

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

**Expressão do BMP15 e do GDF9 em oócitos e do receptor BMPR2
nas células do cumulus de mulheres normais e com síndrome dos
ovários policísticos**

LUCIANA OCHUIUTO TEIXEIRA DE RESENDE

Ribeirão Preto

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Luciana Ochuiuto Teixeira de Resende

**Expressão do BMP15 e do GDF9 em oócitos e do receptor BMPR2
nas células do cumulus de mulheres normais e com síndrome dos
ovários policísticos**

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de Ginecologia e Obstetrícia, opção Biologia da Reprodução.

Orientadora: Profa. Dra. Rosana Maria dos Reis

Ribeirão Preto

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Resende, Luciana Ochuiuto Teixeira de

Expressão do BMP15 e do GDF9 em oócitos e do receptore *BMPR2* nas células do cumulus de mulheres normais e com síndrome dos ovários policísticos. Ribeirão Preto, 2010.

143 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia da Reprodução.

Orientador: Reis, Rosana Maria dos.

1. BMP15 2. GDF9 3. SOP 4. Folliculogenesis 5. FIV

FOLHA DE APROVAÇÃO

Expressão do BMP15 e do GDF9 em oócitos do receptor BMPR2 nas células do cumulus de mulheres normais e com síndrome dos ovários policísticos.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de Ginecologia e Obstetrícia, opção Biologia da Reprodução.

Data da defesa: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Profa. Dra. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Profa. Dra. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Profa. Dra. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

“Não basta ensinar ao homem uma especialidade, porque se tornará assim uma máquina utilizável e não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto.”

Albert Einstein

A meus pais, Antonio e Edna, que acreditaram na minha vitória e me guiaram para que meu caminho até ela fosse o mais suave possível. Obrigada pelo apoio, companheirismo e por acreditarem em mim. Obrigada pela compreensão e pelo carinho. Vocês serão sempre meus heróis, minha referência de felicidade. Amo vocês.

À minha irmã Fabiana e seu marido João Miguel que, mesmo do outro lado do oceano, me apoiaram e me deram força para que eu alcançasse meus objetivos. Ao meu sobrinho, João Thomaz, que com seus olhos cheios de ternura me fez acreditar que lutar pelo que nós acreditamos vale a pena. Já não consigo viver sem existir você em minha vida. Obrigada pelo apoio e pelo carinho. Amo muito vocês, sinto uma imensa saudade.

Ao meu namorado, Rafael, pelo carinho, amor, companheirismo, apoio e compreensão ao longo destes anos ao meu lado. Obrigada por estar ao meu lado em todos os momentos, bons e ruins, me fazer rir nos momentos que mais preciso e por tornar tudo mais fácil em minha vida. Meu amor e admiração por você crescem a cada dia. Amo-te todos os dias de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Às mulheres que aceitaram participar deste estudo pela confiança, colaboração e parceria.

À minha orientadora, Profa. Dra. Rosana Maria dos Reis, pela confiança na realização deste trabalho. Obrigada pela oportunidade de sua orientação, apoio e companheirismo e todo aprendizado. Minha admiração como orientadora, médica, pesquisadora e como pessoa.

Ao Dr. Paulo Cesar Escolano, grande responsável pela minha trajetória na área de Reprodução Humana, pela indicação, amizade e parceria. Minha amizade, admiração e gratidão.

Ao Prof. Dr. Rui Alberto Ferriani, pela oportunidade e pelo apoio científico. Obrigada por todas as contribuições e auxílios neste trabalho.

À Profa. Dra. Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva, pela co-orientação durante a ausência de minha orientadora. Obrigada pelo apoio, contribuições e pela confiança.

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

Ao Prof. Dr. Luiz Gonzaga Toni, pela oportunidade de realizar os experimentos no Departamento de Oncopediatria. Obrigada pelo apoio científico e pela confiança.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Scridelli, pelo auxílio e gentileza de disponibilizar seu laboratório e equipe para a realização dos experimentos de PCR em tempo real, bem como nos resultados.

À Rosane Gomes de Paula Queiroz, por todo apoio neste trabalho, pela parceria na padronização da técnica de extração de RNA e no processamento das amostras. Obrigada pela contribuição e pela amizade.

Ao Daniel Antunes Moreno, pela realização dos experimentos de PCR em tempo real, além da gentileza e amizade sempre presente.

À Dra. Alessandra Aparecida Vireque, pelo apoio científico, parceria e por acreditar na minha capacidade. Obrigada pela sua dedicação e pelo empenho desde o início até a conclusão deste trabalho. Muito obrigada pela sua amizade, por estar ao meu lado sempre. Minha eterna admiração e carinho.

À Dra. Aline Mesquita Zyman, pela colaboração na coleta das amostras e pela eterna amizade. Obrigada pelo apoio e confiança. Minha eterna admiração e carinho.

À Dra. Laura Ferreira Santana, pela colaboração nas diversas etapas deste trabalho. Obrigada pela confiança, apoio, companheirismo e pela amizade. Minha eterna admiração e carinho.

À Cristina Picinato Medeiros de 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 Maria Albina V. Bortolheiro, pelo auxílio nas dosagens hormonais das amostras, do Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia do HCFMRP-USP. Obrigada pelo apoio e pela amizade sempre presente.

Ao biólogo José Roberto da Silva e a Lucimara Bueno, pela realização das dosagens hormonais, do Laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Clínica Médica do HCFMRP-USP pela colaboração nas dosagens das amostras.

