

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia

Larissa de Oliveira Koopman

Expressão do gene *CXCL12* em células do cumulus de mulheres inférteis com e sem endometriose mínima e leve submetidas à estimulação ovariana controlada para realização de ICSI.

Monografia

Ribeirão Preto

2018

Larissa de Oliveira Koopman

Expressão do gene *CXCL12* em células do cumulus de mulheres inférteis com e sem endometriose mínima e leve submetidas à estimulação ovariana controlada para realização de ICSI.

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biomédicas como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biomédicas com ênfase em Ciências Básicas da Saúde

Orientadora: Professora Doutora Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro

Co-orientadora: Doutora Michele Gomes da Broi

Ribeirão Preto

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Koopman, Larissa de Oliveira

Expressão do gene *CXCL12* em células do cumulus de mulheres inférteis com e sem endometriose mínima e leve submetidas à estimulação ovariana controlada para realização de ICSI.

38 p.: il.; 30 cm

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

Orientadora: Navarro, Paula Andrea de Albuquerque Salles.

1. Endometriose inicial; 2. Infertilidade feminina; 3. Células do cumulus; 4. *CXCL12*.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais,
Guilherme e Darli, que tanto me apoiaram
durantes os quatro anos de graduação.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a Deus, por me dar a força para lutar a cada dia.

Aos meus pais, Guilherme e Darli, que sempre acreditaram em mim e investiram no meu potencial. Sem o incentivo deles, nada disso seria possível. E à minha irmã, Estela, por ser a estrelinha que brilha na minha vida.

Ao meu namorado, Bruno, por todo apoio, companheirismo e parceria, nos momentos bons e nos mais difíceis. Meus dias sem você seriam sombrios e sem graça.

Às minhas amigas e colegas de casa, Flávia e Yi Dzoen, responsáveis pelos momentos mais alegres e divertidos. Com certeza tornaram esses quatro anos de graduação muito mais leves. Aos grandes amigos Lucas, Fred e Pedro.

A todos os professores com quem tive aula durante a graduação, por todo conhecimento transmitido.

Aos membros da Empresa Júnior Sirius Biotecnologia Jr. Todos vocês significam muito pra mim e tiveram um impacto gigantesco na minha vida pessoal, profissional e acadêmica. Brilha Sirius!

Aos colegas de sala, Turma II de Ciências Biomédicas, por enfrentarem tudo isso que foi a faculdade comigo. Especialmente à Patrícia, Gabriela, Isadora e Helena, grandes amigas que tive o prazer de conhecer.

À minha orientadora, Dr^a. Paula Andrea Navarro, por toda sabedoria e conhecimento e pelo acolhimento em seu grupo de pesquisa.

À co-orientadora, Dr^a Michele Gomes da Broi, exemplo de pessoa e profissional, por toda paciência que teve em me ensinar e acompanhar em todos os momentos da Iniciação Científica.

Ao pessoal do grupo de pesquisa, em especial à Caroline Mantovani da Luz que teve grande colaboração nesse trabalho.

À chefe da seção de alunos da FMRP, Nadine P. Médice Carlucci, por ser sempre muito solícita, entender todos os desafios dos alunos de CB e nos ajudar da melhor forma possível.

A todos os funcionários da FMRP.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento deste projeto.

RESUMO

A endometriose, enfermidade de elevada prevalência entre as mulheres em idade reprodutiva, apresenta forte associação com a infertilidade. No entanto, os mecanismos envolvidos na etiopatogenia da infertilidade associada à doença, principalmente nos casos de endometriose inicial (mínima e leve) ainda não foram completamente elucidados. Nesse sentido, questiona-se um efeito deletério da doença sobre a qualidade oocitária, o que poderia comprometer a fertilidade dessas mulheres. As células do cumulus (CCs) podem ser utilizadas como biomarcadores indiretos de qualidade oocitária, uma vez que têm papel fundamental no desenvolvimento e maturação do oócito. A literatura apresenta evidências de alterações em genes importantes para a qualidade oocitária nessas células em mulheres com a doença. A quimiocina *CXCL12* é uma molécula envolvida no recrutamento de leucócitos e liberação de citocinas no folículo ovariano pré-ovulatório, tendo papel já descrito no processo de foliculogênese, ovulação e fertilização, com potencial contribuição para a aquisição de qualidade oocitária, o que desperta grande interesse na sua avaliação em mulheres com a doença. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi comparar a expressão do gene *CXCL12* em CCs de mulheres inférteis com endometriose inicial e controles inférteis submetidas à estimulação ovariana para realização de ICSI. Amostras de CCs foram previamente obtidas durante a captação oocitária de 36 pacientes (20 mulheres inférteis com endometriose I/II, e 16 controles inférteis) e mantidas a -80°C. Estas amostras tiveram RNA extraído e cDNA sintetizado, que foram utilizados para a quantificação do referido gene por PCR quantitativa em tempo real. Os dados foram comparados usando teste de Mann Whitney. Apesar de ter se observado valores de expressão do *CXCL12* maiores no grupo endometriose I/II (mediana: 0,60; intervalo interquartil: 0,20 - 2,14) quando comparados ao controle (mediana: 0,29; intervalo interquartil: 0,21 - 0,70), não se verificou diferença significativa ($p=0,186$). O poder do teste foi de 63%, desta forma, não é possível afirmar que o gene não esteja, de fato, alterado. Apesar de não demonstrarmos diferença significativa do gene *CXCL12* em CCs de mulheres inférteis com e sem endometriose inicial, estudos com maiores casuísticas são necessários para confirmar ou modificar nossos achados, que auxiliarão na definição do tamanho amostral.

Palavras-chave: Endometriose inicial; Infertilidade feminina; Células do cumulus; *CXCL12*

ABSTRACT

Endometriosis, a disease of high prevalence among women of reproductive age, is strongly associated to infertility. However, the mechanisms involved in the etiopathogenesis of disease-related infertility, especially in cases of initial (minimal and mild) endometriosis, have not yet been fully elucidated. In this sense, a deleterious effect of the disease on oocyte quality is questioned, which could compromise the fertility of these women. Cumulus cells (CCs) can be used as indirect biomarkers of oocyte quality, since they play a key role in oocyte development and maturation. The literature presents evidence of changes in genes important for oocyte quality in these cells in women with the disease. The chemokine *CXCL12* is a molecule involved in the recruitment of leukocytes and release of cytokines into the preovulatory ovarian follicle. Its role on folliculogenesis, ovulation and fertilization has been already described, suggesting potential contribution to the acquisition of oocyte quality, which arouses great interest in their evaluation in women with the disease. Thus, the objective of this study was to compare the expression of the *CXCL12* gene in CCs of infertile women with early endometriosis and infertile controls submitted to ovarian stimulation for ICSI. CCs samples were previously obtained during oocyte uptake of 37 patients (18 infertile women with endometriosis I / II and 16 infertile controls) and maintained at -80 ° C. These samples had RNA extracted and cDNA synthesized, which were used for the quantification of the referred gene by real-time PCR. Data were compared using the Mann Whitney test. Although *CXCL12* expression values were higher in the endometriosis I/II group (median: 0.60, interquartile range: 0.20 - 2.14) compared to the control group (median: 0.29, interquartile range: 0.21 - 0.70), there was no significant difference ($p = 0.186$). The power of the test was 63%, so it is not possible to state that the gene is not, in fact, altered. Although we did not demonstrate a statistically significant difference of the *CXCL12* gene in CCs of infertile women with and without initial endometriosis, studies with larger casuistry are necessary to confirm or modify our findings, which will help in the definition of sample size.

