênica relativa obtidos por PCR em tempo real para o gene da aromatase (CYP19A1) após normalização ao da β -actina, em células da granulosa murais de mulheres com fatores tubáreo e/ou masculino; (grupo controle, N=11) vs endometriose nos graus mínimo/leve (N=5) e moderado/grave (N=7) submetidas à reprodução assistida (FIV ou ICSI). Como amostra de referência, aqui representado o próprio grupo controle (média do Ct absoluto).

Ct Aromatase CYP19 (Normalizado β - actina) Pacientes N°	Grupo Controle	Endometriose Mínima/Leve	Endometriose Moderada/Severa	Endometriose Todos Estádios
01	0,7791	0,8182	4,3471	4,3471
02	0,3997	0,0947	0,8043 (C1) 0,1960 (C2)	0,8043(C1) 0,1960(C2)
03	2,1165	1,8139	0,4903	0,4903
04	3,2442	0,2877	0,7485	0,7485
05	1,1704	4,2752	0,0355	0,0355
06	0,6784		0,0000	0,0000
07	0,4517			0,8182
08	0,4700			0,0947
09	1,2971			1,8139
10	5,6248			0,2877
11	0,3835			4,2752
12				
Média \pmDP	1,385 \pm 1,609	1,458 \pm 1,710	0,9460 \pm 1,534	1,159 \pm 1,555
Mediana	0,7288	0,8182	0,4903	0,6194

Legenda: Ct= "Threshold cycle". C1=1° e C2=2° ciclos de HOC da paciente 02 (endometriose moderada/severa).

Gráfico 1 – Expressão gênica relativa, por PCR em tempo real, da aromatase (gene CYP19A1) em células da granulosa luteinizadas murais de mulheres com endometriose (todos estádios, N=12) vs. mulheres com fatores tubáreo e/ou masculino de infertilidade (N=11), submetidas a técnicas de reprodução assistida. ($p>0,05$, Mann Whitney). Gráficos representam cálculos quando foram usadas como amostra de referência: a) placenta e b) média do Ct absoluto do grupo controle. Ct="Threshold cycle"

a)



b)

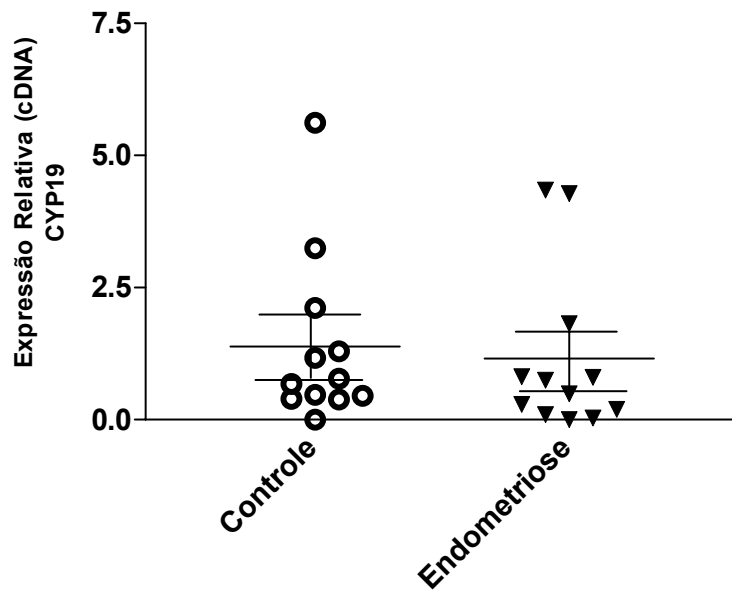
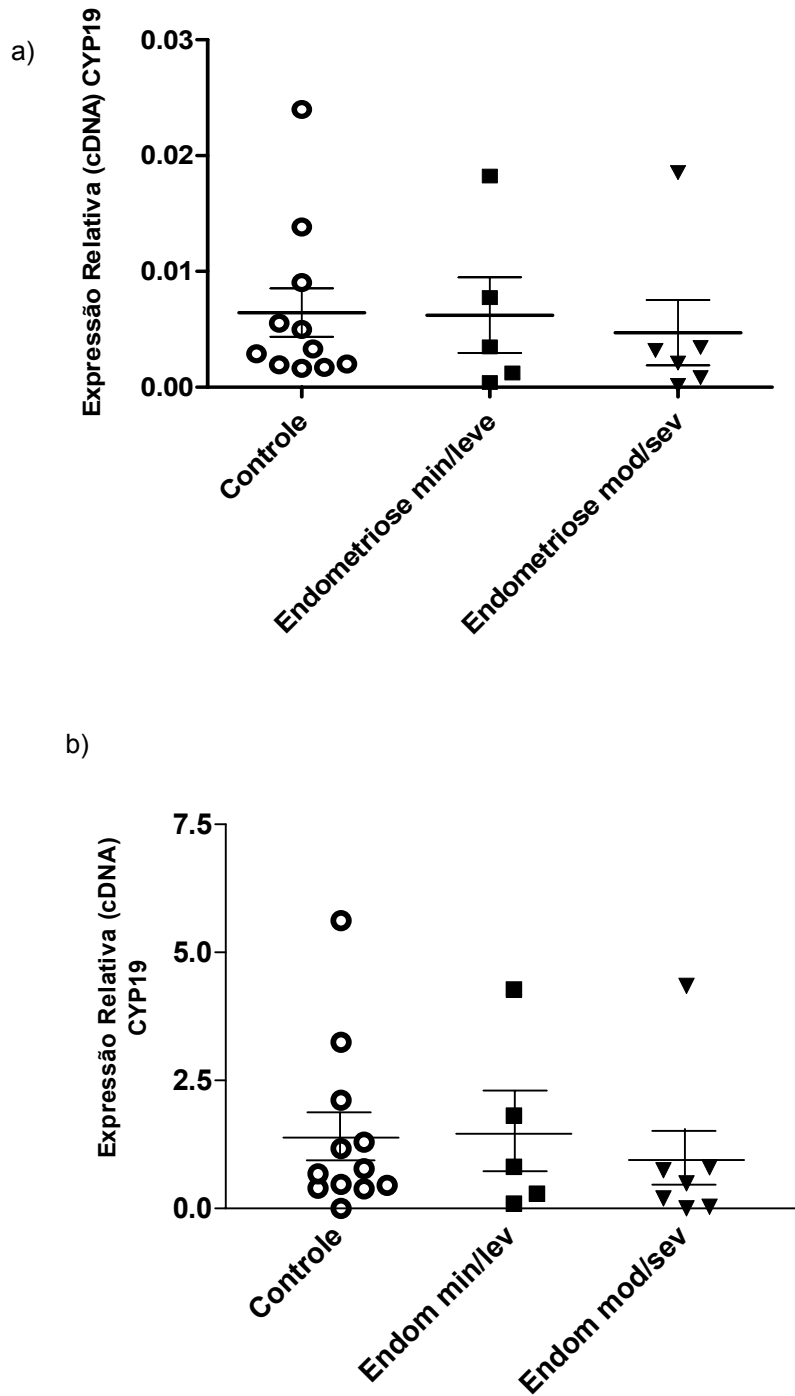


Gráfico 2 – Expressão gênica relativa, por PCR em tempo real, da aromatase (CYP19A1) em células da granulosa luteinizadas murais de mulheres com endometriose vs. controle submetidas a técnicas de reprodução assistida. A comparação foi realizada entre os grupos (1) controle (fator tubáreo/masculino; N=11); (2) endometriose leve e mínima (N=5); (3) endometriose moderada e severa (N=7). ($p > 0.05$, Kruskal-Wallis com correlação de Dunn). Gráficos representam cálculos quando foram usadas como amostra de referência a) placenta e b) média do Ct absoluto do grupo controle. Ct="Threshold cycle".



6. DISCUSSÃO

O foco do presente estudo foi a análise da atividade esteroidogênica nas células da granulosa em mulheres com endometriose. A análise da enzima aromatase para esse propósito é pertinente pelos motivos já descritos: 1) a importância dessa enzima na célula da granulosa como ponto final da esteroidogênese intrafolicular, pois é a responsável por converter os andrógenos a estrógenos, sem os quais não se conquista a maturação folicular. E a maturidade folicular é um dos principais determinantes da qualidade oocitária, já que é resultado de um complexo processo de sinergismo entre oócito e célula da granulosa em resposta às gonadotrofinas e ao IGF-1 (MITWALLY; CASPER, 2002; 2004); 2) vários pesquisadores já apontaram defeitos especificamente na aromatase, na sua atividade e na expressão de seu gene, CYP19A1, principalmente nas lesões de endometriose e no endométrio tóxico de mulheres com endometriose (BULUN et al., 1995; NOBLE et al., 1996; ZEITOUN; BULUN, 1999; NEME et al., 2001; BULUN et al., 2002; GURATES et al., 2003; HEILIER et al., 2006). Nas células da granulosa, um grupo de pesquisadores (HARLOW et al., 1996), através de estudos *in vitro* por meio de cultivo de células da granulosa luteinizadas coletadas em procedimentos de reprodução assistida, encontraram redução da atividade da aromatase em mulheres com endometriose mínima e leve e, posteriormente, encontraram uma menor sensibilidade dessas células ao LH (CAHILL et al., 2003). Abreu et al., 2005, como já descrito previamente, através de estudo que usou o

mesmo modelo de cultivo de células da granulosa em mulheres com endometriose, também encontrou redução na atividade da aromatase quando em níveis basais do cultivo e no grupo onde foi adicionada testosterona em sua menor concentração ($2 \times 10^{-6}M$), mesma usada por Harlow et al. (1996).

Estes achados associados às evidências de que a endometriose é uma doença com herança poligênica (D'HOOGHE et al., 2003; CROSIGNANI et al., 2006), nos estimulou a estudar a expressão do gene da aromatase no mesmo tecido e população-alvo, as células da granulosa luteinizadas murais, aqui não cultivadas, em mulheres com endometriose submetidas a técnicas de reprodução assistida, por técnica de PCR em tempo real quantitativo. Porém, de acordo com os resultados obtidos, não foi encontrada diferença entre os grupos (Gráficos 1,2). Estes achados podem ter ocorrido devido a três principais razões: 1) a alteração da qualidade oocitária nas mulheres com endometriose pode ocorrer em algum dos pontos da cascata esteroidogênica ovariana, porém antes da aromatase (sítio de conversão do C21 a C19). De fato, estudos *in vivo* e *in vitro* sobre as relações hormonais intrafoliculares em fluido folicular e células da granulosa cultivadas de mulheres submetidas com ciclos estimulados, apontam para o fato de que a aromatase é uma enzima cuja ação se perpetua, mesmo quando se têm os efeitos bloqueadores dos agonistas do GnRH (DOR et al., 2000; COSTA et al. 2004; SILVA et al., 2008).