À toda equipe do Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia do HCFMRP-USP,
Debora Medeiros, Cristiana Padovan Ribas, Marilda Yamada Dantas, Maria Aparecida
Carneiro Vasconcelos, Sandra Cavichiollo Vianna, Maria Auxiliadora Pádua, Marisa Oliva
Blanco, pela colaboração e apoio neste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do HCFMRP-USP, Suelen
Bezerra Soares, Ilza Rezende Mazzocato, Rosane Aparecida Cunha Casula, Reinaldo Vicente
Tavares e Ricardo Perussi e Silva, meus mais sinceros agradecimentos.

A Sra. Elettra Greene, pela solicitude e eficiência nas traduções, meus mais sinceros
agradecimentos.

À Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do HCFMRP-USP (FAEPA), pelo
auxílio financeiro concedido.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio
financeiro concedido.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio
financeiro concedido.

RESUMO

RESENDE, L.O.T. Expressão do BMP15 e do GDF9 em oócitos do receptor BMPR2 nas células do cumulus de mulheres normais e com síndrome dos ovários policísticos. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

OBJETIVO: avaliar a expressão gênica do fator de crescimento e diferenciação-9 (GDF9) e da proteína óssea morfogenética-15 (BMP15) em oócitos e receptores BMPR2 em células da granulosa (CG) de mulheres com síndrome dos ovários policísticos (SOP) submetidas à fertilização *in vitro* (FIV) e comparar com grupo controle; analisar a relação dos esteróides no fluido folicular (FF) de mulheres com SOP e controles; analisar a correlação dos níveis dos esteróides sexuais no FF com a expressão do GDF9 e BMP15 nos oócitos e do BMPR2 nas células do cumulus de mulheres com SOP e grupo controle submetidas à FIV.

DELINEAMENTO: prospectivo, caso-controle.

PACIENTES E MÉTODOS: foram incluídas 18 pacientes com SOP e 35 pacientes controles sendo a causa da infertilidade fator masculino, submetidas à hiperestimulação ovariana controlada (HOC) para procedimento de FIV. A indução da ovulação foi realizado com FSH recombinante, na dose de 100 a 200 mg/dia, para o bloqueio hipofisário utilizou-se GnRH α , no esquema longo, e foi administrado hCG recombinante para a maturação folicular. No dia da aspiração dos oócitos foi colhido FF de um folículo pequeno (10-14mm) e um grande (>18mm) para dosagem dos esteróides sexuais, sendo divididos em 4 grupos: G1= folículo pequeno do grupo controle; G2 = folículo pequeno do grupo SOP; G3 = folículo grande do grupo controle e G4 = folículo grande do grupo SOP. Para dosagem no FF de estradiol e progesterona utilizou-se o método de quimioluminescência e para a testosterona e androstenediona o radioimunoensaio. Para análise da expressão dos genes BMP15 e GDF9, utilizamos os oócitos maduros de cada paciente. As CGs foram removidas através da técnica

de microdissecção. Os oócitos e as CGs foram armazenados individualmente em criotubos contendo 1 µl de meio de cultivo e mantidos em nitrogênio líquido. Para a extração de RNA dos oócitos e das GCs utilizou-se o *RNeasy Micro Kit (Qiagen®)*. A quantificação dos genes foi realizada pela técnica de reação em cadeia polimerase em tempo real (PCR-RT).

RESULTADOS: observamos que a dosagem dos esteróides no FF mostrou que os níveis de progesterona de todos os folículos pequenos (8.435 ± 3.305 ng/mL) apresentaram valores menores do que os grandes (10.280 ± 3.475 ng/mL), $p<0,01$. A concentração de progesterona dos folículos do grupo SOP (8.095 ± 4151 ng/mL) foi menor se comparada com o controle (9.824 ± 3128 ng/mL), $p=0,03$. A testosterona apresentou diferença entre o G1 ($325,97\pm 122,64$ ng/dL) e G3 ($207,47\pm 97,905$ ng/dL) $p<0,001$ e entre o G3 ($207,47\pm 97,905$ ng/dL) e G4 ($336,57\pm 120,30$ ng/dL) $p<0,001$. Ao compararmos folículos pequenos e grandes, independente do grupo experimental, os pequenos ($508,9\pm 266$ ng/dL) apresentam valores maiores de testosterona do que os grandes ($245,10\pm 123$ ng/dL), $p<0,0001$. A expressão do gene BMP15 nos oócitos foi significativamente maior nas mulheres com SOP quando comparada ao grupo controle (Mediana = 5,95 e 0,59, respectivamente) com $p=0,0005$, assim como a expressão do GDF9, que também mostrou-se elevada nas mulheres com SOP quando comparadas ao grupo controle (Mediana = 2,70 e 0,63, respectivamente), com $p=0,0006$. O BMP15 mostrou ter correlação positiva com as taxas de gravidez (dosagem de β -hCG) ($r=0.36$, $p=0,0060$). Ao correlacionar a expressão do gene com os grupos separadamente, observamos que no grupo SOP, quanto maior a expressão do BMP15 maior a taxa de gestação ($r=0.60$, $p=0,0062$) enquanto que no grupo controle não observamos esta correlação ($r = -0.04293$, $p=0,7980$). A correlação entre a expressão do GDF9 e a testosterona no FF grande foi positiva quando analisamos ambos os grupos ($r=0.26504$, $p=0,0398$), porém ao analisarmos os grupos separadamente, não observamos correlação com o grupo SOP ($r=0.32527$, $p=0,7454$) nem com o grupo controle ($r=0.11887$, $p=0,1969$). A correlação da