Key words: Endometriosis; Female infertility; Cumulus cells; *CXCL12*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1. <i>ENDOMETRIOSE.....</i>	9
1.2. <i>ENDOMETRIOSE E INFERTILIDADE</i>	10
1.3. <i>AS CÉLULAS DE CUMULUS E A QUALIDADE OOCITÁRIA</i>	11
1.4. <i>QUIMIOCINAS.....</i>	13
1.5. <i>CXCL12 E A QUALIDADE OOCITÁRIA.....</i>	15
2. JUSTIFICATIVA.....	17
3. OBJETIVO	18
4. METODOLOGIA	19
4.1. <i>MODELO DE ESTUDO.....</i>	19
4.2. <i>PACIENTES</i>	19
4.3. <i>PROTOCOLO DE ESTIMULAÇÃO OVARIANA E SUPLEMENTAÇÃO DE FASE LÚTEA.....</i>	19
4.4. <i>COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS</i>	21
4.5. <i>EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL E SÍNTESE DO CDNA</i>	22
4.6. <i>EXPRESSÃO DOS GENES POR PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (RT-QPCR)</i>	22
4.7. <i>TAMANHO DO ESTUDO</i>	23
4.8. <i>ANÁLISE DOS DADOS</i>	23
5. RESULTADOS	24
5.1. <i>FLUXOGRAMA</i>	24
5.2. <i>CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS</i>	25
5.3. <i>EXPRESSÃO DO GENE CXCL12</i>	26
6. DISCUSSÃO	28
7. CONCLUSÃO.....	31
8. REFERÊNCIAS.....	32

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Endometriose*

A endometriose é uma doença ginecológica crônica, benigna, estrógeno-dependente caracterizada por implante e crescimento de tecido endometrial (glândulas e/ou estroma) fora da cavidade uterina, principalmente no peritônio, mas também nos ovários, septo retrovaginal, e mais raramente no pericárdio, na pleura e até mesmo no cérebro (Gupta *et al.*, 2006; Burney e Giudice, 2012; Giudice e Kao 2004). Os sintomas da endometriose incluem dor pélvica, dismenorréia e dispareunia (Rock e Markham, 1992). Sua prevalência é alta, de modo que afeta de 6 a 10% das mulheres em idade reprodutiva (Burney e Giudice, 2012).

É frequentemente associada à infertilidade, estando presente em 25 a 50% das mulheres inférteis (Asrm, 2012), sendo que 30 a 50% das portadoras de endometriose têm dificuldade em ter filhos (Holoch e Lessey, 2010; Asrm, 2012). Por ser uma doença muitas vezes acompanhada por dor pélvica crônica (Giudice e Kao, 2004; Signorile e Baldi, 2010) e formação de aderências, repercute na qualidade de vida da paciente. Tanto por seu impacto na saúde física e psicológica como pelo impacto socioeconômico diante dos custos para o seu diagnóstico e tratamento, a endometriose tem sido considerada um problema atual de saúde pública (Signorile e Baldi, 2010).

Segundo a ASRM, a endometriose é classificada em quatro estágios, os quais são definidos a partir das características morfológicas do implante endometriótico, como dimensão, profundidade e presença e extensão de aderências. No estágio I ou endometriose mínima, os focos endometrióticos são isolados e não há presença de aderências. No estágio II ou endometriose leve, há presença de lesões ectópicas superficiais de menos de 5 cm e ausência de aderências significativas, ou seja, aquelas que não provocam alterações anatômicas. No estágio III ou endometriose moderada, há múltiplos implantes endometrióticos, com aderências peritubárias e periovarianas evidentes. E no estágio IV ou endometriose grave, os focos endometrióticos são múltiplos, com implantes superficiais e profundos, endometriomas ovarianos, aderências densas que levam a alterações anatômicas (ASRM, 1996).

1.2. *Endometriose e Infertilidade*

A associação entre endometriose e infertilidade tem forte embasamento na literatura (Garrido *et al.*, 2000; Giudice e Kao, 2004; Gupta *et al.*, 2008). Sabe-se que a taxa de fecundidade mensal em casais normais em idade reprodutiva é de 15 a 20%, enquanto que em mulheres inférteis com endometriose essa taxa varia entre 2 e 10% (Hughes *et al.*, 1993). Embora estudos tenham apoiado o conceito de diminuição de fecundidade nas portadoras desta doença, os mecanismos envolvidos na sua etiopatogênese, principalmente nos casos de endometriose mínima e leve, em que não se observa alteração anatômica do trato reprodutivo, ainda não foram precisamente elucidados. (Holoch e Lessey, 2010).

A infertilidade apresentada por pacientes com as formas moderada e grave de endometriose (estágios III e IV, respectivamente) poderia ser explicada pela presença de alterações anatômicas, como adesões pélvicas ou peritubárias que perturbariam a comunicação entre ovário e tuba uterina e, assim, prejudicariam a liberação, captação ou transporte do oócito (Bulletti *et al.*, 2010). Entretanto, há crescentes evidências de que lesões sutis ou implantes endometrióticos em estágios iniciais (estágios I e II) também poderiam contribuir com a etiopatogênese da infertilidade, apesar da ausência de danos anatômicos pélvicos. (Holoch; Lessey, 2010).

Nesse sentido, acredita-se que a infertilidade apresentada por essas pacientes possa ser decorrente de um comprometimento da qualidade oocitária e, consequentemente, embrionária (Brizek *et al.*, 1995; Pellicer *et al.*, 1995; Kumbak *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2015), de defeitos endometriais ou da interação entre o endométrio e o embrião (Giudice e Kao, 2004; Endometriosis and infertility, 2006; Gupta *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2009; Bulletti *et al.*, 2010; Revel, 2012). Contudo, estudos em programas de ovodação não evidenciaram diferenças na taxa de implantação entre mulheres com e sem endometriose que receberam oócitos de doadoras saudáveis (Simon *et al.*, 1994; Sung *et al.*, 1997), sugerindo que o fator oocitário tenha um papel prioritário na etiopatogênese da infertilidade relacionada à doença (Brizek *et al.*, 1995; Pellicer *et al.*, 1995; Garrido *et al.*, 2000).

1.3. As Células de Cumulus e a Qualidade Oocitária

As células do cumulus (CCs) são originárias das células da granulosa e envolvem o gameta feminino no folículo ovariano antral, formando o complexo cumulus-oócito (COC) (Huang *et al.*, 2010; Russell *et al.*, 2016). O início da diferenciação das células da granulosa ocorre com a formação do antro folicular, que corresponde aproximadamente ao final da fase de crescimento do oócito. Em humanos e outros mamíferos, duas linhagens celulares anatômicas e funcionalmente distintas são produzidas – as células da granulosa murais, que revestem a parede do folículo com papel primariamente esteroidogênico, e as CCs, que circundam o oócito e são intimamente relacionadas ao seu desenvolvimento. (Huang *et al.*, 2010) (figura 1).

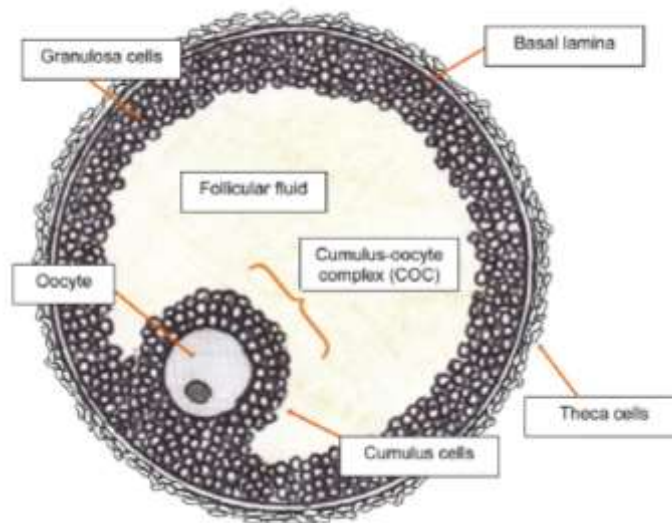


Figura 1: Representação esquemática do folículo antral (Hennet *et al.*, 2012).

Durante a foliculogênese, as células do cumulus estão em constante comunicação com o oócito havendo entre elas a transferência bidirecional de nutrientes e sinalização parácrina (Coticchio *et al.*, 2015; Russell *et al.*, 2016). Essa comunicação intercelular é essencial para o desenvolvimento do folículo, maturação oocitária e aquisição de competência (Dumesic *et al.*, 2015; Kidder *et al.*, 2010; Gilchrist *et al.*, 2008). Nos folículos antrais, as CCs contribuem para o metabolismo do oócito. Ao mesmo tempo, alguns fatores secretados por oócitos medeiam o metabolismo, a maturação e a sobrevivência das CCs (Gilchrist *et al.*, 2008). O diálogo intercelular ocorre através de dois mecanismos principais: *gap junctions* e sinais parácrinos

(Monniaux D., 2016) (figura 2). As *gap junctions* são canais na membrana celular que são formados por conexinas e ligam as CCs com o oócito e as CCs entre si (Winterhager E. *et al.*, 2015). Essas *gap junctions* permitem a transferência de pequenas moléculas das CCs para o oócito, como íons, nucleotídeos cíclicos (cAMP, cGMP), metabólitos, aminoácidos e transcritos de RNA, todos contribuindo para a meiose, produção de ATP e o equilíbrio do pH no oócito (Monniaux D., 2016; Kidder GM *et al.*, 2002; FitzHarris G, *et al.*, 2007).