Em segundo lugar, exatamente a ação do análogo do GnRH em ciclos de hiperestimulação ovariana controlada leva à redução dos

andrógenos intrafoliculares tanto *in vitro* quanto *in vivo* (SILVA et al., 2008). Esta redução androgênica, que na verdade corresponde à diminuição do substrato da aromatase, pode induzir a um mecanismo de “feedback” negativo ou “down-regulation” de seus receptores nessas células, e talvez modificar a maneira como ocorre a expressão de seu gene nesse tecido e 3) a aromatase parece sofrer um controle refinado, provavelmente por via de sinalizadores moleculares, mecanismo ainda não compreendido, porém muito pertinente, tendo em vista a importância fundamental dessa enzima na determinação de um ambiente pró-estrogênico intrafolicular.

A existência das “gap-junctions” entre as células da granulosa (SPEROFF; FRITZ, 2005) e a existência de interação entre células da granulosa e oócito, recentemente sinalizados através da identificação de moléculas como o GDF-9 e o BMP-15 (HUTT; ALBERTINI, 2007) são pistas de que o mecanismo e o processo de foliculogênese pode ser ainda muito mais complexo e orquestrado do que imaginamos. E, ainda, que o oócito pode interferir nesse processo.

Os mecanismos de modificações pós-transcricionais e epigenéticas são dois outros potentes candidatos para se tentar explicar por que a atividade da aromatase pode estar reduzida, mas não sua expressão gênica, neste tecido-alvo, as células da granulosa em mulheres com endometriose. Os mecanismo epigenéticos, através das ligações proteínas-ácidos nucléicos representam um mecanismo de “liga-desliga” da expressão gênica (NIEMANN et al., 2008) e a endometriose pode ter um mecanismo epigenético de inibição da expressão gênica nas

células da granulosa que ainda se desconhece. As alterações pós-transcricionais como alterações do receptor da aromatase nas células da granulosa ou alterações bioquímicas em sua molécula que possam alterar a sua atividade, mas não sua expressão gênica, é outra hipótese que precisa ser investigada.

O próximo passo surgirá possivelmente a partir de possíveis contribuições provenientes dos “microarrays” em oócitos e células da granulosa, bem como o entendimento do papel de cada subpopulação (célula da granulosa mural e do *cumulus*) na tentativa de esclarecer qual(is) via(s) se encontram mais afetadas nessa enigmática doença.

Obviamente, a endometriose sempre precisará de uma avaliação particularizada, pois apresenta uma ampla variedade de quadro clínico (VERCELLINI et al., 2007) e possivelmente um determinado fator ou via etiopatogêncica envolvida em uma apresentação da doença pode não ocorrer em outra. Especialmente sobre a questão da qualidade oocitária, os graus mínimo e leve parecem ter um comportamento completamente diferente dos graus moderado e grave (classificação ASRM), já que apresentam taxas de infertilidade e de gestação espontânea também diferentes (D’HOOGHE et al., 2003). Portanto, na endometriose, por seu aspecto tão heterogêneo e complexo e também por ser uma das mais onerosas doenças em medicina reprodutiva, o auxílio da biologia molecular, com uso dos recursos e avanços dos campos de estudo da genômica e proteômica, se faz fundamental.

O presente estudo, devido às suas limitações, principalmente em termos de tamanho amostral reduzido e vieses de seleção, não permite

que se possa chegar a uma conclusão consistente sobre o assunto: “expressão gênica da aromatase nas células da granulosa em mulheres com endometriose”, pelo contrário, apenas inicia este capítulo já que não se tem na literatura pesquisas sobre o tema, e estimula questionamentos que podem ser respondidos nos próximos estudos.

Como próximos passos ainda, além dos “microarrays”, a endometriose necessita de estudos compartimentalizados porém com amostras maiores do que a utilizada no presente estudo. Ainda o estudo genético populacional através dos polimorfismos de genes-alvo estratégicos como a aromatase também é uma estratégia fundamental para que avancemos em termos de compreensão da doença e intervenção terapêutica, que no caso da infertilidade e endometriose, apesar do importante passo com o advento das técnicas de reprodução assistida, os resultados apresentados ainda são insatisfatórios (BARNHART et al., 2002).

7. CONCLUSÃO

No presente estudo, não foi observada diferença significativa na expressão do gene da aromatase (CYP19A1) nas células da granulosa murais luteinizadas de mulheres com endometriose submetidas a técnicas de reprodução assistida (FIV ou ICSI), analisada através de PCR real-time quantitativo, quando comparadas com mulheres sem a doença.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdalla H, Thum MY. An elevated basal FSH reflects a quantitative rather than qualitative decline of the ovarian reserve. *Hum Reprod*;19(4):893-8, 2004.

Abreu LG, Carvalho BR, Barcelos IDE, Rosa e Silva ACJS, Ferriani RA, Rosa e Silva JC. Laparoscopic treatment of endometriosis focusing on fertility outcomes. *Expert Rev Obstet Gynecol*; 3(2), 203-9, 2008.

Abreu LG, Romão GS, Ferriani RA, Reis RM, Silva de Sá, MF, Moura MD. Reduced aromatase activity in granulosa cells of women with endometriosis undergoing assisted reproduction techniques. *Gynecol Endocrinol*; 22(8): 432-6, 2006.

Acién P, Velasco I, Gutiérrez M, Martínez-Beltrán M. Aromatase expression in endometriotic tissues and its relationship to clinical and analytical findings. *Fertil Steril*; 88(1): 32-8, 2007.

Aguiar FM, Abreu LG, Rosa e Silva, JC, Reis RM, Ferriani RA, Moura MD. Etiopatogenia da endometriose: O que há de novo?. *Femina*; 33 (6):415-420, 2005.

Albertini DF, Barrett SL. Oocyte-somatic cell communication. *Reprod Suppl*; 61:49-54, 2003.

Arvanitis DA, Koumantakis GE, Goumenou AG, Matalliotakis IM, Koumantakis, EE, Spandidos DA. CYP1A1, CYP19, and GSTM1 polymorphisms increase the risk of endometriosis. *Fertil Steril*; 79:702-9, 2003.

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*; 85:2897-902, 2000.

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

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*; 78: 830-35, 2002.

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

Brosens I, Campo R, Gordts S. Reproductive disorders affecting fertility in endometriosis. *Reprod Biomed Online*; 4 (Suppl 3):59-63, 2002.

Bukulmez O, Hardy DB, Carr BR, Word RA, Mendelson CR. Inflammatory status influences aromatase and steroid receptor expression in endometriosis. *Endocrinology*; 149(3):1190-204, 2008.

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*; 55:21-33, 2002.

Bulun SE, Imir G, Utsunomiya H, Thung S, Gurates B, Tamura M, Lin Z. Aromatase in endometriosis and uterine leiomyomata. *J Steroid Biochem Mol Biol*; 95:57-62, 2005.

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*; 76:1458-63, 1995.

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

Chang SY, Kang HY, Lan KC, Chang CY, Huang FJ, Tsai MY, Huang KE. Expression of steroid receptors, their cofactors, and aromatase in human luteinized granulosa cells after controlled ovarian hyperstimulation. *Fertil Steril*; 83(Suppl 1):1241-7, 2005.

Combelles CM, Carabatsos MJ, Kumar TR, Matzuk MM, Albertini DF. Hormonal control of somatic cell oocyte interactions during ovarian follicle development. *Mol Reprod Dev*; 69(3):347-55, 2004.

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

Costa LO, Mendes MC, Ferriani RA, Moura MD, Reis RM, Silva de Sá MF. Estradiol and testosterone concentrations in follicular fluid as criteria to

discriminate between mature and immature oocytes. *Braz J Med Biol Res*;37(11):1747-55, 2004.

Crosignani P, Olive D, Bergqvist A, Luciano A. Advances in the management of endometriosis: an update for clinicians. *Hum Reprod Update*; 2(2):179-89, 2006.

De Geyter C, Kossowska K, Zhang H, Gao S, De Geyter M, Martin I, Scherberich A. Poster Luteinizing granulosa cells collected from mature ovarian follicles can be developed into mesenchymal stem cells. In: Annual Meeting of ESHRE, 2006, Praga. *Human Reproduction (Annals of XXII ESHRE annual meeting)*; 21:P-438, 2006.

D'Hooghe TM, Debrock S, Hill J & Meuleman, C. Endometriosis and Subfertility: Is the Relationship Resolved? *Semin Reprod Med*; (21):2: 243-253, 2003.

Diaz I, Navarro J, Blasco L, Simo'n C, Pellicer A, Remohi J. Impact of stage III–IV endometriosis on recipients of sibling oocytes: matched case–control study. *Fertil Steril*; 74:31-4, 2000.

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*; 16:1802-08, 2001.

Dor J, Bider D, Shulman A, Levron JL, Shine S, Mashiach S, Rabinovici J. Effects of gonadotrophin-releasing hormone agonists on human ovarian steroid secretion in vivo and in vitro—results of a prospective, randomized in-vitro fertilization study. *Hum Reprod*; 5(6):1225-30, 2000.

Dunselman GA, Hendrix MG, Bouckaert PX, Evers JL. Functional aspects of peritoneal macrophages in endometriosis of women. *J Reprod Fertil*; 82:707-10, 1988.

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*;69:716-24, 1989.

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*; 87: 3460-66, 2002.

Ferriani RA, Petta CA, Abrão MS. Papel Atual da Reprodução Assistida na Endometriose. In: Abrão MS. Endometriose – uma visão contemporânea. Rio de Janeiro: Revinter, 169-75, 2000.

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*; 13:1455-60, 1998.

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

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

Garcia-Velasco JA, Arici A. Is the endometrium or oocyte/embryo affected in endometriosis? *Hum Reprod*; 14(Suppl 2):77-89, 1999.

Garrido N, Navarro J, García-Velasco J, Remoh J, Pellice A, Simón C. The endometrium versus embryonic quality in endometriosis-related infertility. *Hum Reprod Update*; 8(1):95-103, 2002.

Gomes FM, Navarro PA, de Abreu LG, Ferriani RA, dos Reis RM, de Moura MD. Effect of peritoneal fluid from patients with minimal/mild endometriosis on progesterone release by human granulosa-lutein cells obtained from infertile patients without endometriosis: a pilot study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*; 38(1):60-5, 2008.