expressão do GDF9 com os demais esteróides não teve resultados significativos. A expressão do GDF9 também está relacionada com a taxa de gravidez. Quanto maior a expressão, maior a taxa de gestação em ambos os grupos ($r=0.26504$, $p=0.0463$). Ao analisarmos esta correlação com os grupos separadamente, não houve diferença significativa no grupo SOP ($r=0.32527$, $p=0,1742$) e também não houve diferença no grupo controle ($r=0.11887$, $p=0,4772$). Comparando a expressão do BMP2 com os níveis de esteróides no FF grande, observamos que sua expressão teve uma correlação positiva com a testosterona ($r=0.29293$, $p=0,0433$). Na análise por grupo, esta correlação foi positiva apenas no grupo SOP ($r=0.62756$, $p=0,0163$). Com relação à androstenediona, a expressão do receptor BMP2 foi positiva no grupo SOP ($r=0.55966$, $p=0,0374$). Observamos que a taxa de gravidez teve uma correlação positiva com o número de embriões formados ($r=2,726$, $p=0,050$) quando analisamos ambos os grupos. Separadamente, não houve diferenças entre eles.

CONCLUSÃO: Nas mulheres com SOP a progesterona apresenta-se diminuída no FF e a testosterona aumentada no FF de folículos maduros comparadas ao grupo controle. A expressão do BMP15 e do GDF9 apresentou-se maior nas pacientes com SOP comparada ao grupo controle, sugerindo que o uso de FSH recombinante pode ter corrigido a expressão destes genes, resultando em melhores taxas de gravidez.

Palavras-chave: BMP15, GDF9, SOP, Foliculogênese, FIV.

SUMMARY

RESENDE, LOT. Expression of BMP15 and GDF9 oocyte and receptor BMPR2 in cumulus cells of normal women and with polycystic ovary syndrome. University of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo.

OBJECTIVE: to evaluate the gene expression of the growth and differentiation factor-9 (GDF9) and of the morphogenetic bone protein-15 (BMP15) in oocytes and of BMPR2 receptors in granulosa cells (GC) of women with polycystic ovary syndrome (PCOS) submitted to in vitro fertilization (IVF) compared to a control group; to determine the levels of steroids in the follicular fluid (FF) of women with PCOS and controls; to determine the correlation of sex steroids in FF with the gene expression of GDF9 and BMP15 in oocytes and of BMPR2 in the luteinized GC of women with PCOS and of a control group submitted to IVF.

DESIGN: case-control.

PATIENTS: The study was conducted on 18 patients with PCOS and 35 control patients with infertility due to male factor, submitted to controlled ovarian hyperstimulation for IVF. Ovulation was induced with recombinant FSH at the dose of 100 to 200 mg/day, pituitary blockade was performed with GnRHa, in the long scheme, and recombinant hCG was administered for follicular maturation. On the day of oocyte aspiration, FF was collected from a small follicle (10-14 mm) and from a large follicle (>18 mm) for the determination of sex steroids and the material was divided into 4 groups: G1 = small follicle from the control group; G2 = small follicle from the PCOS group; G3 = large follicle from the control group, and G4 = large follicle from the PCOS group. The expression of genes BMP15 and GDF9 was determined in mature oocytes from each patient. GC were removed by microdissection and oocytes and CG were stored individually in cryotubes containing 1 µl of culture medium

and kept in liquid nitrogen. For RNA extraction from the oocytes and the CG, we used the *RNeasy Micro Kit (Qiagen®)*.

INTERVENTIONS: The genes were quantified by the real time polymerase chain reaction (PCR-RT). The concentration of estradiol and progesterone in FF was determined by chemiluminescence and the concentration of testosterone and androstenedione by radioimmunoassay (RIA).

RESULTS: The results of steroid determination in FF showed that the progesterone levels of all small follicles (8.435 ± 3.305 ng/mL) were lower than those of large follicles (10.280 ± 3.475 ng/mL), $p < 0.01$. The progesterone level in the follicles of the PCOS group (8.095 ± 4151 ng/mL) was lower than control (9.824 ± 3128 ng/mL), $p = 0.03$. Testosterone differed between G1 ($325,97 \pm 122,64$ ng/dL) and G3 ($207,47 \pm 97,905$ ng/dL), $p < 0.001$, and between G3 ($207,47 \pm 97,905$ ng/dL) and G4 ($336,57 \pm 120,30$ ng/dL), $p < 0.001$. Comparison of all follicles, small and large, revealed that the small ones (508.9 ± 266 ng/dL) had higher testosterone levels than the large ones (245.10 ± 123 ng/dL), $p < 0.0001$. The expression of the BMP15 gene in oocytes was significantly higher in women with PCOS compared to control (median = 5.95 and 0.59, respectively), with $p = 0.0005$, as also was the expression of the GDF9 gene (median = 2.70 and 0.63, respectively), with $p = 0.0006$. BMP15 was positively correlated with pregnancy rate (β -hCG determination) ($r = 0.36$, $p = 0.006$). When correlating the expression of this gene with each group separately, we observed that in the PCOS group, the higher the expression of BMP15, the higher the pregnancy rate ($r = 0.60$, $p = 0.0062$) whereas no such correlation was observed in the control group ($r = -0.04293$, $p = 0.7980$). The expression of GDF9 was also correlated with pregnancy rate, with a higher pregnancy rate in both groups the higher the expression of this gene ($r = 0.26504$, $p = 0.0463$). When this correlation was analyzed separately for each group, no significant difference was observed in the PCOS group ($r = 0.32527$, $p = 0.1742$) or in the control group ($r = 0.11887$, $p = 0.4772$). When

we analyzed the two groups as a whole, the pregnancy rate was found to be positively correlated with the number of embryos formed ($r=2,726$ $p=0.050$) and separate analysis of each group showed no difference between them.