A sinalização parácrina no sentido das CCs para o oócito auxilia a retomada meiótica, permite a maturação nuclear e citoplasmática e controla a atividade transcricional (Monniaux D., 2016; Albertini D. F. *et al.*, 2001). A sinalização parácrina no sentido do oócito para os CCs regula o crescimento e a atresia do folículo e modula o metabolismo, a diferenciação, a proliferação, a apoptose e a luteinização das CCs. Isso ocorre por meio de fatores oocitários que atuam nas células somáticas circundantes (Pincus G, *et al.*, 1935; Buccione R. *et al.*, 1990).

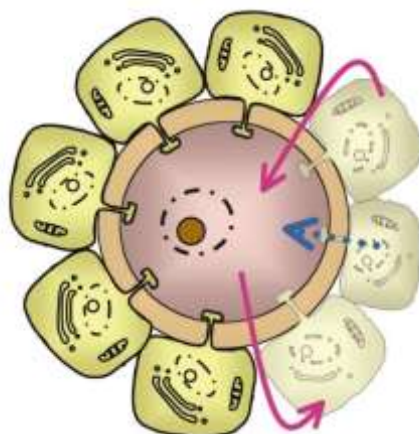


Figura 2: Comunicação oócito-cumulus. Tanto a comunicação parácrina (seta rosa) como a comunicação por *gap-junction* (seta azul tracejada) são necessárias para o desenvolvimento normal dos oócitos e folículos. (Sutton *et al.*, 2003).

As CCs são responsáveis pela produção de energia no COC através do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e fosforilação oxidativa, que são as vias predominantes para a geração de ATP (Paczkowski M, *et al.*, 2013). Assim, uma vez que o oócito e as CCs dependem um do outro em termos de metabolismo, qualquer alteração metabólica nas células foliculares também pode afetar o desenvolvimento do oócito (Sutton M.L., *et al.*, 2010).

Visto que desempenham um papel crucial na aquisição da competência oocitária e estão intimamente ligadas ao oócito, as CCs tem sido consideradas preditores indiretos da qualidade oocitária (Assou *et al.*, 2006; Hamamah *et al.*, 2006; Hamel *et al.*, 2008; Haouzi e Hamamah, 2009).

Estudos recentes têm evidenciado alterações no microambiente folicular de mulheres com endometriose, possivelmente envolvidas com o comprometimento da qualidade oocitária e danos à fertilidade de suas portadoras. Essas alterações incluem marcadores de estresse oxidativo (Prieto *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2013; Choi *et al.*, 2015; Da Broi *et al.*, 2016; Da Broi *et al.*, 2018) e inflamatórios (Du *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017) alterados no FF e a expressão alterada de genes relacionados com esteroidogênese (Barcelos *et al.*, 2013; Da Luz *et al.*, 2017) e resposta antioxidante (Donabela *et al.*, 2015) nas células do cumulus (CCs) de mulheres com a doença.

Nesse sentido, a avaliação de fatores importantes para um adequado desenvolvimento e maturação oocitários, crescimento folicular, expansão do cumulus e ovulação nessas células é fundamental para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na infertilidade em mulheres com a doença inicial.

1.4. *Quimiocinas*

As quimiocinas são citocinas quimiotáticas secretadas por tipos celulares específicos que têm a capacidade de induzir quimiotaxia, processo pelo qual as células migram direcionalmente contra o gradiente de concentração de um quimioatrativo, em células responsivas próximas. Sua principal função é coordenar a resposta imune, atuando na maturação e migração de leucócitos, direcionando essas células imunes para locais de inflamação (Borrelli *et al.*, 2013).

Sabe-se que a atividade quimiotática é extremamente importante para os processos de foliculogênese e ovulação. As quimiocinas expressas pelas CCs participam da expansão do COC e são responsáveis pelo recrutamento de leucócitos no microambiente folicular, que estão envolvidos na liberação local de citocinas e na

cascata ovulatória (Machelon e Emilie, 1997; Brännström e Enskog, 2002). Essas moléculas também regulam a organização da matriz extracelular do COC e interagem com as prostaglandinas locais promovendo uma adequada fertilização (Tamba *et al.*, 2008).

Evidências diferentes apoiam o papel da inflamação e da resposta imune nas células da granulosa e do cumulus durante o processo de ovulação (Liu Z. *et al.*, 2008; Liu Z. *et al.*, 2009). A ruptura folicular e a ovulação são caracterizadas por processos semelhantes à inflamação, como a expressão de metaloproteinases de matriz e a produção de citocinas (Richards J. S., *et al.*, 1998; Gerard N., *et al.*, 2004). Especificamente, membros do sistema imune inato, como o receptor do tipo *Toll*, foram identificados como expressos ou induzidos na granulosa e CC de ovários de camundongos, bovinos e humanos (Liu Z. *et al.*, 2008). A ativação desses receptores leva à ativação de diversos genes, incluindo o *NFKB* e outros fatores de transcrição, citocinas (principalmente *IL-6*) e quimiocinas, que podem contribuir com a expansão do COC.

A função das citocinas no ovário também tem sido descrita como um processo que promove o crescimento folicular, a esteroidogênese, o recrutamento e a ativação de leucócitos, todos necessários para a ovulação e o remodelamento tecidual durante a ovulação (Buscher U. *et al.*, 1999). Mudanças significativas nos níveis de expressão de genes-chave, que estão envolvidos na sinalização de quimiocinas, foram observadas e reguladas negativamente em CC de mulheres com endometriose em comparação com as controle (Allegra A., *et al.*, 2014). Sarapik e colegas relataram que várias citocinas (como *IL-8*) no fluido folicular de mulheres inférteis estão correlacionadas com uma gravidez bem-sucedida após tratamentos de fertilização *in vitro* (FIV) (Sarapik A., *et al.*, 2012). A *IL-8* neste estudo pareceu ser *down*-regulada em CC de pacientes com endometriose em comparação com os controles.

A *CXCL2* é uma quimiocina angiogênica produzida por macrófagos, células endoteliais, epiteliais e tumorais, possui atividade quimiotática potente para neutrófilos; portanto, desempenha um papel importante nas respostas inflamatórias e imunes mediadas por citocinas (Mehrad B. *et al.*, 2007). Schindler e colegas demonstraram que a *CXCL2* está presente no transcriptoma ovariano durante a montagem do folículo primordial (Schindler R. *et al.*, 2010). A *CXCL2* pareceu ser o gene mais *down*-regulado

neste estudo de pacientes com endometriose, indicando um papel chave para que esta quimiocina contribua na remodelação tecidual durante a maturação do oócito.

Níveis de citocinas no FF e seu efeito na formação de oócitos e embriões foram extensivamente investigados, sugerindo que as quimiocinas, resultantes tanto da síntese local no ovário como do sangue e plasma, estão presentes no FF e podem modular a foliculogênese (Trombly D.J. 2009). No contexto da endometriose, níveis intrafoliculares alterados de citocinas pró-inflamatórias foram encontrados em pacientes com doença moderada ou grave submetidas à FIV, em comparação com controles (com fator infertilidade tubária) e também foram relacionados à maturidade do oócito em desenvolvimento: FF de folículos aspirados de pacientes com endometriose mostraram concentrações significativamente mais altas de *IL-8* e *IL-12* em comparação com controles, enquanto os níveis de *IL-8* e *IL-12* foram menores no FF de folículos contendo um oócito maduro quando comparados aos folículos contendo oócito imaturo. Assim, a inflamação relacionada à endometriose na FF pode contribuir para a diminuição da qualidade do oócito (Singh A. K. et al., 2016).

1.5. *CXCL12 e a Qualidade Oocitária*

A *CXCL12* ou fator derivado do estroma 1 (*SDF1*) é uma quimiocina expressa em células da granulosa de folículos pré-ovulatórios (Rojo *et al.*, 2018). Evidências recentes sugerem um papel direto da *CXCL12* na promoção da expansão do complexo cumulus-oócito e na maturação oocitária (Hernandez-Gonzalez *et al.*, 2006; Rojo *et al.*, 2018). Além disso, também foi evidenciada uma associação dessa molécula com um efeito anti-apoptótico linfócito-dependente nas CCs, o que estaria associado à proteção dessas células, propiciando uma maior qualidade embrionária (Kryczek *et al.*, 2005).

Sabe-se que o processo de apoptose das CCs tem impacto na foliculogênese ovariana, sendo um sinal precoce de morte folicular e dano oocitário (Tilly, 1996). Assim, qualquer alteração que comprometa a expressão dessa quimiocina nas CCs pode afetar quimiotaxia, sobrevivência e expansão das CCs e, conseqüentemente, a aquisição de competência oocitária, o processo de ovulação e, potencialmente, a qualidade do embrião formado.