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*; 14:1182-89, 1999.

Gupta S, Goldberg JM, Aziz N, Goldberg E, Krajcir N, Agarwal A. Pathogenic mechanisms in endometriosis-associated infertility. *Fert Steril*; 90(2):247-57, 2008.

Gurates B, Bulun SE. Endometriosis: the ultimate hormonal disease. *Semin Reprod Med*; 21(2):125-34, 2003.

Harlow CR, Cahill LA, Maile WM, Talbot J, Mears PG, Hull MGR. Reduced preovulatory granulosa cell steroidogenesis in women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*; 81:426–9, 1996.

Heilier JF, Donnez O, Van Kerckhove V, Lison D, Donnez J. Expression of aromatase (P450 aromatase/CYP19) in peritoneal and ovarian endometriotic tissues and deep endometriotic (adenomyotic) nodules of the rectovaginal septum. *Fertil Steril*; 85(5):1516-8, 2006.

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

Hutt KJ, Albertini DF. An oocentric view of folliculogenesis and embryogenesis. *Reprod Biomed Online*;14(6):758-64, 2007.

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*; 144:2870-81, 2003.

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

Kennedy S, Bergqvist A, Chapron C, D'Hooghe T, Dunselman G, Greb R, Hummelshoj L, Prentice A, Saridogan E. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum Reprod*; 20(10):2698-704, 2005.

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*; 83:149–55, 2002.

Kyama CM, Overbergh L, Mihalyi A, Meuleman C, Mwenda JM, Mathieu C, D'Hooghe TM. Endometrial and peritoneal expression of aromatase, cytokines, and adhesion factors in women with endometriosis. *Fertil Steril*; 89(2):301-10, 2008.

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

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta CT) Method. *Methods*; 25(4):402-8, 2001.

Matalliotakis IM, Cakmak H, Mahutte N, Fragouli Y, Arici A, Sakkas D. Women with advanced-stage endometriosis and previous surgery respond less well to gonadotropin stimulation, but have similar IVF implantation and delivery rates compared with women with tubal factor infertility. *Fertil Steril*; 88(6):1568-72, 2007.

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

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

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

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

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

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

Niemann H, Tian XC, King WA, Lee RS. Epigenetic reprogramming in embryonic and fetal development upon somatic cell nuclear transfer cloning. *Reproduction*; 135(2):151-63, 2008.

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

Noble LS, Simpson E, Johns A, Bulun SE. Aromatase expression in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*; 81:174-9, 1996.

Olive DL, Weinberg JB, Haney AF. Peritoneal macrophages and infertility: the association between cell number and pelvic pathology. *Fertil Steril*; 44:772-7, 1985.

Oliveira VA, Abreu LG, Ferriani RA, Reis RM, Moura MD. Vascular endothelial growth factor in the plasma, follicular fluid and granulosa cells of women with endometriosis submitted to in vitro fertilization--a pilot study. *Gynecol Endocrinol*; 20(5):284-8, 2005.

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*; 56:45-51, 1991.

(A) 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*; 70:425-30, 1998.

(B) 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: steroid levels and embryo quality. *Fertil Steril*; 69:1135-41, 1998.

Revised American Society for Reproductive Medicine Classification of Endometriosis:1996. *Fertil Steril*; 67: 817-21, 1997.

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

Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol*; 14:422-69, 1927.

Schenken RS. Treatment of human infertility: the special case of endometriosis. In: Adashi EY, Rock JA, Rosenwaks Z, editors. *Reproductive endocrinology, surgery and technology*. Philadelphia (PA): Lippincott-Raven; p 2121-37, 1996.

Silva ALA, Rosa e Silva ACJS, Abreu LG, Ferriani RA, Silva de Sá MF. Leuprolide acetate reduces both in vivo and in vitro ovarian steroidogenesis in infertile women undergoing assisted reproduction. *Steroids*; 73:1475-84, 2008.

Speroff L & Fritz MA. Regulation of the Menstrual Cycle. In: Speroff L & Fritz, MA. Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility. 7. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins p. 187-231; 2005.

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

Templeton A, Morris JK, Parslow W. Factors that affect outcome of in-vitro fertilisation treatment. *Lancet*; 23,348(9039):1402-6, 1996.

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

Thomas FH, Vanderhyden BC. Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth. *Reprod Biol Endocrinol*; 12;4:19, 2006.

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*; 73:344-50, 2002.

Vercellini P, Fedele L, Aimi G, Pietropaolo G, Consonni D, Crosignani PG. Association between endometriosis stage, lesion type, patient characteristics and severity of pelvic pain symptoms: a multivariate analysis of over 1000 patients. *Hum Reprod* 22(1):266-71, 2007.

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*; 62:1086-8, 1994.

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

Wheeler JM. Epidemiology of Endometriosis-Associated Infertility. *J Reprod Med*; 34:41-6, 1989.

Wright VC, Chang J, Jeng G, Chen M, Macaluso M Assisted reproductive technology surveillance - United States, 2004. *MMWR Surveill Summ*. 8;56(6):1-22, 2007.

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

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

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*; 13:78-82, 1987.

ANEXOS

ANEXO I

**CÁLCULO DA EXPRESSÃO GÊNICA RELATIVA (MÉTODO $2^{-\Delta\Delta Ct}$;
LIVAK ET AL., 2001)**

O cálculo da normalização da expressão gênica ao gene endógeno e à amostra de referência foi realizada utilizando-se as fórmulas:

$$\Delta Ct = Ct (\text{CYP19A1}) - Ct \beta\text{-actina};$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ amostra de interesse} - \Delta Ct \text{ amostra de referência.}$$

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ = fórmula utilizada para quantificação da expressão relativa do gene da aromatase em relação ao gene da β -actina, usando como amostra de referência a placenta (**Tabelas 1 e 2**) ou as células da granulosa do grupo controle (**Tabelas 3 e 4**).

Tabela 1 – Níveis de Ct (threshold cycle) comparativos entre os genes aromatase (CYP19A1) e β -actina obtidos por PCR em tempo real, para análise da expressão gênica relativa em células da granulosa murais de mulheres com fatores tubáreo ou masculino submetidas a técnicas de reprodução assistida. Placenta como amostra de referência.

Ct Comparativo										
Paciente N°	AROMATASE (CYP19)	Média	DP	β -ACTINA	Média	DP	Δ Ct	DP (Δ Ct)	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
01	27,6026 27,5947	27,599	0,006	22,5086 22,5086	2,509	0,000	5,090	0,0000	8,2327	0,0033
02	26,0095 26,2485	26,129	0,169	19,9716 20,1802	20,076	0,148	6,053	0,0252	9,1958	0,0017
03	23,9989 23,9763	23,988	0,016	20,2362 20,4424	20,339	0,146	3,648	0,0108	6,7910	0,0090
04	20,8751 20,8211	20,848	0,038	18,0222 17,6097	17,816	0,292	3,032	0,0433	6,1748	0,0138
05	26,4174 25,9648	26,191	0,320	21,5941 21,782	21,688	0,133	4,503	0,0600	7,6457	0,0050
06	27,0075 26,6059	26,807	0,284	21,4559 21,5778	21,517	0,086	5,290	0,0440	8,4325	0,0029
07	26,2209 26,1272	26,174	0,066	20,2611 20,3337	20,297	0,051	5,877	0,0035	9,0193	0,0019
08	29,5236 29,9585	29,741	0,308	23,6901 24,1536	23,922	0,328	5,819	0,1010	8,9619	0,0020
09	30,131 30,9116	30,521	0,552	26,215 26,1182	26,167	0,068	4,355	0,1547	7,4974	0,0055
10	23,3947 23,2563	23,326	0,098	21,1645 21,0101	21,087	0,109	2,238	0,0107	5,3809	0,0240
11	29,0394 29,4491	29,244	0,290	23,1049 23,1579	23,131	0,037	6,113	0,0427	9,2555	0,0016
Placenta	17,209 17,041	17,125	0,119	20,0306 20,5047	20,268	0,335	-3,143	0,0632	0,0000	1,000

Tabela 2 – Níveis de Ct (threshold cycle) comparativos entre os genes aromatase (CYP19A1) e β -actina obtidos por PCR em tempo real, para análise da expressão gênica relativa em células da granulosa mural de mulheres com endometriose submetidas a técnicas de reprodução assistida. Placenta como amostra de referência. NA= não se aplica (amplificação nula para o gene da aromatase). C1=1° e C2=2° ciclos de HOC paciente 08.

Ct Comparativo										
Paciente N°	AROMATASE (CYP19)	Média	DP	β -ACTINA	Média	DP	Δ Ct	DP (Δ Ct)	$\Delta\Delta$ Ct	2 ^{$\Delta\Delta$Ct}
01	27,1022	27,239	0,193	24,5945	24,629	0,049	2,610	0,0198	5,7526	0,0185
	27,3753			24,6631						
02	26,6939	26,692	0,003	20,9338	20,934	0,000	5,758	0,0000	8,9010	0,0021
	26,6903			20,9338						
03	30,1604	29,787	0,528	24,638	24,768	0,183	5,019	0,1562	8,1621	0,0035
	29,4138			24,8973						
04	32,6201	32,580	0,057	24,4042	24,450	0,064	8,130	0,0037	11,2728	0,0004
	32,5394			24,4951						
05	29,7922	30,319	0,745	26,5925	26,448	0,204	3,871	0,2984	7,0136	0,0077
	30,8459			26,3038						
06	30,093	30,548	0,644	24,3469	24,021	0,461	6,527	0,3135	9,6699	0,0012
	31,0035			23,6951						
07	21,5139	21,617	0,146	19,0755	18,983	0,131	2,634	0,0192	5,7767	0,0182
	21,7205			18,8909						
08	26,5984	26,424	0,247	21,4029	21,380	0,033	5,044	0,0311	8,1869	0,0034
	26,2491			21,3561						
C2	31,0822	31,138	0,078	24,0759	24,056	0,028	7,081	0,0035	10,2241	0,0008
	31,1929			24,0364						
09	0	0	0	32,9751	33,045	0,099	NA	NA	NA	NA
	0			33,1153						
10	28,1726	28,482	0,437	23,0111	23,334	0,456	5,148	0,1994	8,2907	0,0032
	28,7905			23,656						
11	27,8934	27,961	0,095	18,5017	18,415	0,123	9,546	0,0121	12,6884	0,0002
	28,0277			18,328						
Placenta	17,209	17,125	0,119	20,0306	20,268	0,335	-3,143	0,0632	0,0000	1,0000
	17,041			20,5047						

Tabela 3 – Níveis de Ct (threshold cycle) comparativos entre os genes aromatase (CYP19A1) e β -actina obtidos por PCR em tempo real, para análise da expressão gênica relativa em células da granulosa murais de mulheres com fatores tubáreo ou masculino de Infertilidade (grupo controle) submetidas a técnicas de reprodução assistida. Amostra de referência = média do Ct do próprio grupo controle (valor absoluto).