CONCLUSIONS: Progesterone was reduced in the FF of PCOS patients and testosterone was increased in the FF of mature follicles compared to control, demonstrating the role of hyperandrogenism in ovarian folliculogenesis. the expression of BMP15 and GDF9 was higher in patients with PCOS than in control patients, suggesting that the use of recombinant FSH may have corrected the expression of these genes, resulting in better pregnancy rates.

Keywords: BMP15, GDF9, PCOS, Folliculogenesis, IVF.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Possível demonstração dos alvos do GDF9 e BMP15. O GDF9 e o BMP15 são fatores secretados pelo oócito e agem em células alvo que devem incluir as células do cumulus e as células da granulosa mural. Os genes coloridos em verde foram demonstrados por serem regulados pelo GDF9 recombinante *in vitro*. Os genes coloridos em vermelho sofrem ação negativa. Nem todos os genes listados aqui foram verificados como alvos do GDF9. O receptor de FSH (Fshr) tem sido demonstrado por ser inibido apenas pelo BMP15. O asterisco indica um gene com regulação variável por diferentes preparações de GDF9 recombinante. Cyp17a1: citocromo P450, família 17, subfamília a, polipeptídeo 1; Kitl: kit ligante; Star: proteína reguladora da esteroidogênese aguda (Pangas *et al.*, 2005). 25
- Figura 2:** Representação esquemática da progressão da foliculogênese em ovelhas que são normais (topo), heterozigotas com mutação no GDF9 e BMP15 (no meio), e homozigota com mutação no BMP15 (abaixo). As bolas azuis representam os folículos respondedores a FSH, onde os azuis mais escuros mostram uma maior sensibilidade que os mais claros. A-D representam as atividades biológicas do BMP15 ou GDF9 que correspondem ao desenvolvimento normal e anormal do folículo. (A) Em ovelhas normais, a mitose induzida pelo BMP15 e GDF9 é necessária para que o folículo passe do estágio primário. (B) O BMP15 e o GDF9 agem para administrar a sensibilidade ao FSH nos folículos secundários e antrais, prevenindo a citodiferenciação precoce rendendo assim números normais de folículos pré-ovulatórios. (C) Nas ovelhas heterozigotas, os níveis reduzidos de BMP15 e GDF9 são suficientes para a mitose das células da granulosa, estimulando os folículos a progredirem além do estágio primário. (D) Os níveis reduzidos de BMP15 e GDF9 em heterozigotas, entretanto, diminui a citodiferenciação induzida pelo FSH, que leva ao aumento do número de folículos de Graaf que sofrem maturação precoce e ovulam mesmo pequenos. Em ovelhas homozigotas com mutação no BMP15, a ausência de mitose das células da granulosa induzidas pelo BMP15 impede o desenvolvimento folicular após o estágio primário. Abreviações: BMP15: proteína óssea morfogenética-15; GC: células da granulosa; GDF9: fator de crescimento e diferenciação-9; FSH: homônio folículo estimulante (Moore *et al.*, 2004). 27
- Figura 3:** Organograma de inclusão e seguimento do estudo. 38
- Figura 4:** Representação esquemática da indução de ovulação com associação. GnRHa/FSH/hCG. CO = captação dos oócitos, TE = transferência de embriões. 42
- Figura 5:** Comparação entre as dosagens de estradiol no FF entre folículos de 10 a 14 mm e folículos maiores que 18 mm do grupo controle e do grupo SOP. A linha que cruza o meio de cada quadro representa a média 52

Figura 6:	Comparação entre as dosagens de progesterona no FF de folículos pequenos e grandes do grupo SOP e grupo controle. A linha que cruza o meio de cada quadro representa a média.....	53
Figura 7:	Comparação entre as dosagens de progesterona em todos os FF pequenos e todos os FF grandes. A linha que cruza o meio de cada quadro representa a média.....	54
Figura 8:	Comparação entre as dosagens de progesterona em todos os FF do grupo controle e todos os FF do grupo SOP. A linha que cruza o meio de cada quadro representa a média.....	54
Figura 9:	Comparação entre as dosagens de testosterona no FF de folículos pequenos e grandes do grupo SOP e grupo controle. A linha que cruza o meio de cada quadro representa a média.....	55
Figura 10:	Comparação entre as dosagens de androstenediona no FF de folículos de 10 a 14 mm e folículos maiores que 18 mm do grupo controle e do grupo SOP. A linha que cruza o meio de cada quadro representa a média.....	56
Figura 11:	Comparação das dosagens de glicose no plasma entre os grupos SOP e controle.....	57
Figura 12:	Comparação das dosagens de insulina no plasma entre os grupos SOP e controle.....	57
Figura 13:	Gráfico representativo da expressão do gene BMP15 em oócitos individuais de mulheres com SOP e controles. A linha que cruza as colunas representa a mediana.....	58
Figura 14:	Gráfico representativo da expressão do gene GDF9 em oócitos individuais de mulheres com SOP e controles. A linha que cruza as colunas representa a mediana.....	59
Figura 15:	Gráfico representativo da expressão do gene BMP2 em células da granulosa de mulheres com SOP e controles. A linha que cruza as colunas representa a mediana.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Descrição dos fenótipos de ovelhas e ratas com mutações ou deleções nos genes BMP15 e GDF9	28
Tabela 2:	Distribuição da casuística das mulheres do grupo controle e do grupo SOP quanto à idade, peso, índice de massa corporal (IMC), hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio tireotrófico estimulante (TSH) e prolactina	39
Tabela 3:	Distribuição da casuística das mulheres com síndrome dos ovários policísticos quanto à idade, peso, índice de massa corporal (IMC), hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio tireotrófico estimulante (TSH) e prolactina.....	40
Tabela 4:	Taxa de gravidez entre os grupos SOP e controle	60