No entanto, até o momento, não há estudos avaliando a expressão dessa molécula em CCs de mulheres inférteis com a doença. Dessa forma, a avaliação da expressão do gene *CXCL12* em CCs de pacientes inférteis com endometriose mínima e leve torna-se uma importante ferramenta a fim de se elucidar os mecanismos envolvidos na redução da fertilidade em pacientes com doença inicial.

2. JUSTIFICATIVA

A endometriose, doença de elevada prevalência populacional, tem sido frequentemente associada à infertilidade, havendo forte embasamento na literatura acerca da sua relação com a redução da fecundidade em ciclos naturais. Todavia, os mecanismos relacionados à redução da fertilidade natural em pacientes inférteis com endometriose, especialmente na doença inicial, ainda não são claramente conhecidos. Nesse sentido, evidências recentes sugerem que o comprometimento da qualidade oocitária possa ser um fator prioritário envolvido na patogênese da infertilidade relacionada à doença.

As células do cumulus (CCs) são importantes marcadores indiretos de qualidade oocitária e têm papel crucial no desenvolvimento dos compartimentos foliculares, crescimento, maturação e aquisição de competência oocitárias, expansão do cumulus e ovulação. Assim, a avaliação de fatores cruciais para esses processos nas CCs de mulheres com endometriose mínima e leve é fundamental para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na infertilidade em mulheres com a doença inicial.

A quimiocina *CXCL12* tem importante papel na expansão do cumulus, maturação oocitária, sobrevivência das CCs, ovulação e sua expressão tem sido relacionada a maior qualidade embrionária. No entanto, não há estudos avaliando a expressão dessa molécula em CCs de mulheres inférteis com endometriose.

Assim, a avaliação da expressão do gene *CXCL12* nas CCs dessas mulheres pode contribuir para o entendimento dos mecanismos envolvidos na etiopatogenia da infertilidade associada à doença inicial.

3. OBJETIVO

Comparar a expressão relativa do gene *CXCL12* em células do cumulus de mulheres inférteis com endometriose inicial (mínima e leve) e com fator tubário e/ou masculino de infertilidade submetidas à estimulação ovariana controlada para realização de injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).

4. METODOLOGIA

4.1. *Modelo de estudo*

Tratou-se de um estudo caso-controle prospectivo, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP), de acordo com o processo HCRP nº 15113/2012.

4.2. *Pacientes*

Foram incluídas pacientes que preencheram os critérios de inclusão pré-estabelecidos e consentiram em participar do estudo após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

Para o grupo endometriose, foram selecionadas pacientes com endometriose inicial diagnosticada e classificada por videolaparoscopia (segundo critérios da ASRM, 1997), sem fator masculino ou tubário associado. O grupo controle, por sua vez, foi composto por pacientes com infertilidade associada a fator masculino e/ou tubário submetidas à videolaparoscopia diagnóstica como procedimento de rotina para investigação da infertilidade conjugal, sendo excluída a presença de endometriose. Foram consideradas elegíveis as pacientes com idade menor que 40 anos, FSH do terceiro dia do ciclo menstrual ≤ 10 mUI/mL, índice de massa corporal (IMC) menor ou igual 30 kg/m^2 , ausência de doenças como diabetes mellitus ou quaisquer outras endocrinopatias, doença cardiovascular, dislipidemia, lúpus eritematoso sistêmico e outras doenças reumatológicas, ausência de infecção pelo vírus HIV ou qualquer infecção ativa, ausência de tabagismo ou o uso de medicações hormonais e antiinflamatórios hormonais e não-hormonais nos últimos seis meses, previamente à programação para o procedimento de reprodução assistida.

O estudo foi realizado junto ao Laboratório de Ginecologia - Setor de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia – FMRP-USP e Laboratório Multiusuário – FMRP-USP.

4.3. *Protocolo de Estimulação Ovariana e Suplementação de Fase Lútea*

Com o objetivo de sincronizar e programar o início do ciclo de estimulação ovariana controlada foi utilizada a programação da menstruação, que consiste em se

administrar anticoncepcionais orais combinados diariamente, iniciados no período menstrual do ciclo precedente até cinco dias antes do previsto para o início da estimulação ovariana.

A hiperestimulação ovariana controlada foi iniciada cinco dias após a interrupção dos contraceptivos orais combinados usados para a programação do ciclo. Todas as mulheres foram monitorizadas apenas por ultrassonografia transvaginal (UStv) (Martins *et al.*, 2014), submetidas ao protocolo flexível com antagonista do GnRH e a estimulação ovariana controlada realizada de acordo com um dos dois protocolos descritos a seguir:

- Protocolo flexível com antagonista e alfacorifolitropina (Elonva®, Schering-Plough, Brasil). Cinco dias após a interrupção do contraceptivo oral combinado foi administrada a alfacorifolitropina na dose de 100 mcg para pacientes com até 60kg e 150 mcg para pacientes com mais de 60kg. Seis dias após a administração da alfacorifolitropina foi realizado o primeiro UStv para monitorização do ciclo. O bloqueio hipofisário foi realizado com antagonista do GnRH (Cetrotid® ou Orgalutran®), iniciado quando havia um folículo com diâmetro médio maior ou igual a 14 mm e mantido até o dia da administração da gonadotrofina coriônica humana (hCG) (Ovidrel®, Serono, Brasil). No oitavo dia após a administração da alfacorifolitropina, as pacientes que não apresentaram critério para uso do hCG recombinante, iniciaram o uso diário de gonadotrofinas (150-300 IU/dia), usadas até a véspera do dia de uso do hCG.

- Protocolo flexível com antagonista e FSH recombinante (FSHr) (Gonal-F®, Serono, Brasil; Puregon®, Organon, Brasil). Cinco dias após a interrupção do contraceptivo oral combinado foi administrado FSHr, 150 a 300 UI por dia, durante os seis primeiros dias da EOC. A partir do sétimo dia EOC, a dose foi ajustada de acordo com o crescimento folicular, monitorado com USTV diariamente ou em dias alternados e mantida até a véspera do dia de uso do hCG. O bloqueio hipofisário foi realizado com antagonista do GnRH (Cetrotid® ou Orgalutran®), iniciado quando havia um folículo com diâmetro médio maior ou igual a 14 mm e mantido até o dia da administração da gonadotrofina coriônica humana (hCG) (Ovidrel®, Serono, Brasil).

Quando pelo menos dois folículos atingiram 17 mm de diâmetro médio, foi administrado 250 µg de hCG recombinante às 22:00. A captação dos oócitos foi realizada 34 a 36h após a administração do hCG recombinante.

A suplementação da fase lútea foi realizada com progesterona natural micronizada (Utrogestan®, Besins Healthcare, Brasil) por via vaginal na dose de 200mg, três vezes ao dia, a partir do dia da captação oocitária e mantida até a décima segunda semana da gestação, nas pacientes que engravidaram.

4.4. *Coleta e armazenamento das amostras*

A captação dos oócitos foi realizada mediante prévia anestesia geral endovenosa com propofol (Diprivan®, Astra-Zeneca, Brasil) associado a citrato de fentanil (Fentanil®, Janssen-Cilag, Brasil). A aspiração dos folículos por via endovaginal guiada por transdutor ultrassonográfico transvaginal, foi realizada utilizando-se uma agulha de lúmen simples padrão, com 300 mm de comprimento, 1,1 mm de diâmetro interno, duplo bixel cortante, ranhurado nos dois centímetros terminais para uma maior ecogenicidade (Laboratório CCD, França), com pressão aspirativa artificial constante de 100 mmHg, por meio de bomba de sucção com controle eletrônico (Craft® Suction Pump, Rocket Medical, Inglaterra). Os folículos foram aspirados em *pool*, ou seja, foi realizada a aspiração do maior número possível de folículos em cada punção, observando-se o esvaziamento completo de cada folículo e puncionando-se o ovário o menor número de vezes possível. A punção foi realizada sob aspiração contínua, tomando-se o cuidado de tirar a pressão durante a entrada e retirada da agulha na parede vaginal, para evitar aspiração de células vaginais.

Para a identificação e o isolamento dos complexos oócito-cumulus, o material aspirado foi transferido para placas de Petri com 10 cm de diâmetro, previamente aquecidas em platina térmica a 37°C, não contendo meio de cultivo. Depois de identificados, os complexos oócito cumulus (OC) foram isolados do fluido folicular (FF) e colocados em placa separada.