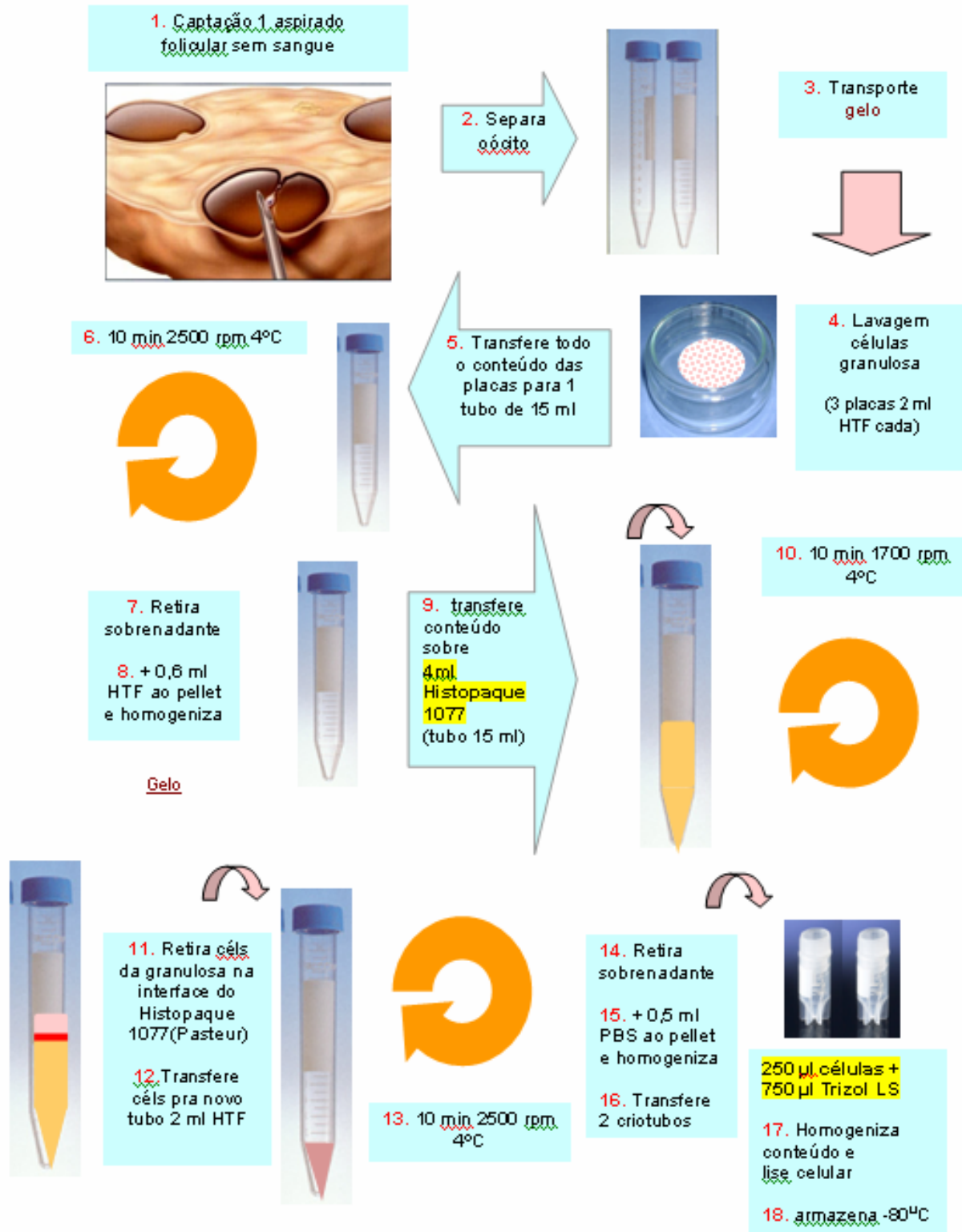
Ct Comparativo										
Paciente N°	AROMATASE (CYP19)	Média	DP	β -ACTINA	Média	DP	Δ Ct	DP (Δ Ct)	$\Delta\Delta$ Ct	2 ^{$\Delta\Delta$Ct}
01	27,6026 27,5947	27,599	0,006	22,5086 22,5086	22,509	0,000	5,090	0,0000	0,3600	0,7791
02	26,0095 26,2485	26,129	0,169	19,9716 20,1802	20,076	0,148	6,053	0,0252	1,3231	0,3997
03	23,9989 23,9763	23,988	0,016	20,2362 20,4424	20,339	0,146	3,648	0,0108	-1,0817	2,1165
04	20,8751 20,8211	20,848	0,038	18,0222 17,6097	17,816	0,292	3,032	0,0433	-1,6979	3,2442
05	26,4174 25,9648	26,191	0,320	21,5941 21,782	21,688	0,133	4,503	0,0600	-0,2270	1,1704
06	27,0075 26,6059	26,807	0,284	21,4559 21,5778	21,517	0,086	5,290	0,0440	0,5599	0,6784
07	26,2209 26,1272	26,174	0,066	20,2611 20,3337	20,297	0,051	5,877	0,0035	1,1467	0,4517
08	29,5236 29,9585	29,741	0,308	23,6901 24,1536	23,922	0,328	5,819	0,1010	1,0892	0,4700
09	30,131 30,9116	30,521	0,552	26,215 26,1182	26,167	0,068	4,355	0,1547	-0,3753	1,2971
10	23,3947 23,2563	23,326	0,098	21,1645 21,0101	21,087	0,109	2,238	0,0107	-2,4918	5,6248
11	29,0394 29,4491	29,244	0,290	23,1049 23,1579	23,131	0,037	6,113	0,0427	1,3829	0,3835
Amostra referência media Ct grupo controle		26,42	2,836		21,69	2,175	4,730	6,3868	0,0000	1,0000

Tabela 4 – Níveis de Ct (threshold cycle) comparativos entre os genes aromatase (CYP19A1) e β -actina obtidos por PCR em tempo real, para análise da expressão gênica relativa em células da granulosa murais de mulheres com endometriose submetidas a técnicas de reprodução assistida. Amostra de referência = média do Ct do próprio grupo controle (valor absoluto). NA= não se aplica (amplificação nula para o gene da aromatase). C1=1° e C2=2° ciclos de HOC paciente 08.

Ct Comparativo										
Paciente N°	AROMATASE (CYP19)	Média	DP	β -ACTINA	Média	DP	Δ Ct	DP (Δ Ct)	$\Delta\Delta$ Ct	2 ^{$\Delta\Delta$Ct}
01	27,1022 27,3753	27,239	0,193	24,5945 24,6631	24,629	0,049	2,610	0,0198	-2,1201	4,3471
02	26,6939 26,6903	26,692	0,003	20,9338 20,9338	20,934	0,000	5,758	0,0000	1,0283	0,4903
03	30,1604 29,4138	29,787	0,528	24,638 24,8973	24,768	0,183	5,019	0,1562	0,2894	0,8182
04	32,6201 32,5394	32,580	0,057	24,4042 24,4951	24,450	0,064	8,130	0,0037	3,4001	0,0947
05	29,7922 30,8459	30,319	0,745	26,5925 26,3038	26,448	0,204	3,871	0,2984	-0,8591	1,8139
06	30,093 31,0035	30,548	0,644	24,3469 23,6951	24,021	0,461	6,527	0,3135	1,7973	0,2877
07	21,5139 21,7205	21,617	0,146	19,0755 18,8909	18,983	0,131	2,634	0,0192	-2,0960	4,2752
08										
C1	26,5984 26,2491	26,424	0,247	21,4029 21,3561	21,380	0,033	5,044	0,0311	0,3142	0,8043
C2	31,0822 31,1929	31,138	0,078	24,0759 24,0364	24,056	0,028	7,081	0,0035	2,3514	0,1960
09	0 0	0	0	32,9751 33,1153	33,045	0,099	NA	NA	NA	NA
10	28,1726 28,7905	28,482	0,437	23,0111 23,656	23,334	0,456	5,148	0,1994	0,4180	0,7485
11	27,8934 28,0277	27,961	0,095	18,5017 18,328	18,415	0,123	9,546	0,0121	4,8157	0,0355
Amostra referência										
media Ct grupo controle		26,42	2,836		21,69	2,175	4,730	6,3868	0,0000	1,0000

ANEXO II

Procedimento de Isolamento das Células da Granulosa



ANEXO III



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Comitê de Ética em Pesquisa



Fone: (16) 3633-2228 / Fax: (16) 3633-1144
cep@hop.fmrp.usp.br www.hop.fmrp.usp.br

Campus Universitário - Monte Alegre
14040-900 Ribeirão Preto - SP

Ribeirão Preto, 05 de abril de 2006.

Ofício nº 902/2006
CEP/MOV

Prezada Senhora:

O trabalho intitulado "EXPRESSION DO GENE DA AROMATASE NAS CÉLULAS DA GRANULOSA DE MULHERES COM ENDOMETRIOSE SUBMETIDAS A TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA", foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 222ª Reunião Ordinária realizada em 03/04/2006, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com o Processo HCRP nº 15346/2005.