LISTA DE ABREVIATURAS

- GDF9 – fator de crescimento e diferenciação 9
- BMP15 – proteína óssea morfogenética 15
- BMPs – proteínas ósseas morfogenéticas
- BMPR2 – receptor de proteína óssea morfogenética 2
- SOP – Síndrome dos ovários policísticos
- FOP – Falência ovariana precoce
- CG – Células da granulosa
- CT – Células da teca
- FIV – Fertilização *in vitro*
- RNA – ácido ribonucleico
- PCR-RT – Reação em cadeia polimerase em tempo real
- FF – Fluido folicular
- GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofinas
- FSH – Hormônio folículo estimulante
- LH – Hormônio luteinizante
- E2 – estradiol
- T – testosterona
- P4 – progesterona
- $\Delta 4$ - androstenediona
- TGF- β – Fator de crescimento e diferenciação beta
- Smad – Proteína Smad
- HAS-2 – Ácido hialurônico sintetase 2
- COX2 – cicloxigenase 2

StAR – proteína reguladora da esteroidogênese aguda

IMC – Índice de massa corporal

ICSI – microinjeção de espermatozoides

hCG – Gonadotrofina coriônica humana

CV – Coeficiente de variação

HOC – hiperestimulação ovariana controlada

WHO – organização mundial de saúde

ATL – *Advanced Technology Laboratory*

ALK2 – *activin-like kinase-2*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1. Foliculogênese	22
1.2. Proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs)	23
1.3. Importância dos fatores secretados pelo oócito na foliculogênese: estudos em modelo experimental ovino e murino	25
1.4. Desenvolvimento folicular e esteroidogênese na síndrome dos ovários policísticos	29
1.5. Síndrome dos ovários policísticos e os resultados da FIV	32
2. OBJETIVOS	34
2.1. Objetivo Geral	34
2.2. Objetivos Específicos	34
3. HIPÓTESES	35
4. CASUÍSTICA E METODOLOGIA	36
4.1. Desenho do estudo	36
4.1.1. Critérios de Inclusão	36
4.1.2. Grupo de Estudo	36
4.1.3. Grupo Controle	37
4.1.4. Critérios de Exclusão	37
4.1.5. Cálculo amostral	38
4.1.6. Seleção da Amostra	39
4.2. PROCEDIMENTOS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA	41
4.2.1. Programação da Menstruação	41
4.2.2. Bloqueio hipofisário	41
4.2.3. Dia do início da indução	41
4.2.4. Indução da ovulação	42
4.2.5. Captação dos oócitos	42
4.3. PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS DA GRANULOSA E DO FLUIDO FOLICULAR	43
4.4. IDENTIFICAÇÃO DOS OÓCITOS	44
4.5. EXPRESSÃO GÊNICA	44
4.5.1. Extração e amplificação do RNA	44
4.5.2. Preparo dos reagentes do <i>RNEASY Micro Kit (Qiagen)</i>	44

4.5.3. Procedimento de extração dos oócitos e células da granulosa individuais	45
4.5.4. Síntese do cDNA.....	46
4.5.5. Quantificação do cDNA em NanoDrop	47
4.5.6. Análise da expressão dos genes GDF9 e BMP15 e BMPR2	47
4.5.7. Cálculo dos resultados.....	48
4.6. DOSAGEM DOS ESTERÓIDES SEXUAIS NO FF.....	48
4.6.1. Dosagens de estradiol e progesterona no FF	49
4.6.2. Dosagens de testosterona e de androstenediona no FF	49
4.6.3. Dosagens de glicose e insulina no plasma	50
4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
5. RESULTADOS	52
5.1. Dosagem de estradiol no FF	52
5.2. Dosagem de progesterona no FF	53
5.3. Dosagem de testosterona no FF	55
5.4. Dosagem de androstenediona no FF	56
5.5. Dosagem de glicose e insulina no plasma.....	56
5.6. Expressão do BMP15 e do GDF9 nos oócitos.....	58
5.7. Expressão do BMPR2 nas células da granulosa	59
5.8. AVALIAÇÃO DA TAXA DE GRAVIDEZ	60
5.9. Análise da correlação da expressão dos genes BMP15, GDF9 em oócitos e do receptor BMPR2 nas células da granulosa luteinizadas com os níveis de esteróides sexuais no FF	61
6. DISCUSSÃO	63
6.1. Os esteróides sexuais no FF	63
6.2. A expressão dos fatores BMP15 e GDF9 nos oócitos	66
6.3. Análise da correlação entre a expressão do BMP15 e do GDF9 em oócitos e do BMRP2 nas células do cumulus com os níveis de esteróides sexuais no FF de folículos maduros.....	69
7. CONCLUSÕES.....	71
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
ANEXOS	78

1. INTRODUÇÃO

1.1. Foliculogênese

A regulação da função reprodutiva feminina é realizada pelo eixo hipotálamo-hipófise-ovariano por meio do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), do hormônio foliculo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH) e esteróides. Além desses hormônios, estímulos autócrinos e parácrinos participam deste complexo sistema (Camargos et al., 2003).