Imediatamente após a identificação dos COC, os mesmos foram lavados cuidadosamente em meio de cultura Human Tubal Fluid-HEPES (HTF, Irvine Scientific), para a remoção de sangue e debris. As CC foram separadas do oócito através de microdissecção com a utilização de duas agulhas de insulina, colocadas em criotubo com RNAlater[®] Solution (Ambion) e, após 24 horas à 4°C de imersão nesta solução, as amostras foram armazenadas em nitrogênio líquido até a sua utilização como descrito a

seguir. As CC de todos os COC obtidos de cada paciente foram armazenadas no mesmo criotubo.

4.5. *Extração do RNA total e síntese do cDNA*

O RNA total foi extraído de células do cumulus usando o AllPrep DNA/RNA/miRNA Kit (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. Em seguida, foi realizada a quantificação por fluorimetria do RNA total no equipamento Qubit® Fluorometer utilizando o Qubit® RNA HS Assay Kit (Life thecnology/ThermoFisher Scientific, USA).

Um micrograma de RNA total de cada amostra foi transcrito reversamente usando o *High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Warrington, UK)* seguindo as instruções do fabricante e cDNA das amostras está armazenado para análises subsequentes.

4.6. *Expressão dos genes por PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)*

As amostras de RNA foram analisadas para a quantificação relativa da expressão dos genes selecionados no aparelho *ABI PRISM™ 7500 FAST Sequence Detection Systems (Applied Biosystems, Warrington, UK)*. Um *pool* de cDNA das amostras controles foi utilizado como calibrador da reação. As reações foram executadas utilizando o sistema *TaqMan® Gene Expression Assays (TaqMan® MGB probes, FAM™ dye-labeled)* da *Applied Biosystems*.

As sondas e os *primers* para o gene *CXCL12 (Hs00601975_m1)*, *ACTB (Hs01060665_g1)* e *B2M (Hs00187842_m1)* foram obtidas usando *Assay-on-Demand™ Gene Expression Products (Applied Biosystems, Warrington, UK)*.

A RT-qPCR foi realizada para cada amostra em duplicata seguindo o protocolo do fabricante (*Applied Biosystems, Warrington, UK*).

O nível de expressão (RQ) para os genes analisados foi calculado para cada amostra de acordo com o método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (ou 2^{-Ct}), descrito previamente no *Applied Biosystems User Bulletin # 2 (PN 4303859) (Applied Biosystems, Warrington, UK)* e citado na literatura (Livak e Schmittgen, 2001). O *ACTB* e *B2M* (controles endógenos) e o calibrador serão usados como normalizadores para os cálculos do $2^{-\Delta\Delta CT}$.

4.7. *Tamanho do estudo*

Por tratar-se de um estudo inédito sem dados prévios passíveis de estimar médias e desvios-padrão e considerando os restritivos critérios de elegibilidade, a dificuldade esperada em obter amostras satisfatórias, propusemos um tamanho amostral que permite identificar ou descartar uma grande diferença entre os grupos (Cohen, 1988). Foram coletadas amostras de todas as pacientes elegíveis que aceitaram participar do estudo de fevereiro de 2013 a fevereiro de 2016, totalizando 20 mulheres inférteis com endometriose I/II e 16 controles inférteis.

4.8. *Análise dos dados*

Foi realizada uma análise exploratória de dados através de medidas de posição central e de dispersão e gráficos de *box-plot*. Para a comparação das características clínicas [idade, número de oócitos captados, índice de massa corporal (IMC) e tempo de infertilidade] e de expressão do gene *CXCL12* entre os grupos endometriose I/II e controle infértil, foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

As análises foram realizadas utilizando-se o programa SAS® 9.3.

O nível de significância adotado foi de 5%.

5. RESULTADOS

5.1. *Fluxograma*

No período de agosto de 2014 a fevereiro de 2016 foram analisados 1688 prontuários de mulheres admitidas por infertilidade conjugal no Serviço de Reprodução Assistida do Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, sendo que 1227 referiam-se a casais que seriam submetidos a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Desses, 159 pertenciam a pacientes que preenchiam os critérios de elegibilidade. Das 159 mulheres elegíveis, 108 iniciaram o ciclo de estimulação ovariana e foram convidadas a participar da pesquisa, sendo que 9 mulheres não aceitaram participar do estudo e 99 assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Destas, 32 foram excluídas (14 tiveram o ciclo cancelado por apresentarem má resposta ovariana, 1 suspendeu o tratamento por questões financeiras, 8 não possuíam amostras de células do cumulus disponíveis para a pesquisa e 9 não tiveram oócitos captados no ciclo de estimulação ovariana). Assim, foram coletadas amostras de 67 pacientes. Destas, 16 foram utilizadas em testes de extração de RNA. As demais 51 amostras de CCs tiveram RNA total extraído para o estudo. Quinze RNAs não foram considerados adequados, de modo que apenas 36 amostras (16 do grupo controle e 20 do grupo endometriose I/II) foram utilizadas nos experimentos. O fluxograma do estudo está representado na figura 3.

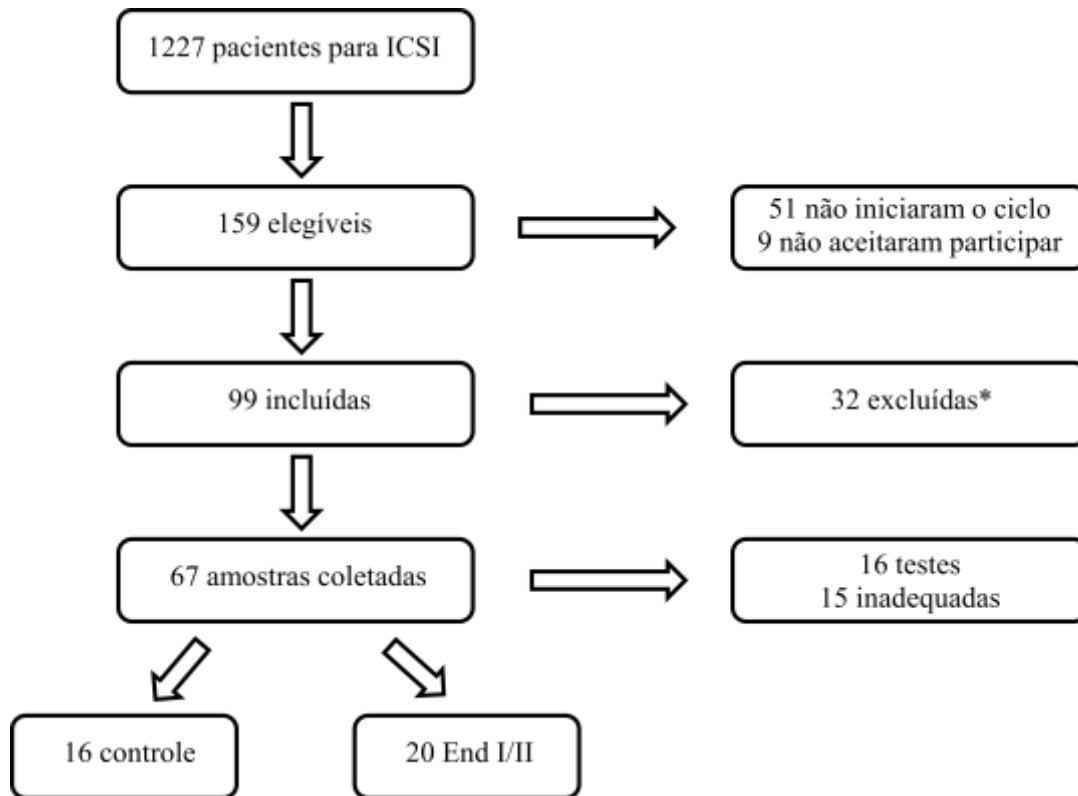


Figura 3: fluxograma do estudo com o número de pacientes elegíveis, incluídas, excluídas e amostras coletadas e analisadas divididas em controle e endometriose. *Dentre as excluídas, 14 tiveram o ciclo cancelado por apresentarem má resposta ovariana, 1 suspendeu o tratamento por questões financeiras, 8 não possuíam amostras de células do cumulus disponíveis para a pesquisa e 9 não tiveram oócitos captados no ciclo de estimulação ovariana

5.2. Caracterização dos grupos

Não houve diferença significativa para as variáveis idade, IMC e tempo de infertilidade entre os grupos controle e endometriose I/II (tabela 1).

O número de oócitos captados foi menor no grupo endometriose I/II comparado ao controle (tabela 1).