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

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa do
HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssima Senhora
LAURIANE GISELE DE ABREU
PROF. DR. MARCOS FELIPE SILVA DE SÁ (Orientador)
Depto. de Ginecologia e Obstetria
Em mãos

ANEXO IV

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____
_____ abaixo assinado, tendo sido devidamente informada, através do documento “ESCLARECIMENTO AO SUJEITO DA PESQUISA” (anexo 2), sobre todas as condições da pesquisa chamada “EXPRESSÃO DO GENE DA AROMATASE EM CÉLULAS DA GRANULOSA DE MULHERES COM ENDOMETRIOSE SUBMETIDAS A TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA”, que tem como pesquisadora responsável a pós-graduanda Lauriane Giselle de Abreu e como orientador o Prof. Dr. Marcos Felipe Silva de Sá, docente deste serviço; e conhecendo principalmente o objetivo da pesquisa, os procedimentos a que serei submetida por causa desta pesquisa, seus riscos e benefícios, a forma de ressarcimento no caso de eventuais despesas, bem como a forma de indenização por danos decorrentes do estudo, declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições descritas abaixo:

1. A garantia de obter resposta a qualquer dúvida sobre os procedimentos que farei durante a pesquisa, sobre os possíveis riscos que poderei sofrer pela participação na pesquisa, bem como os benefícios que este estudo poderá trazer;
2. A liberdade de retirar o meu consentimento e deixar de participar do estudo a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo nenhum ao meu tratamento de reprodução assistida ou à sua continuidade;
3. A segurança de que não serei identificada e que toda a informação sobre mim e meu prontuário médico, bem como sobre a minha participação nesta pesquisa serão confidenciais;
4. O compromisso dos pesquisadores de que serei informada sobre o andamento da pesquisa, ainda que estes dados possam afetar a minha vontade de continuar participando do estudo;
5. O compromisso de que serei devidamente acompanhada e que será prestada toda a assistência necessária a mim durante o tempo em que estiver participando do estudo, bem como de que será garantida a continuidade do meu tratamento mesmo após o término 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:

“ Expressão do Gene da Aromatase em Células da Granulosa de Mulheres Com Endometriose Submetidas a Técnicas de Reprodução Assistida”

2. PESQUISADORA RESPONSÁVEL: LAURIANE GISELLE DE ABREU,
CRM/SP N^o 111.248 (Doutoranda USP/ RIBEIRÃO PRETO)

Endereço: Av. Bandeirantes n^o 3900; laboratório de GO 1^o. Andar; Hospital das Clínicas/ FMRP/USP. Ribeirão Preto/SP; Telefones: (16) 3911-6840;8121-3017.

3. ORIENTADOR: PROFESSOR DOUTOR MARCOS FELIPE SILVA DE
SÁ

Contato: Av. Bandeirantes no. 3900; laboratório de GO 1^o. Andar
Hospital das Clínicas/ FMRP/USP. Ribeirão Preto/SP. Telefone: (16)3602-2231

4. PROMOTORA DA PESQUISA: FMRP/USP. Departamento de
Ginecologia e Obstetrícia. Av. Bandeirantes 3.900; HC 8^o
andar.Telefone: (16) 3602-2583

Vimos, por meio deste documento, solicitar sua participação neste estudo.

A endometriose é uma doença causada pela presença de células da camada interna do útero (endométrio) fora deste local. É uma causa freqüente de infertilidade em mulheres.

Ainda não se sabe exatamente por que a endometriose causa infertilidade. Parece que as células da endometriose podem interferir no amadurecimento do óvulo, dificultando sua fertilização. Tudo indica que esta interferência ocorre porque a endometriose atrapalha a função do óvulo prejudicando uma enzima chamada aromatase. Esta enzima é uma substância que as células do ovário chamadas células da granulosa produzem para ajudar na formação dos hormônios que os ovários necessitam. Sem estes hormônios o óvulo não amadurece.

Este trabalho vai pesquisar se as células da granulosa dos ovários das mulheres que têm endometriose estão realmente comprometidas e, portanto, produziram pouca aromatase.

Existe um gene que é responsável por comandar a produção da aromatase e é este gene que pode estar com defeito na endometriose.

Assim, o objetivo principal deste estudo é saber se existe alguma alteração na produção da aromatase comandada pelo seu gene nas células da granulosa das mulheres que têm a doença endometriose.

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 - Fertilização in Vitro e ICSI – Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide, ou seja, técnica em que se injeta o espermatozóide dentro do óvulo). No final do estudo, realizaremos a comparação entre estes dois grupos e checaremos se há diferença na maneira como a aromatase é produzida pelo seu gene nas células da granulosa.

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. A participação no estudo não causará nenhuma interferência no seu procedimento de reprodução assistida e, inclusive, você não precisará realizar nenhum procedimento além daqueles que serão normalmente programados para o seu processo de reprodução assistida. Isto porque o material que utilizaremos no estudo é um material que normalmente é desprezado após a coleta e separação do óvulo. Desta maneira, pretendemos, com o seu consentimento, usar este material contendo as células da granulosa para pesquisar sua produção de aromatase, como já foi exposto previamente.

Reforçamos que a importância deste estudo será tentar desvendar um dos possíveis motivos da infertilidade na endometriose, que é a análise do funcionamento do óvulo nestas mulheres, através do estudo da aromatase. Os resultados desta pesquisa poderão no futuro propiciar o desenvolvimento de procedimentos ou medicamentos que melhorem o tratamento de mulheres inférteis que têm endometriose.

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.

Atenciosamente,

Os pesquisadores.

ANEXO V



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

Av. Bandeiraantes, 3900 - 1º andar - Ribeirão Preto-SP - CEP 14049- 900
Fone (016) 833-8216 - Fax (016) 833-8946
Setor de Reprodução Humana

REPRODUÇÃO ASSISTIDA

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____ e meu marido, _____, nos subscritamos livremente a participar de procedimentos que visam a obtenção de uma gestação devido a infertilidade uterina. Fornecemos informações 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 doutores, médicas e assistentes a realizarem os seguintes procedimentos assistidos:

INSEMINAÇÃO INTRA-ÚTERO

- SIM
- NÃO
- NÃO SE APLICA

Para a realização de inseminação intra-útero (IUI) necessitamos a indução da ovulação e o preparo do sítio de inseminação (coeloculação) para posterior inseminação intra-útero. Para a realização desse procedimento entende-se que devemos utilizar drogas que podem ter efeitos colaterais, os quais não foram devidamente esclarecidos, sendo os principais o Síndrome de Hiperestimulação Ovariana e a Multiplicidade (gravidez múltipla). Inscritamos 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 caso o tratamento pode ser interrompido ou ser modado para evitar 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 nos preparos para futuras inseminações.

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

- SIM
- NÃO
- NÃO SE APLICA

Fornecemos informações de que para a realização de FIV 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 ultrasonografia transvaginal seriada; 3. captação de óvulos que se constitui da aspiração dos folículos luteais através de punção transvaginal guiada pelo ultra-som sob anestesia geral 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 uma convenção no dia da transferência; 6. free-lites que se constitui da utilização de medicações para suplantarem a produção de hormônios dos ovários. Autorizamos a realização de todas estas etapas acima descritas e nos responsabilizamos pela adequada utilização das medicações prescritas.

Fornecemos informações de que podem ocorrer falhas em diversos pontos do processo para realização de FIV ou ICSI: falha de resposta à indução da ovulação, ausência ou redução do número de óvulos captados e falha em obter taxa de fertilização dos óvulos inseminados, o que pode resultar em poucos ou nenhum embrião a serem transferidos. Autorizamos a equipe de profissionais responsáveis pelo nosso tratamento de quaisquer destas intercorrências que possam vir a ocorrer durante o nosso tratamento. Fornecemos também esclarecidos das taxas de gestação deste serviço.

Fornecemos informações de que podem ocorrer efeitos colaterais e/ou complicações decorrentes do uso das medicações induzindo a ovulação (Síndrome de Hiperestimulação Ovariana), da captação ovulária (surgimento no local da punção e risco anestésico) e dos riscos de gravidez múltipla. Inscritamos a equipe de todo o qualquer responsabilidade sobre as complicações ou efeitos colaterais que venham a ocorrer.

... a microinjeção (ICSI) é uma técnica onde é realizada a injeção de um único espermatozoide no interior de um óvulo.

Acordamos que a realização de FIV ou ICSI será de responsabilidade da equipe médica e de embriologistas responsáveis pelo nosso tratamento. Fornecemos informações de que a ICSI é técnica introduzida desde 1993 e até o momento os dados sobre o sucesso das técnicas de fertilização feitas em crianças nascidas após esta técnica não são conclusivos, mas são seguros frente este momento em relação ao sucesso em gestações espontâneas. Inscritamos a equipe de profissionais responsáveis pelo nosso tratamento de qualquer distúrbio pré-natal e neonatal congênito 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 manipulação de gametas (MZ) 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 pelo equipe médica. Entre os casos que não descongelações, alguns ou todos os embriões podem não sobreviver ao processo de descongelamento.

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 realização de outros descongelamentos e vitais, comprometemos com a doação anônima dos embriões para outro(s) casal(ais) que desejem gravidez.

Caso ocorra o falecimento de um dos doadores ou de ambos, durante os doações graves ou em um ou mais ciclos de tratamentos, que impliquem o(s) mesmo(s) a transferir(em) doação, autorizamos a doação anônima de todos os embriões armazenados para outro(s) casal(ais) que desejem gravidez.

No dia de realização do congelamento dos embriões não será fornecido ao casal termo de consentimento informado, sendo somente o número total de embriões que foram efetivamente congelados, sendo deixada rubrica.

Ficamos informados de que, caso não concordemos com a realização de congelamento de possíveis embriões remanescentes, optamos pela realização de um número máximo de 3 vitais (ou fixo produzido em número maior, se óvulos doados) no decorrer de um doador, conforme especificamos especifica sobre doação de óvulos).

DOAÇÃO DE ÓVULOS

SIM
 NÃO
 NÃO SE APLICA

Concordamos com a doação anônima de óvulos, que não fará parte quando o número de vitais obtidos for superior a 3, ou superior a 3 os doadores não congelar embriões. Entendemos também de que os critérios aplicados a partir da doação de óvulos são moral e legalmente de um país que o gerou, não havendo de razão para nenhum tratamento ao doador e sua evolução não de pedir direitos legais sobre estas crianças. Por isso informamos de que a autorização para doarem os óvulos em não influenciará o resultado da equipe de profissionais deste Serviço perante o nosso tratamento de fertilidade.

A doação não terá caráter lucrativo ou comercial e os doadores não devem fornecer a identidade dos receptores e vice-versa. Em situações especiais, as informações sobre os doadores, por motivo médico, poderá ser fornecidas exclusivamente para médicos, respeitando-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 de que duas gestações, de sexo diferentes, antes de um período de 12 meses. A exclusão 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. Entendemos também de que os critérios aplicados a partir de embriões doados são moral e legalmente de um país que não gerou este(s) filho(s), não havendo de razão para nenhum tratamento ao doador e sua evolução não de pedir direitos legais sobre estas crianças. A autorização para doarem os não embriões em não influenciará a postura de equipe de profissionais deste Serviço perante o nosso tratamento de fertilidade.