O crescimento folicular é um processo contínuo até a ovulação ou atresia. Da coorte de folículos que inicia o crescimento, apenas um folículo será selecionado para ser o dominante e atingir a ovulação. Uma vez determinada esta dominância, os outros folículos irão entrar em atresia. O período de tempo transcorrido entre o estágio de folículo primário até o pré-ovulatório é de 85 dias, sendo a maioria deste tempo independente da ação das gonadotrofinas. A partir de um determinado momento a presença de FSH torna-se essencial para que a coorte de folículos recrutada continue em crescimento e ocorra a dominância folicular. Na ausência de FSH toda a coorte entra em apoptose (Camargos et al., 2003).

Uma das questões mais importantes a serem consideradas na sobrevivência das espécies está baseada no determinante do número de ovulações e o número de folículos a serem descartados. Nos mamíferos, o número de oócitos ovulados está relacionado ao número de folículos pré-ovulatórios que são estimulados em cada ciclo reprodutivo (Gougeon et al., 1996).

A formação de um folículo dominante é um processo que envolve crescimento, proliferação celular e citodiferenciação (Suh et al., 2002). Durante a fase inicial deste processo (pré-antral e estágio independente de gonadotrofina), o crescimento e desenvolvimento folicular são controlados pelos mecanismos autócrino/parácrino (McGee et

al., 2000). Posteriormente, o receptor do FSH sinaliza nas células da granulosa para que um folículo antral cresça e se diferencie ao longo do período pré-ovulatório (Aittomeaki et al., 1996 & Beau et al., 1998). Isto acontece em todos os mamíferos. A principal hipótese para os determinantes primários da ovulação é que eles sejam de origem genética (Moore et al., 2004).

A foliculogênese é uma sequência ordenada de maturação e diferenciação que inclui células somáticas e germinativas alcançando, posteriormente, a produção de um oócito competente para ser fertilizado (Glister et al., 2003).

1.2. Proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs)

As BMPs são citocinas capazes de regular distintos processos como a proliferação e diferenciação celular, a deposição de matriz extracelular e apoptose (Massagué et al., 1998). São fatores sintetizados e secretados como pré-propeptídeos e são proteoliticamente clivados para formar dímeros ativados e ligados por pontes dissulfeto (Vitt et al., 2002).

As BMPs formam um sistema parácrino funcional no ovário, com a expressão dos receptores de BMPs e ligantes como o BMP4, 6, 7, 15 e GDF9 (Elvin et al., 2000). Em particular, as células-alvo e funções biológicas do GDF9 e BMP15 têm sido descritas (Knight ET AL., 2003).

Dentre as funções mais bem documentadas destes fatores na regulação da foliculogênese e fertilidade podem ser citados: **1) Folículo primordial:** participação nos mecanismos associados à ativação folicular (Choi and Rajkovic 2006). **2) Folículo antral:** crescimento e diferenciação (estimula a atividade mitótica e esteroidogênese nas células foliculares); esteroidogênese (estimula a secreção de Estradiol nas células da granulosa; inibição prematura da luteinização na granulosa e na teca (inibe a secreção de Progesterona);

regulação de vários produtos gênicos nas células da granulosa como activina B β , folistatina, ciclooxigenase 2 e Kit ligante (Latham ET AL., 2004) **3) Folículo pré-ovulatório:** em associação, o GDF9 e BMP15 mantêm a integridade estrutural do folículo durante a maturação terminal, induzindo a HAS2 (ácido hialurônico sintetase 2), pentraxina 3 e inibindo o ativador do plasminogênio uroquinase; o GDF9 estimula a síntese de prostaglandina e progesterona; suprime a luteinização precoce das células do cumulus inibindo a síntese de RNAm do LHR e a expansão do cumulus (Otsuka ET AL., 2000). **4) Folículo Peri-ovulatório:** o GDF9 estimula a expansão do cumulus (figura 1), por meio da indução da HAS2, COX2 e proteína reguladora da esteroidogênese aguda (*StAR*) (Chand *et al.*, 2006).