Tabela 1 – Idade, IMC, tempo de infertilidade e número de oócitos captados em pacientes controle e com endometriose I/II

Variável	Controle	Endometriose I/II	Valor de p
Idade (anos)	34,5 (32,5; 37,5)	36 (34; 38)	0.37
IMC (kg/m ²)	24,75 (22,48; 28,61)	24,63 (22,59; 27,72)	0.65
Tempo de infertilidade (meses)	81 (40,5; 108)	45 (19; 96)	0.23
Número de oócitos captados	9,5 (5,5; 12)	4,5 (3; 8,5)	0.04

Nota: Os dados são expressos como mediana (intervalo interquartil). Teste de Mann Whitney. Nível de significância: 5%. IMC: índice de massa corporal.

5.3. Expressão do gene *CXCL12*

De acordo com os resultados da RT-qPCR, o gene *CXCL12* apresentou expressão detectável em todas as amostras avaliadas. Apesar de ter se observado valores de expressão de *CXCL12* maiores no grupo endometriose I/II (mediana: 0,60; intervalo interquartil: 0,20 ; 2,14) quando comparado ao controle (mediana: 0,29; intervalo interquartil 0,21 ; 0,70), não se verificou diferença significativa ($p= 0,186$) (figura 3). No entanto, o poder do teste foi de 63%.

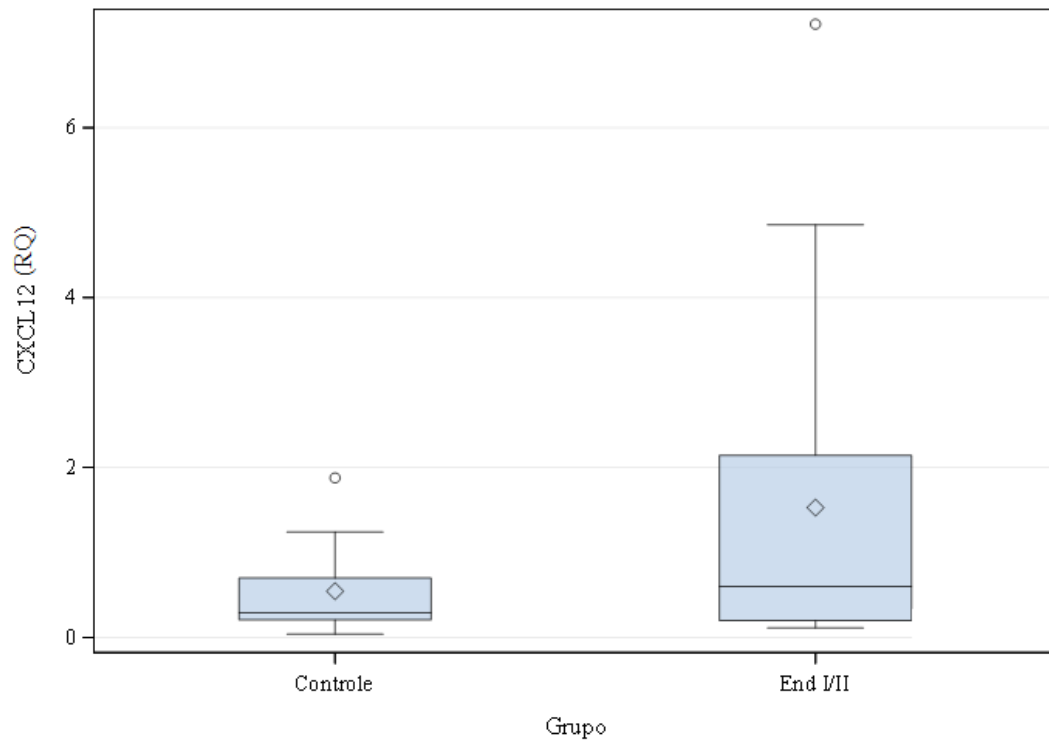


Figura 4 – Expressão do gene *CXCL12* em células do cumulus de mulheres inférteis por fator tubário e/ou masculino (Controle. Mediana: 0,29. Intervalo interquartil: 0,21; 0,70) e mulheres inférteis com endometriose inicial (End I/II. Mediana: 0,60. Intervalo interquartil: 0,20; 2,14); $p=0,186$.

6. DISCUSSÃO

Apesar da forte associação entre endometriose e infertilidade, os mecanismos envolvidos na sua etiopatogênese, principalmente nos casos de doença mínima e leve, ainda não foram completamente esclarecidos (Holoch e Lessey, 2010). Nesse sentido, questiona-se um impacto deletério da endometriose sobre a qualidade oocitária de suas portadoras (Brizek et al., 1995; Saito et al., 2002; Allegra et al., 2014; Donabela et al., 2015). A quimiocina *CXCL12* está envolvida em processos foliculares importantes para a aquisição de competência oocitária, no entanto, nenhum estudo avaliou sua expressão no microambiente folicular de mulheres inférteis com endometriose. A fim de investigar o papel desta quimiocina no comprometimento da fertilidade de mulheres com a doença, este estudo comparou a expressão do gene *CXCL12*, que codifica a respectiva quimiocina, em CCs de mulheres inférteis com endometriose e controles inférteis submetidas à estimulação ovariana controlada para realização de ICSI.

Evidências recentes sugerem um papel da *CXCL12* na promoção da expansão do complexo cumulus-oócito e na maturação oocitária (Hernandez-Gonzalez *et al.*, 2006; Rojo *et al.*, 2018). Estudos demonstraram um efeito direto da quimiocina *CXCL12* dentro do COC, aumentando a expressão dos principais genes ovulatórios *HAS2* e *TNFAIP6*, através do seu principal receptor *CXCR4*. Juntos, esses dados sugerem que a ação da quimiocina no ovário se estende além de seu papel como quimiotático, incluindo um possível efeito da via *CXCL12-CXCR4* na promoção de maturação oocitária. (Rojo *et al.*, 2018). Além disso, Zhang et al. demonstraram que a quimiocina *CXCL12* e seu receptor *CXCR4* estão expressos em oócitos e células somáticas ovarianas nas fases de folículo primordial, primário e secundário e que o sinal *CXCL12-CXCR4* também desempenha um papel direto na maturação de oócitos: o aumento transitório de *CXCR4* nas células da granulosa está associado a quebra da vesícula germinativa enquanto que a inibição da função do *CXCR4* diminui a maturação do oócito e a suplementação de *CXCL12* aumenta a maturação oocitária. Além disso, a sinalização *CXCL12-CXCR4* promove a expansão das células do cumulus e a síntese de matriz extracelular em modelos ovinos. (Zhang *et al.*, 2018). Em estudo de Kryczek *et al* foi demonstrado que mais de 80% dos linfócitos T de fluido folicular expressam o *CXCR4* e migram em resposta ao *CXCL12* expresso pelas células da granulosa. Também demonstraram que o *CXCL12* medeia um potente efeito anti-apoptótico nas células da granulosa primárias. Foram identificadas duas características para este efeito

anti-apoptótico. Primeiro, o *CXCL12* reduz a apoptose precoce das células da granulosa, mas não a apoptose tardia. Segundo, a atividade anti-apoptótica mediada por *CXCL12* depende totalmente da presença de linfócitos. A remoção de linfócitos induz perda completa do efeito anti-apoptótico de *CXCL12*. Portanto, o *CXCL12* funciona como uma ponte que liga a função das células da granulosa e as células do sistema imunológico. Assim, qualidade do embrião está positivamente associada à atividade anti-apoptótica mediada por *CXCL12*. A presença de linfócitos e *CXCL12* local pode contribuir para manter a alta qualidade embrionária por reduzir a apoptose espontânea de células da granulosa (Kryczek *et al.*, 2005). Assim, qualquer alteração que comprometa a expressão dessa quimiocina nas CCs poderia afetar a quimiotaxia, sobrevivência e expansão das CCs e, conseqüentemente, a aquisição de competência oocitária, o processo de ovulação e, potencialmente, a qualidade do embrião formado.

Contudo, os resultados do presente estudo não evidenciaram diferença na expressão do gene *CXCL12* em CCs de mulheres inférteis com a doença, sugerindo, inicialmente, que esta quimiocina não esteja alterada no microambiente folicular dessas pacientes. Entretanto, apesar da ausência de diferença estatística, maiores valores de expressão desse gene foram observados nas mulheres com a doença, as quais também obtiveram um número de óocitos captados significativamente menor. Como o poder do estudo foi baixo, não é possível afirmar, de fato, que não existem diferenças na expressão do *CXCL12*, de modo que apenas a ampliação da casuística pode elucidar essa questão. Assim, estudos com maior tamanho amostral são necessários para confirmar ou modificar os presentes achados, os quais auxiliarão na definição do tamanho amostral e, se confirmados, poderão sugerir um microambiente folicular alterado, com recrutamento exacerbado de linfócitos e possível dano aos processos de ovulação, expansão de CCs e aquisição de competência oocitária.