A doação não terá caráter lucrativo ou comercial e os doadores não devem fornecer a identidade dos receptores e vice-versa. Em situações especiais, as informações sobre os doadores, por motivo médico, podem ser fornecidas exclusivamente para médicos, respeitando-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 de que duas gestações, de sexo diferentes, antes de um período de 12 meses. A exclusão de doadores é de responsabilidade da unidade e, dentro do possível deverá garantir que o doador tenha a maior semelhança com a receptora.

- Terão lido com atenção e compreendido todos as informações contidas nos duas páginas deste documento, recebido informações adicionais e esclarecimentos, concordamos espontaneamente em participar do Programa de Fertilização Assistida do HCRF. Nós entendemos que em todo tratamento médico, bem como na Reprodução Assistida existem riscos e efeitos colaterais nos quais estamos sujeitos, sendo nós esclarecidos todos os riscos possíveis em relação ao procedimento. É de nosso conhecimento que o tratamento proposto poderá ser exposto a riscos médicos e que também poderemos nos tornar a credenciado e tratamos, sob um tratamento das mesmas as responsabilidades já mencionadas. Entendemos a equipe médica de qualquer responsabilidade em eventos adversos de complicações como abortamentos, malformações fetais ou patologias raras em caso de gravidez.

Não havendo dúvidas, dúvidas e sobre assinamos.

Casal: M _____

SRª _____

Testemunhas: _____

Ribeirão Preto, _____ de _____ de 2011.

PAPER

Quantitative aromatase gene expression (CYP19A1) is not altered in mural lutein-granulosa cells of women with endometriosis undergoing assisted reproduction techniques – pilot study

Authors:

Lauriane Giselle de Abreu¹
Vanessa da Silva Silveira²
Carlos Alberto Scrideli³
Ester Silveira Ramos³
Rosana Maria dos Reis³
Rui Alberto Ferriani³
Marcos Felipe Silva de Sa³

¹ MD; ² BS; ³ MD, PhD

Department of Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medicine of
Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil.
Address: Avenida Bandeirantes nº 3.900, Hospital das Clínicas 1st floor,
Laboratório de GO.Monte Alegre, Ribeirão Preto, SP, Brazil. Zip code:
14.149-900.

Corresponding author:

Lauriane Giselle de Abreu, MS, MD.
Email: laurianegiselle@yahoo.com.br; lauriane@usp.br

Abstract

Most of women diagnosed with endometriosis present fertility disturbances. However, mechanisms remain unclear, leading suspicion of a multifactor and genetic-based character of this disease. Compromised oocyte quality and aromatase rise as major candidates. Aromatase is the endpoint of follicle steroidogenesis cascade and undoubtedly, essential to reach an adequate egg quality. Studies have showed disruption of its gene (CYP19A1) on topic and ectopic endometrium in endometriosis and also a reduction of its activity by *in vitro* studies on granulosa cells of women with this disease. Scarcity of molecular studies assessing aromatase on these target cells in endometriosis stimulated this research. The aim of this study was to quantify aromatase gene expression in mural lutein-granulosa cells of women with endometriosis undergoing assisted reproduction techniques (ART, IVF or ICSI). **Methods:** a case-control study was conducted on 11 women with endometriosis (all stages, ASRM criteria) and 11 women with male or tubal causes of infertility undergoing ART. There was no difference between the groups regarding age, amount of gonadotrophins used, days of induction, follicles and eggs collected. Mural lutein-granulosa cells were harvested from pre-ovulatory follicles during oocyte retrieval and properly isolated. After cells lyses and storage into Trizol LS Reagent®, RNA extraction and cDNA synthesis were performed. Quantification of relative gene expression for CYP19A1 (aromatase) was performed by real time PCR, using SYBR Green reagents. All experiments were carried out in duplicates. **Results:** there was no difference between the groups in the quantitative gene expression of CYP19A1 (aromatase) gene on mural lutein-granulosa cells ($p>0.05$, Mann Whitney), even if we consider separately the different grades of endometriosis (control vs. minimal/mild vs. moderate/severe, $p>0.05$, Kruskal Wallis). These results suggest that this enzyme, aromatase, may have a complex and refined control of its gene expression on this population of granulosa cells, and despite of previous evidences showing its reduced activity on them in endometriosis, the gene expression *per se* may not be affected by the disease.

Key-words: aromatase, CYP19A1, lutein-granulosa cells, edometriosis, assisted reproduction techniques, gene expression, real-time PCR.

Introduction

Fertility disturbances occur in up to 60% of women with endometriosis, (Wheeler JM, 1989; Cornillie et al., 1990; Schenken et al., 1996; D'Hooghe et al., 2003), one of the most costly diseases in reproductive medicine (Gao et al., 2006). Undoubtedly, infertility treatment for endometriosis reached an important step forward through establishment of assisted reproduction techniques; but outcomes are still unsatisfactory, revealing impaired pregnancy and lower implantation and fertilization rates in comparison to tubal and male factors of infertility (Barnhart et al., 2002). This observation strongly suggests an ethyopatogenic mechanism still unknown which interferes in the reproductive process. A strong candidate is compromised oocyte quality (Simon et al., 1994; Harlow et al., 1996; Pellicer et al., 1998a,b; Garcia-Velasco et al., 1999; Garrido et al, 2002; Cahill et al, 2003).

Studies using women oocyte donation model provided important clinical evidence when pointed out impairment of oocyte and embryo's quality in association with endometriosis (Simon et al., 1994; Garcia-Velasco et al., 1999; Diaz et al., 2000; Garrido et al., 2002). But poor embryos are derived from poor oocytes, possibly derived from inappropriate follicleogenesis (Garrido et al., 2002). Achieving a successful folliculogenesis involves not only a complex cross-talk between granulosa cells and the oocyte, as well as a favorable steroidogenic environment inside the follicle (Albertini & Barrett, 2003; Costa et al., 2004; Combelles et al., 2004; Hutt & Albertini; 2007).

Aromatase plays an essential role on both tasks, this enzyme has a known synergistic action to gonadotrophins and also it is the endpoint of the whole intrafollicle steroidogenic cascade (Speroff & Fritz, 2005). Actually it is the only one inside it which is capable to convert an unwanted androgenic follicle to the ideally estrogenic follicle, ready to ovulate (Simpson et al., 2002; Costa et al., 2004; Bulun et al., 2004; Speroff & Fritz, 2005). Aromatase has showed an erratic behavior in endometriosis: its elevated gene expression have been detected mainly in endometriosis' lesions and also in topic endometrium of women diagnosed with the disease (Noble et al., 1996; Zeitoun & Bulun, 1999; Kitawaki et al., 2002; Brosens et al., 2004; Bulun et al., 2002, 2004, 2005; Heilier et al., 2006; Matsuzaki et al., 2006). In granulosa cells, *in vitro* studies pointed out an impairment of aromatase activity on these cells in women with endometriosis (Harlow et al., 1996; Abreu et al., 2006). Also, higher apoptosis (Toya et al., 2000) and impaired progesterone function (Cahill et al., 2003) have been detected on them. Moreover, endometriosis has been accepted as a genetic-based disorder (Fang et al., 2002; Attar & Bulun, 2006) and polymorphisms of its gene (CYP19A1) have been associated with increased risk of this disease (Arvanitis et al., 2003).

Association between aromatase gene disturbances and endometriosis discussed above and the importance of aromatase *per se* over oocyte quality establishment, besides the fact that its gene (CYP19A1) has a complex tissue specific regulation (Meinhart & Mullis, 2002; Simpson et al., 2002; Shozu et al., 2003; Bulun et al., 2004; 2007),

rise the importance of a quantitative study of aromatase gene expression of granulosa cells for this disorder. The aim of the present study was to measure quantitatively the aromatase gene (CYP19A1) expression by real-time PCR in mural lutein-granulosa cells of women with endometriosis in comparison to those without the disease, submitted to assisted reproduction techniques (In Vitro Fertilization, IVF or Intracytoplasmic Sperm injection, ICSI).

Materials and Methods

The study was conducted on 22 patients, 11 with endometriosis (12 ovarian hyperstimulation (HOC) cycles) and 11 with male or tubal factors of infertility (11 HOC cycles), submitted to IVF or ICSI from august 2006 to march 2007 in a tertiary center for infertility treatment (Clinics Hospital at Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil). It was approved by the hospital's ethics committee and by the Brazilian National Commission for Research Ethics and each patient signed an inform consent.

All women had regular menstrual cycles and normal follicle-stimulating hormone (FSH) levels for the reproductive period (3rd day of the cycle) <15 IU/l). There was no difference between the groups with regards to age: (34.73 ± 3.90) for control group vs. 32.64 ± 2.87 for endometriosis; amount of gonadotrophins administered (2502 ± 786.30) vs. 2354 ± 755.3 , days of ovarian induction (9.00 ± 1.55) vs. 9.08 ± 1.56 , number of follicles punctured (11.18 ± 5.51) vs. 11.50 ± 3.55 and oocytes retrieved (5.82 ± 2.90) vs. 6.83 ± 2.62 , $p>0.05$, unpaired t test. Women

with endocrine diseases (including polycystic ovarian syndrome) and those older than 40 years were excluded.

In endometriosis group, 5 patients had minimal/mild and 6 had moderate/severe grades of the disease (one submitted twice to ovarian stimulation for ICSI), according to American Society of Reproductive Medicine criteria (Fertil Steril 67:817–21, 1997).

.All women were submitted to controlled ovarian hyperstimulation with hMG, 150 to 400 IU/day, during the first 6 days; after that, daily doses were adjusted in an individual basis, according to follicular growth. Hypophysis desensitization was done through long protocol using leuprolide acetate 10 IU/day, administered subcutaneously, or nafareline 400 mg/day, by nasal administration. When at least two follicles reached 17 mm in diameter, recombinant hCG (250 mg, subcutaneous) was administered and oocytes were retrieved 34–36 h later by vaginal route with ultrasound guidance.