Como os outros ligantes da família do TGF- β as BMPs atuam nos receptores serina/treonina quinase (Massagué & Chen, 2000) e a transdução dos sinais requer a formação de um complexo hetero-oligomérico com receptores de BMPs (BMPRs) do tipo 2 e do tipo 1A ou 1B (AKLs) (Massagué & Chen, 2000, Miyazono et al., 2001). O BMPR2, expresso nas CGs murais e do cumulus, possui atividade de autofosforilação e é responsável pela ativação do receptor do tipo 1, uma vez que o complexo tenha sido formado. Após a ativação do receptor, uma cascata de sinalização é iniciada e envolve a fosforilação, heterodimerização e migração das proteínas Smad para o núcleo (Miyazono et al., 2001) e os complexos Smad ativados translocados ao núcleo, juntamente com outros co-fatores nucleares, regulam a transcrição dos genes alvo (Mazerbourg et al., 2006). A interação fatores de transcrição-Smad determina a resposta precisa ao ligante em diferentes tipos de células e em cooperação com outras vias de sinalização (Shi et al., 2003). O GDF9 interage com os receptores BMPR2 e ALK5 e ativa a via Smad 2/3, enquanto o BMP15 ativa a via Smad 1/5/8 através da interação com os receptores BMPR2 e ALK6, como observado nas células da granulosa de ratas (Moore et al., 2003).

O PAPEL DO GDF9 NA EXPANSÃO DO CUMULUS OOPHORUS

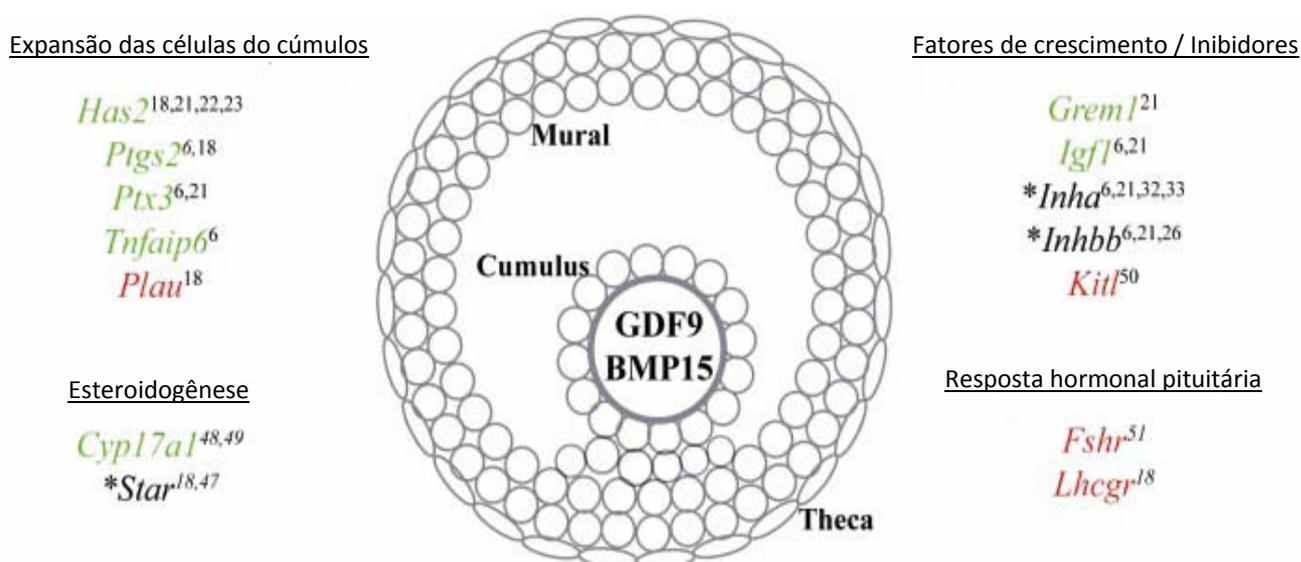


Figura 1: Possível demonstração dos alvos do GDF9 e BMP15. O GDF9 e o BMP15 são fatores secretados pelo oócito e agem em células alvo que devem incluir as células do cumulus e as células da granulosa mural. Os genes coloridos em verde foram demonstrados por serem regulados pelo GDF9 recombinante *in vitro*. Os genes coloridos em vermelho sofrem ação negativa. Nem todos os genes listados aqui foram verificados como alvos do GDF9. O receptor de FSH (Fshr) tem sido demonstrado por ser inibido apenas pelo BMP15. O asterisco indica um gene com regulação variável por diferentes preparações de GDF9 recombinante. Cyp17a1: citocromo P450, família 17, subfamília a, polipetídeo 1; Kitl: kit ligante; Star: proteína reguladora da esteroidogênese aguda (Pangas *et al.*, 2005).

1.3. Importância dos fatores secretados pelo oócito na foliculogênese: estudos em modelo experimental ovino e murino

Mutações pontuais na seqüência gênica que codifica para o BMP15 em diferentes raças de ovinos ocasionam distúrbios do desenvolvimento folicular a partir do estágio de folículo primário e infertilidade em ovelhas homozigotas, ao passo que ovelhas heterozigotas exibem maiores taxas de ovulação, o que sugere um papel importante para o BMP15 na foliculogênese e ovulação (18). Estudos recentes identificaram mutações nos genes BMP15 e GDF9 (Galloway *et al.*, 2000, Hanrahan *in press*). Especificamente, a mutação no BMP15 tem sido identificada em diferentes espécies de ovelhas (Inverdale, Belclare; Hanna e Cambridge).