A literatura relata o envolvimento de outras quimiocinas na infertilidade feminina associada à endometriose. Estudos avaliando as quimiocinas *CCL2* (Tao *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2006) e *CCL5* (Xu *et al.*, 2006) em fluido peritoneal e/ou folicular de mulheres inférteis com a doença encontraram variação nos níveis de ambas, sugerindo a alteração de diferentes moléculas quimiotáticas importantes para a aquisição de competência oocitária. Jørgensen *et al* identificaram 13 citocinas que discriminam a presença ou ausência de endometriose em pacientes inférteis, entre elas, as quimiocinas *IL-8*, *MCP-1*, *MCP-3* e *CTACK* (Jørgensen H. *et al.*, 2017). Singh *et al* demonstraram

que o FF de folículos aspirados de pacientes com endometriose mostraram concentrações significativamente mais altas de *IL-8* e *IL-12* em comparação com controles, sugerindo que a inflamação no FF relacionada à endometriose pode contribuir para a diminuição da qualidade do oócito (Singh A. K. et al., 2016).

Assim, sugere-se a análise concomitante da *CXCL12* e de outras quimiocinas e citocinas envolvidas nos processos de foliculogênese e ovulação em casuística aumentada de CCs de mulheres inférteis com endometriose, o que poderia trazer dados mais consistentes para o entendimento do comprometimento da qualidade oocitária nessas pacientes.

A principal limitação deste estudo foi a pequena casuística avaliada em decorrência dos critérios de elegibilidade restritivos adotados, limitando a generalização dos resultados aqui obtidos. Por outro lado, os critérios de elegibilidade rigorosos, que eliminaram fatores potencialmente relacionados com comprometimento da receptividade endometrial, foram necessários para aumentar a validade interna do estudo.

7. CONCLUSÃO

Os achados do presente estudo não evidenciaram diferenças significativas na expressão do gene *CXCL12* em células do cumulus de mulheres inférteis com endometriose inicial (mínima e leve). No entanto, estudos com maior casuística e que avaliem concomitantemente outras quimiocinas são necessários para confirmar ou modificar os presentes achados, os quais auxiliarão na definição do tamanho amostral.

8. REFERÊNCIAS

ALLEGRA A. et al. The gene expression profile of cumulus cells reveals altered pathways in patients with endometriosis. **J Assist Reprod Genet.** v. 31, p. 1277–1285. 2014

ASRM, T. P. C. O. T. Endometriosis and infertility: a committee opinion. **Fertil Steril**, v. 98, n. 3, p. 591-8, Sep 2012. ISSN 1556-5653 (Electronic)

0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22704630> >.

ALBERTINI, D. F. et al. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Reproduction**.v. 121, n. 5, p. 647–53. 2001.

ASRM. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. **Fertil Steril**, v. 67, n.5, p 817-821, May 1997.

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

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

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

1058-0468.

BRÄNNSTRÖM, M.; ENSKOG, A. Leukocyte networks and ovulation. **J Reprod Immunol**, v. 57, n. 1-2, p. 47-60, 2002 Oct-Nov 2002. ISSN 0165-0378. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12385833> >.

BORRELLI, G. M., et al. Chemokines in the pathogenesis of endometriosis and infertility. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 98, n. 1. p. 1–9, Mar 2013.

BUSCHER U, et al. Cytokines in the follicular fluid of stimulated and non-stimulated human ovaries; is ovulation a suppressed inflammatory reaction? **Hum Reprod**. v. 14, p. 162–6. 1999.

BULLETTI, C. et al. Endometriosis and infertility. **J Assist Reprod Genet**, v. 27, n. 8, p. 441-7, Aug 2010. ISSN 1573-7330 (Electronic)

1058-0468 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20574791> >.

BURNEY, R. O.; GIUDICE, L. C. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. **Fertil Steril**, v. 98, n. 3, p. 511-9, Sep 2012. ISSN 1556-5653 (Electronic)

0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22819144> >.

BUCCIONE R, et al. FSH-induced expansion of the mouse cumulus oophorus in vitro is dependent upon a specific factor(s) secreted by the oocyte. **Dev Biol.**; v. 138, n. 1, p. 16-25. 1990.

CHOI, Y. S. et al. Alteration in the intrafollicular thiol-redox system in infertile women with endometriosis. **Reproduction**, v. 149, n. 2, p. 155-62, Feb 2015. ISSN 1741-7899. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25376627> >.

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

COTICCHIO, G, et al. Oocyte maturation: gametesomatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization. **Hum Reprod Update**. v. 21, n. 4, p. 427-54. 2015

DA BROI, M. G. et al. Increased concentration of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in follicular fluid of infertile women with endometriosis. **Cell and Tissue Research**, v. 366, n. 1, p. 231-242, OCT 2016 2016. ISSN 0302-766X;1432-0878.

DA BROI, M. G. et al. Oocyte oxidative DNA damage may be involved in minimal/mild endometriosis-related infertility. **Mol Reprod Dev**, v. 85, n. 2, p. 128-136, 02 2018. ISSN 1098-2795. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29247565> >.

DA LUZ, C. M. et al. PTGS2 down-regulation in cumulus cells of infertile women with endometriosis. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 35, n. 4, p. 379-386, OCT 2017 2017. ISSN 1472-6483;1472-6491.

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

DU, Y. B. et al. Endocrine and inflammatory factors and endometriosis-associated infertility in assisted reproduction techniques. **Arch Gynecol Obstet**, v. 287, n. 1, p. 123-30, Jan 2013. ISSN 1432-0711. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23053311> >.

DUMESIC, D. A. et al. Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. **Fertil Steril**, v. 103, n. 2, p. 303-16, Feb 2015. ISSN 1556-5653 (Electronic)

0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25497448> >.

Endometriosis and infertility. **Fertil Steril**, v. 86, n. 5 Suppl 1, p. S156-60, Nov 2006. ISSN 1556-5653 (Electronic)

0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17055813> >.

FITZHARRIS G., et al. Granulosa cells regulate oocyteintracellular pH against acidosis in preantral follicles by multiple mechanisms. **Development**. v. 134, n. 23, p. 4283-95. 2007

GARRIDO, N. et al. Follicular hormonal environment and embryo quality in women with endometriosis. **Hum Reprod Update**, v. 6, n. 1, p. 67-74, Jan-Feb 2000. ISSN 1355-4786 (Print)

1355-4786 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10711831> >.

GILCHRIST, R. B.; LANE, M.; THOMPSON, J. G. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. **Hum Reprod Update**, v. 14, n. 2, p. 159-77, 2008 Mar-Apr 2008. ISSN 1460-2369. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18175787> >.

GERARD N., et al. The interleukin-1 system and female reproduction. **J Endocrinol**. v. 180, p. 203-12. 2004

GIUDICE, L. C.; KAO, L. C. Endometriosis. **Lancet**, v. 364, n. 9447, p. 1789-99, Nov 13-19 2004. ISSN 1474-547X (Electronic)

0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15541453> >.

GUPTA, S. et al. Role of oxidative stress in endometriosis. **Reprod Biomed Online**, v. 13, n. 1, p. 126-34, Jul 2006. ISSN 1472-6483 (Print)

1472-6483 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16820124> >.

GUPTA, S. et al. Pathogenic mechanisms in endometriosis-associated infertility. **Fertil Steril**, v. 90, n. 2, p. 247-57, Aug 2008. ISSN 1556-5653 (Electronic)

0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18672121> >.

GMYREK, G.B. et al. Evaluation of monocyte chemotactic protein-1 levels in peripheral blood of infertile women with endometriosis. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol**. v. 122, n.2, p. 199-205. 2005.

HAMAMAH, S. et al. Comparative protein expression profiling in human cumulus cells in relation to oocyte fertilization and ovarian stimulation protocol. **Reprod Biomed Online**, v. 13, n. 6, p. 807-14, Dec 2006. ISSN 1472-6483 (Print)

1472-6483 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17169200> >.

HAMEL, M. et al. Identification of differentially expressed markers in human follicular cells associated with competent oocytes. **Hum Reprod**, v. 23, n. 5, p. 1118-27, May 2008. ISSN 1460-2350 (Electronic)

0268-1161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18310048> >.