Human mural granulosa-lutein cells Isolation protocol

Isolation procedure of granulosa cells was based on Chang et al. (2005) protocol, with few modifications as described below:

Mural lutein-granulosa cells were collected from pre-ovulatory follicles during oocyte retrieval for IVF or ICSI. We used at least one follicle aspirate (i.e. material from one single 15 ml aspiration tube containing follicular fluid + mural lutein-granulosa cells + at least 1 cumulus-oocytes complexes derived from 1 to 2 mature follicles (≥ 17 mm diameter), without visual blood contamination. After follicular aspiration,

the cumulus-oocytes complexes from the tube were separated and mural granulosa cells were flushed and washed in HTF-M medium (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA), and centrifuged for 10 min at 2500 rpm at 4⁰C. The supernatant was discharged, the pellet was resuspended in 0.6 ml of HTF-M and transferred to new tube over surface of 4 ml of Histopaque 1077 (Sigma, St. Louis, MO, USA) and centrifuged for 10 min at 1700 rpm at 4⁰C, to separate red blood cells from human granulosa cells. Granulosa cells then formed a thin layer between Histopaque and medium and these cells were collected carefully, flushed and centrifuged again (10 min, 2500 rpm, 4⁰C) in a new tube with 2 ml of HTF-M medium. After the supernatant was discharged, pellet now was resuspended in 500 ml of PBS medium (Irvine Scientific) and divided into 1,5 ml tubes, each one containing 250 ml of cell suspension and 750 ml of Trizol LS Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). After cell lyses, these tubes were stored at -80⁰C until RNA extraction. All steps were performed on ice and we followed carefully all the specifications for handling RNA and nucleic acid material.

RNA Extration and cDNA synthesis

Total RNA was isolated with Trizol LS Reagent (Invitrogen) according to kit instructions and the RNA quality was confirmed by gel electrophoresis. Total RNA was reversely transcribed to cDNA using the High capacity cDNA archive kit (Applied Biosystems, Los Angeles, CA, USA). Quantitative Real-time PCR:

Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) was performed on total cDNA from human mural lutein-granulosa cells specimens. qPCR was performed using SYBR Green PCR Core reagents (Applied Bio-systems, Foster City, CA) and melting curve analysis, on an ABI 7500 sequence detector (Applied Biosystems, Los Angeles, CA). All experiments were run in duplicate and data were normalized to β -actin (ACTB) expression levels. Sequences of interest were amplified using the following primers: for aromatase *CYP19A1* gene (F): 5'CCTTgCCAATAgTgTCATCC3' and (R) 5'TAgCCTggTTCTCTggTgTg 3'; for housekeeping gene β -actin (F):5' TCgTgATggACTCCggTgAC3' and (R): 5'CgTggTggTgAAgCTgTAg3' (Invitrogen).

Statistical analysis

For Real-time PCR data, analysis was done by the $2^{-\Delta\Delta}$ Ct method, using the GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). The Mann-Whitney test was performed to compare differences between two groups. For simultaneous comparison of 3 groups, Kruskal-Wallis test with Dunn's Multiple Comparison Test was used. In all cases, the level of significance was set as 5% ($p < 0.05$).

Results

We found no difference with regards to quantitative expression of aromatase gene (*CYP19A1*) on mural lutein-granulosa cells of women with endometriosis in comparison with women presenting male or tubal causes of infertility, submitted to assisted reproduction techniques (Table 1; Figures 1, 2).

Table 1 - Ct values from real time PCR (SYBR Green) for aromatase gene (CYP19A1) expression analysis normalized to β -actin on mural lutein-granulosa cells of women with male or tubal factors of infertility (N=11); endometriosis grades minimal/mild (N=5) and endometriosis moderate/severe (N=7); undergoing assisted reproduction (IVF or ICSI). Endometriosis classified by ASRM criteria. Data showed as relative expression ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Ct= Threshold cycle. C1= 1st and C2 = 2nd ovarian stimulation cycle (HOC) of women 02 from the moderate/severe endometriosis group. N refers to ovarian hyperstimulation cycles.

Aromatase Ct (normalized to β -actin)	Control group	Minimal/Mild Endometriosis	Moderate/ Severe Endometriosis	Endometriosis All stages
01	0.7791	0.8182	4.3471	4.3471
02	0.3997	0.0947	0.8043 (C1) 0.1960 (C2)	0.8043(C1) 0.1960(C2)
03	2.1165	1.8139	0.4903	0.4903
04	3.2442	0.2877	0.7485	0.7485
05	1.1704	4.2752	0.0355	0.0355
06	0.6784		0.0000	0.0000
07	0.4517			0.8182
08	0.4700			0.0947
09	1.2971			1.8139
10	5.6248			0.2877
11	0.3835			4.2752
12				
Mediana	0.7288	0.8182	0.4903	0.6194

Fig 1 - Aromatase gene (CYP 19A1) expression by real time PCR on mural lutein-granulosa cells of women with endometriosis vs. controls undergoing assisted reproduction techniques. Comparison between the groups: Control (tubal or male causes of infertility, N=11); (B) endometriosis minimal/mild (N=5); (C) endometriosis moderate/severe (N=7). No difference was found between the groups ($p>0.05$, Kruskal Wallis with Dunn's multiple comparison test). Data are showed as relative expression, normalized to β -actin. N refers to ovarian hyperstimulation cycles.

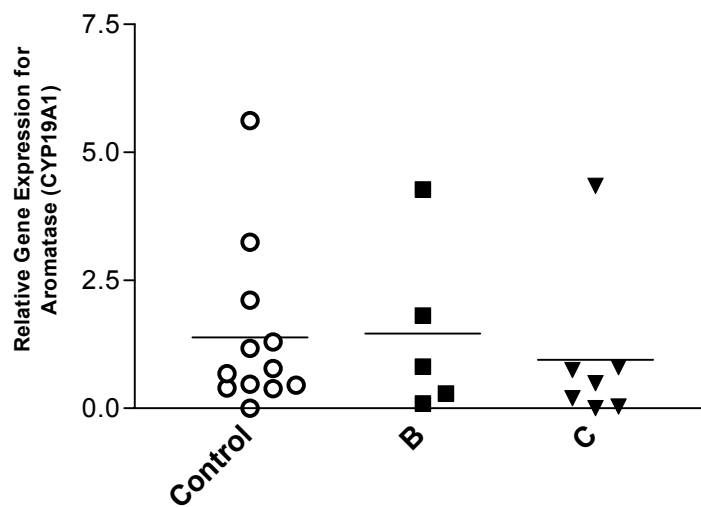
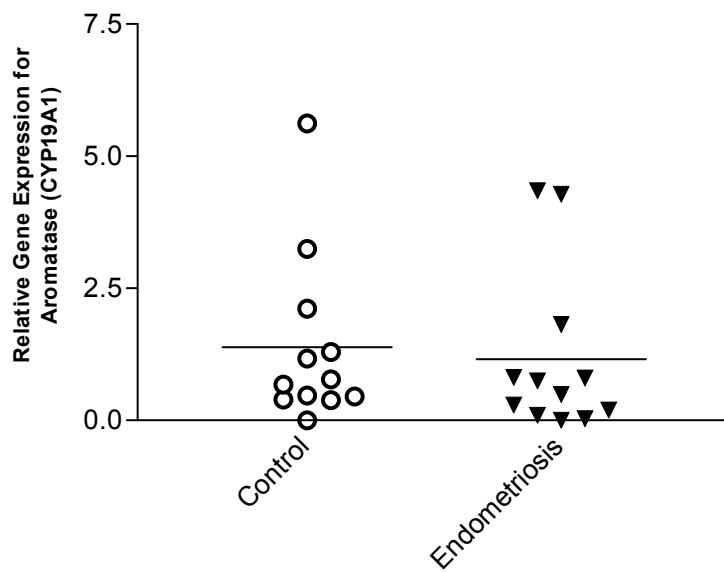


Fig 2 - Fig 1 –Aromatase gene expression by real time PCR on mural lutein-granulosa cells of women with endometriosis (all stages, N=12) vs. controls (tubal or male causes of infertility, N=11) undergoing assisted reproduction techniques. No difference was found between the groups ($p>0.05$, Mann Whitney test). Data are showed as relative expression, normalized to β -actin. N refers to ovarian hyperstimulation number.



Discussion

Assessment of oocyte quality is still one of the major challenges in reproductive medicine, even though it is determinant factor to success rates of assisted reproduction techniques (Abdalla & Thum, 2004). The aging process and diseases as is the case of endometriosis clearly affects egg quality (Garrido et al., 2002; Abdalla & Thum, 2004), but how? Which mechanism (s)?

For endometriosis, the scenario of controversies is even worse, which begins in the etiopathogeny of the disease and goes through its classification and treatment. The focus of this study was to investigate the oocyte quality as one etiopathogenic mechanism of infertility associated to endometriosis. Oocyte quality is guided by follicleogenesis, and poor oocytes are in fact derived from inappropriate follicleogenesis (Erickson et al., 1989; Garrido et al., 2002; Speroff & Fritz, 2005). Aromatase, as already discussed above, is a key enzyme for the follicleogenesis process and its steroidogenic cascade, which converts and unfavorable androgenic environment to an estrogenic pre-ovulatory follicle, even in stimulated cycles under influence of GnRH analogues (Erickson et al., 1989; Dor et al. 2000; Costa et al., 2004; Speroff & Fritz, 2005; Silva et al., 2008).

In this study, if we consider the whole group of endometriosis (all stages), no difference was observed with regards to aromatase gene (CYP19A1) expression on mural lutein-granulosa cells of women with endometriosis in comparison to controls. In a previous study (Abreu et al., 2006), we've found reduced *in vitro* aromatase activity (estradiol

production under *in vitro* testosterone supplementation) in the same target cells and women. Both basal production of estradiol and also its production after testosterone supplementation on its lowest concentration used in the study ($2 \times 10^{-6} \text{M}$), showed an impairment of aromatase activity in endometriosis women in comparison to control group. When we added higher concentration of testosterone, this phenomenon didn't occur. Costa et al (2004) also have showed, through granulosa cells culture from women submitted to stimulated cycles for ART, without GnRH analogues; that follicles containing mature eggs had higher Progesterone/Testosterone (P/T), Progesterone/Estradiol (P/E) and Estradiol/Testosterone (E/T) ratios in the follicular fluid than the immature ones. This finding suggests a defect on immature eggs located mainly in the conversion C21 to C19 steroids, but not in the aromatase. Silva et al. (2008) analyzed the same relations between steroids in follicular fluid of infertile women submitted to stimulated cycles for ART, but now using GnRH analogues, an agent that would primarily affect aromatase activity. Actually aromatase function was kept intact in this study, despite of GnRH analogues. The main effect of GnRH observed on these steroids relations was a beneficial reduction of androgens, which is compatible with the better results for ART in stimulated cycles when these agents are administered.

From the background of these studies assessing granulosa cells biology, we can observe that aromatase function was always kept intact, understandable fact considering its critical role on follicle steroidogenesis. However, this evidence also lead us to hypothesize how complex and

refined the control mechanisms of this enzyme, aromatase, can be, probably involving molecular signals we still don't know.