HAOUZI, D.; HAMAMAH, S. Pertinence of apoptosis markers for the improvement of in vitro fertilization (IVF). **Curr Med Chem**, v. 16, n. 15, p. 1905-16, 2009. ISSN 0929-8673 (Print)

0929-8673 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19442154> >.

HERNANDEZ-GONZALEZ, I. et al. Gene expression profiles of cumulus cell oocyte complexes during ovulation reveal cumulus cells express neuronal and immune-related genes: does this expand their role in the ovulation process? **Mol Endocrinol**, v. 20, n. 6, p. 1300-21, Jun 2006. ISSN 0888-8809. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16455817> >.

HOLOCH, K. J.; LESSEY, B. A. Endometriosis and infertility. **Clin Obstet Gynecol**, v. 53, n. 2, p. 429-38, Jun 2010. ISSN 1532-5520 (Electronic)

0009-9201 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20436320> >.

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

0015-0282 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8486196 >.

JØRGENSEN, H., et al. Peritoneal fluid cytokines related to endometriosis in patients evaluated for infertility. **Fertility and Sterility**, v.107, n. 5, p. 1191–1199. 2017

KIDDER, G. M.; VANDERHYDEN, B. C. Bidirectional communication between oocytes and follicle cells: ensuring oocyte developmental competence. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 88, n. 4, p. 399-413, Apr 2010. ISSN 1205-7541 (Electronic)

0008-4212 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20555408> >.

KIDDER GM, MHAWI AA. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. **Reproduction**. v. 123 n. 5, p. 613-20. 2002

KRYCZEK, I. et al. The chemokine SDF-1/CXCL12 contributes to T lymphocyte recruitment in human pre-ovulatory follicles and coordinates with lymphocytes to increase granulosa cell survival and embryo quality. **Am J Reprod Immunol**, v. 54, n. 5, p. 270-83, Nov 2005. ISSN 1046-7408. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16212649> >.

KUMBAK, B. et al. In vitro fertilization in normoresponder patients with endometriomas: comparison with basal simple ovarian cysts. **Gynecol Obstet Invest**, v. 65, n. 3, p. 212-6, 2008. ISSN 1423-002X (Electronic)

0378-7346 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18073487> >.

LIU, F. et al. The expression and role of oxidative stress markers in the serum and follicular fluid of patients with endometriosis. **Clin Exp Obstet Gynecol**, v. 40, n. 3, p. 372-6, 2013. ISSN 0390-6663. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24283168> >.

LIU Z. et al. Interleukin-6: an autocrine regulator of the mouse cumulus cell-oocyte complex expansion process. **Endocrinology**. v. 150, p. 3360–8. 2009.

LIU Z. et al. The involvement of the Toll-like receptor family in ovulation. **J Assist Reprod Genet.** v. 25, p. 223–8. 2008.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001. ISSN 1046-2023 (Print)

1046-2023 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609> >.

MACHELON, V.; EMILIE, D. Production of ovarian cytokines and their role in ovulation in the mammalian ovary. **Eur Cytokine Netw**, v. 8, n. 2, p. 137-43, Jun 1997. ISSN 1148-5493. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9262962> >.

MARTINS, W. P. et al. Ultrasound for monitoring controlled ovarian stimulation: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Ultrasound Obstet Gynecol**, v. 43, n. 1, p. 25-33, Jan 2014. ISSN 1469-0705 (Electronic)

0960-7692 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23873633> >.

MEHRAD B, et al. Chemokines as mediators of angiogenesis. **Thromb Haemost.** v. 97, p. 755–62. 2007

MONNIAUX D. Driving folliculogenesis by the oocyte-somatic cell dialog: lessons from genetic models. **Theriogenology**. ; v. 86, n. 1, p. 41-53. 2016.

PACZKOWSKI M., et al. Comparative importance of fatty acid beta-oxidation to nuclear maturation, gene expression, and glucose metabolism in mouse, bovine, and porcine cumulus oocyte complexes. **Biol Reprod**; v. 88, n. 5, p. 111. 2013

PELLICER, A. et al. Exploring the mechanism(s) of endometriosis-related infertility: an analysis of embryo development and implantation in assisted reproduction. **Hum Reprod**, v. 10 Suppl 2, p. 91-7, Dec 1995. ISSN 0268-1161 (Print)

0268-1161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8745306> >.

PINCUS G, ENZMANN E. V. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro : I. The activation of ovarian eggs. **J Exp Med.** v. 62, n. 5, p. 665-75. 1935.

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

REVEL, A. Defective endometrial receptivity. **Fertil Steril**, v. 97, n. 5, p. 1028-32, May 2012. ISSN 1556-5653 (Electronic)

0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22542142> >.

RICHARDS J. S., et al., Molecular mechanisms of ovulation and luteinization. **Mol Cell Endocrinol.** v. 145, p. 47–54. 1998.

ROJO, J. L. et al. Stromal-derived factor 1 directly promotes genes expressed within the ovulatory cascade in feline cumulus oocyte complexes. **J Assist Reprod Genet**, Mar 2018. ISSN 1573-7330. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29516335> >.

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

ROCK, J. ; MARKHAM, S. Pathogenesis of endometriosis. **The Lancet**, v. 340, n. 1, p. 1264. ISSN 1264-7.

SAMPSON, J. A. Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation. *Am J Pathol*, v. 3, n. 2, p. 93-110 43, Mar 1927. ISSN 0002-9440 (Print)

0002-9440 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19969738> >.

SARAPIK A, et al. Follicular proinflammatory cytokines and chemokines as markers of IVF success. **Clin Dev Immunol**. 2012.

SCHINDLER R, et al. Induction of ovarian primordial follicle assembly by connective tissue growth factor CTGF. **PLoS One**. 2010

SIGNORILE, P. G.; BALDI, A. Endometriosis: new concepts in the pathogenesis. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 42, n. 6, p. 778-80, Jun 2010. ISSN 1878-5875 (Electronic)

1357-2725 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20230903> >.

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

SIMON AM, et al. Female infertility in mice lacking connexin 37. **Nature**. v. 385, n. 6616, p. 525-9. 1997

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

SINGH A. K. et al. Intrafollicular interleukin-8, interleukin-12, and adrenomedullin are the promising prognostic markers of oocyte and embryo quality in women with endometriosis. **J Assist Reprod Genet**. v. 33, p. 1363–1372. 2016.

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

1058-0468.

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

SUTTON, M. L., GILCHRIST RB, THOMPSON JG. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. **Reproduction**.; v. 139, n. 4, p. 685-95. 2010.

TAMBA, S. et al. Timely interaction between prostaglandin and chemokine signaling is a prerequisite for successful fertilization. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 38, p. 14539-44, Sep 2008. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18794532> >.

TAO, Y. et al. The Peritoneal Leptin, MCP-1 and TNF- in the pathogenesis of endometriosis-associated infertility. **Am. J. Reprod. Immunol.** v. 65, n. 4, p. 403–406. 2011.

TILLY, J. L. Apoptosis and ovarian function. **Rev Reprod**, v. 1, n. 3, p. 162-72, Sep 1996. ISSN 1359-6004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9414454> >.

TROMBLY, D. J., et al. Roles for transforming growth factor beta superfamily proteins in early folliculogenesis. **Semin Reprod Med.** v. 27, p. 14–23. 2009.

WEI, Q. et al. Reduced expression of biomarkers associated with the implantation window in women with endometriosis. **Fertil Steril**, v. 91, n. 5, p. 1686-91, May 2009. ISSN 1556-5653 (Electronic)

0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18672236> >.

WINTERHAGER E. et al. Gap junction connexins in female reproductive organs: implications for women's reproductive health. **Hum Reprod Update.** v. 21, n. 3, p. 340-52. 2015.

WU, G. et al. Intrafollicular inflammatory cytokines but not steroid hormone concentrations are increased in naturally matured follicles of women with proven endometriosis. **J Assist Reprod Genet**, v. 34, n. 3, p. 357-364, Mar 2017. ISSN 1573-7330. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28074436> >.

Xu, H. et al. Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) and monocyte chemotactic protein 1 in follicular fluid accumulate differentially in patients with and without endometriosis undergoing in vitro fertilization. **Fertil. Steril.** v. 86, n.6, p. 1616–1620. 2006

ZHANG, Q. F. et al. Relationship between resistin and IL-23 levels in follicular fluid in infertile patients with endometriosis undergoing IVF-ET. **Adv Clin Exp Med**, v. 26, n. 9, p. 1431-1435, Dec 2017. ISSN 1899-5276. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29442466> >.