This refined control of aromatase may be the main reason we didn't find difference in the present study regarding its gene (CYP19A1) expression on mural lutein-granulosa cells of women with endometriosis. Even in this disease, where we do know there is an oocyte compromised quality (Garrido et al., 2002), control of aromatase seems to be still efficient for its gene expression. Therefore, the mechanism of poor egg quality in endometriosis could be placed in other pathway or even in other points of the steroidogenic cascade of the follicle, but is not related to aromatase gene expression, according to the results of the present study.

Post-transcription modifications and the epigenetic mechanism also rise as strong candidates for aromatase gene expression's controlling pathways and need to be explored.

Some other points need to be discussed about endometriosis. Especially for egg quality, minimal/mild grades may have a completely different behavior from moderate/severe grades. In this study, normalized aromatase Ct mean from women with moderate and severe grades showed a lower value than minimal/mild, but no statistic significance. In our previous study (Abreu et al., 2006) when we studied *in vitro* aromatase activity through granulosa cells culture of the same target women, we've found similar results. Harlow et al. (1996) have demonstrated reduced aromatase activity in granulosa cells studying minimal/mild grades of the disease. Considering these findings, the division of endometriosis into peritoneal, ovarian and deep endometriosis

could be particularly interesting to understand if they have different pathways affecting egg quality, since they have different clinical behavior and management (Kennedy et al., 2005).

Since there is a scarcity of studies looking at granulosa biology, researchers should rely on molecular biology technologies, to clarify how the signaling between granulosa mural cells-granulosa cumulus cells-oocyte happens. For endometriosis, based on results from our research, the next step would be larger and compartmentalized studies focusing on different endometriosis presentations as endometrioma, peritoneal and deep endometriosis. Also, new research strategies as genetic populational studies of polymorphisms (SNPs) in target genes could bring new insights about this enigmatic disease, since management of endometriosis with regards to infertility is still unsatisfactory (Barnhart et al., 2002).

References

Abdalla H, Thum MY. An elevated basal FSH reflects a quantitative rather than qualitative decline of the ovarian reserve. *Hum Reprod*;19(4):893-8, 2004.

Abreu LG, Romão GS, Ferriani RA, Reis RM, Silva de Sá, MF, Moura MD. Reduced aromatase activity in granulosa cells of women with endometriosis undergoing assisted reproduction techniques. *Gynecol Endocrinol*; 22(8): 432–36, 2006.

Albertini DF, Barrett SL. Oocyte-somatic cell communication. *Reproduction*; 61:49-54, 2003.

Arvanitis DA, Koumantakis GE, Goumenou AG, Matalliotakis IM, Koumantakis, EE, Spandidos DA. CYP1A1, CYP19, and GSTM1 polymorphisms increase the risk of endometriosis. *Fertil Steril*; 79: 702-9, 2003.

Attar E, Bulun SE. Aromatase and other steroidogenic genes in endometriosis: translational aspects. *Hum Reprod Update*; 12:49–56, 2006.

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

Brosens J, Verhoeven H, Campo R, Gianaroli L, Gordts S, Hazekamp J, HaEgglund L, Mardesic T, Varila E, Zech J, Brosens I. High endometrial aromatase P450 mRNA expression is associated with poor IVF outcome. *Human Reproduction*; 19 (2): 352-56, 2004.

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*; 55:21–33, 2002.

Bulun SE, Fang Z, Imir G, Gurates B, Tamura M, Yilmaz B, Langol D, Amin S, Yang S, Deb S. Aromatase and endometriosis. *Semin Reprod Med*; 22:45–50, 2004.

Bulun SE, Takayama K, Suzuki T, Sasano H, Yilmaz B, Sebastian S. Organization of the human aromatase p450 (CYP19) gene. *Semin Reprod Med*; 22(1):5-9, 2004.

Bulun SE, Imir G, Utsunomiya H, Thung S, Gurates B, Tamura M, Lin Z. Aromatase in endometriosis and uterine leiomyomata. *J Steroid Biochem Mol Biol*; 95:57–62; 2005.

Bulun SE, Chen D, Lu M, Zhao H, Cheng Y, Demura M, Yilmaz B, Martin R, Utsunomiya H, Thung S, Su E, Marsh E, Hakim A, Yin P, Ishikawa H, Amin S, Imir G, Gurates B, Attar E, Reierstad S, Innes J, Lin Z. Aromatase excess in cancers of breast, endometrium and ovary. *J Steroid Biochem Mol Biol*; 106(1-5):81-96, 2007.

Cahill DJ, Harlow CR, Wardle PG. Pre-ovulatory granulosa cells of infertile women with endometriosis are less sensitive to luteinizing hormone. *AJRI*; 49:66-69, 2003.

Chang SY, Kang HY, Lan KC, Chang CY, Huang FJ, Tsai MY, Huang KE. Expression of steroid receptors, their cofactors, and aromatase in human luteinized granulosa cells after controlled ovarian hyperstimulation. *Fertil Steril*; 83(Suppl 1):1241-7, 2005.

Combelles CM, Carabatsos MJ, Kumar TR, Matzuk MM, Albertini DF. Hormonal control of somatic cell oocyte interactions during ovarian follicle development. *Mol Reprod*; 69(3):347-55, 2004.

Cornillie FJ, Oosterlynck D, Lauweryns JM, Koninckx PR. Deeply infiltrating pelvic endometriosis: histology and clinical significance. *Fertil Steril* 53:978–983, 1990.

Costa LO, Mendes MC, Ferriani RA, Moura MD, Reis RM, Silva de Sá MF. Estradiol and testosterone concentrations in follicular fluid as criteria to discriminate between mature and immature oocytes. *Braz J Med Biol Res*; 37(11):1747-55, 2004.

Crosignani P, Olive D, Bergqvist A, Luciano A. Advances in the management of endometriosis: an update for clinicians. *Hum Reprod Update*; 2(2):179-89, 2006.

Diaz I, Navarro J, Blasco L, Simo'n C, Pellicer A, Remohi J. Impact of stage III-IV endometriosis on recipients of sibling oocytes: matched case-control study. *Fertil Steril*; 74:31-34, 2000.

D'Hooghe TM, Debrock S, Hill J & Meuleman, C. Endometriosis and Subfertility: Is the Relationship Resolved? *Semin Reprod Med* (21):2: 243-253, 2003.

Dor J, Bider D, Shulman A, Levron JL, Shine S, Mashiach S, Rabinovici J. Effects of gonadotrophin-releasing hormone agonists on human ovarian steroid secretion in vivo and in vitro-results of a prospective, randomized in-vitro fertilization study. *Hum Reprod*; 5(6):1225-30, 2000.

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*; 69:716-24, 1989.

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*; 87: 3460-66, 2002.

Gao X, Outley J, Botteman M, Spalding J, Simon JA, Pashos CM. Economic burden of endometriosis. *Fertil Steril* 86:1561-72, 2006.

Garcia-Velasco JA, Arici A. Is the endometrium or oocyte/embryo affected in endometriosis? *Hum Reprod*; 14(Suppl 2):77-89, 1999.

Garrido N, Navarro J, García-Velasco J, Remoh J, Pellice A, Simón C. The endometrium versus embryonic quality in endometriosis-related infertility. *Hum Reprod Update*; 8(1):95-103, 2002.

Harlow CR, Cahill LA, Maile WM, Talbot J, Mears PG, Hull MGR. Reduced preovulatory granulosa cell steroidogenesis in women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*; 81:426-9, 1996.

Heilier JF, Donnez O, Van Kerckhove V, Lison D, Donnez J. Expression of aromatase (P450 aromatase/CYP19) in peritoneal and ovarian endometriotic tissues and deep endometriotic (adenomyotic) nodules of the rectovaginal septum. *Fertil Steril*; 85(5):1516-8, 2006.

Hutt KJ, Albertini DF. An oocentric view of folliculogenesis and embryogenesis. *Reprod Biomed Online*; 14(6):758-64, 2007.

Kennedy S, Bergqvist A, Chapron C, D'Hooghe T, Dunselman G, Greb R, Hummelshoj L, Prentice A, Saridogan E. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum Reprod*; 20(10):2698-704, 2005.

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*; 83:149–155, 2002.

Matsuzaki S, Canis M, Pouly JL, Déchelotte PJ, Mage G. Analysis of aromatase and 17 α -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 messenger ribonucleic acid expression in deep endometriosis and eutopic endometrium using laser capture microdissection. *Fertil Steril*; 85:308 – 13, 2006.

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

Noble LS, Simpson E, Johns A, Bulun SE. Aromatase expression in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*; 81:174–179, 1996.

(A) 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*; 70:425-430, 1998.

(B) 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: steroid levels and embryo quality. *Fertil Steril*; 69:1135-41, 1998.

Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril*; 67:817–21, 1997.

Schenken RS. Treatment of human infertility: the special case of endometriosis. In: Adashi EY, Rock JA, Rosenwaks Z, editors. *Reproductive endocrinology, surgery and technology*. Philadelphia (PA): Lippincott–Raven, p. 2121–37, 1996.

Shozu M, Sebastian S, Takayama K, Hsu WT, Schultz RA, Neely K, Bryant M, Bulun SE. Estrogen excess associated with novel gain-of-function mutations affecting the aromatase gene. *N Engl J Med*; 348(19):1855-65, 2003.

Silva ALA, Rosa e Silva ACJS, Abreu LG, Ferriani RA, Silva de Sá MF. Leuprolide acetate reduces both in vivo and in vitro ovarian steroidogenesis in infertile women undergoing assisted reproduction. *Steroids*; 73:1475-84, 2008.

Simón C, Gutiérrez A, Vidal A, de los Santos MJ, Tarín JJ, Remohí J, Pellicer A. Outcome of patients with endometriosis in assisted reproduction: results from in-vitro fertilization and oocyte donation. *Hum Reprod*; 9(4):725-9,1994.

Simpson ER, Clyne C, Rubin G, Boon WC, Robertson K, Britt, Jones M. Aromatase - A Brief Overview. *Annu Rev Physiol*; 64:93-127, 2002.

Speroff L & Fritz MA. Regulation of the Menstrual Cycle. In: Speroff L & Fritz, MA. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. 7. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins p. 187-231; 2005.

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*; 73: 344-50, 2002.

Wheeler JM. Epidemiology of endometriosis-associated infertility. *J Reprod Med*; 34:41-6,1989.

Zeitoun KM & Bulun SE. Aromatase: a key molecule in the pathophysiology of endometriosis and a therapeutic target. *Fertil Steril*;72:961-9,1999.