Para cada espécie existe uma mutação diferente. Nas ovelhas da espécie Inverdale (FecX^I), há uma substituição V31D na região madura da proteína do BMP15; na espécie Belclare (FecX^B), há uma substituição S99I na região madura do BMP15; na espécie Hanna (FecX^H) a mutação causa uma parada prematura do codon, na posição do 23º aminoácido do BMP15; e na espécie Cambridge (FecX^G) uma parada prematura do codon ocorre no resíduo 239 da proproteína. De modo interessante, ovelhas adultas heterozigotas que carregam qualquer uma destas mutações do BMP15 têm um aumento na fertilidade derivada do aumento do número de ovulações, enquanto que as ovelhas adultas homozigotas são inférteis devido a um bloqueio na foliculogênese e na progressão do folículo após o estágio primário (Figura 2) (Moore et al., 2004).

A mutação no gene GDF9 (FecX^H) que resulta na substituição S77F na região madura da proteína do GDF9 também tem sido identificada em algumas ovelhas adultas das espécies Belclare e Cambridge (Hanrahan *in press*). Uma descrição detalhada do fenótipo ovariano desta mutação em ovelhas não foi publicada; entretanto, os fenótipos parecem semelhantes aos da mutação do BMP15, em ovelhas heterozigotas e homozigotas com superovulação e infertilidade, respectivamente (Hanrahan *in press*).

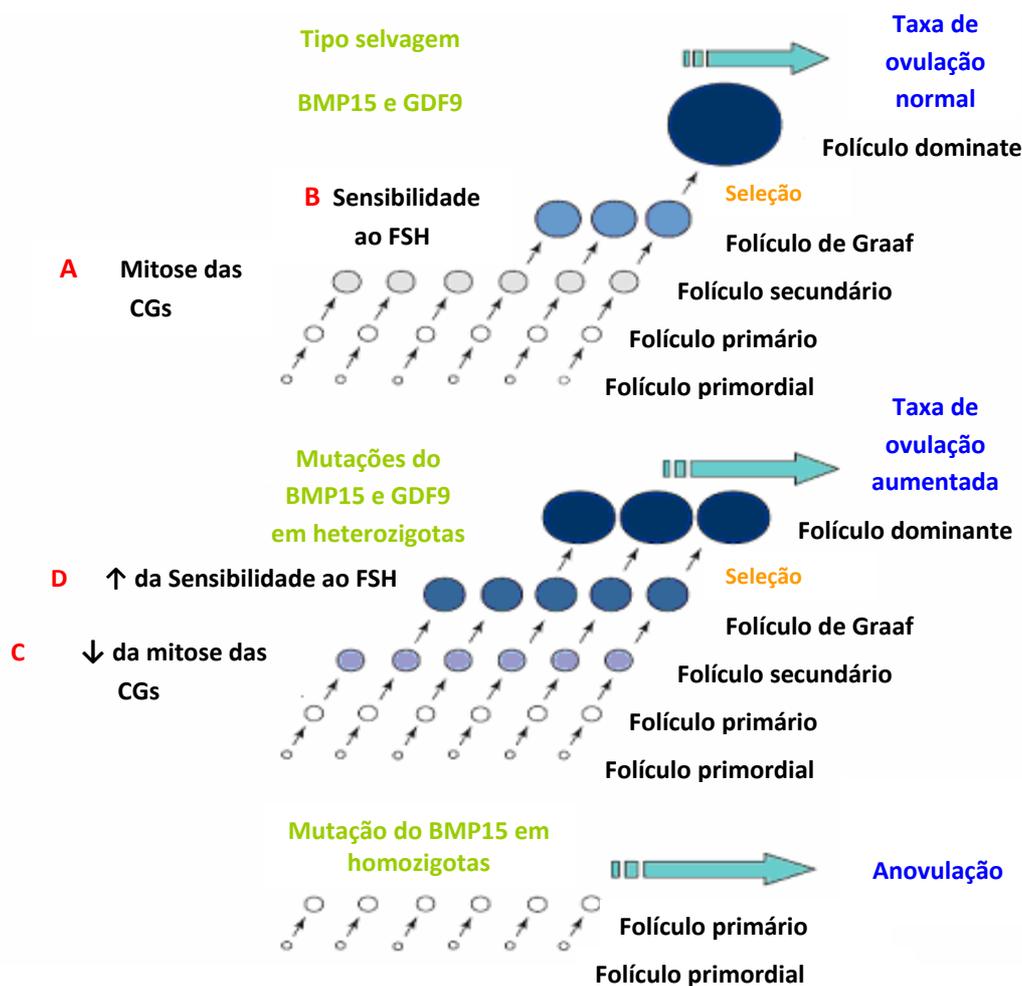


Figura 2: Representação esquemática da progressão da foliculogênese em ovelhas que são normais (topo), heterozigotas com mutação no GDF9 e BMP15 (no meio), e homozigota com mutação no BMP15 (abaixo). As bolas azuis representam os folículos respondedores a FSH, onde os azuis mais escuros mostram uma maior sensibilidade que os mais claros. A-D representam as atividades biológicas do BMP15 ou GDF9 que correspondem ao desenvolvimento normal e anormal do folículo. (A) Em ovelhas normais, a mitose induzida pelo BMP15 e GDF9 é necessária para que o folículo passe do estágio primário. (B) O BMP15 e o GDF9 agem para administrar a sensibilidade ao FSH nos folículos secundários e antrais, prevenindo a citodiferenciação precoce rendendo assim números normais de folículos pré-ovulatórios. (C) Nas ovelhas heterozigotas, os níveis reduzidos de BMP15 e GDF9 são suficientes para a mitose das células da granulosa, estimulando os folículos a progredirem além do estágio primário. (D) Os níveis reduzidos de BMP15 e GDF9 em heterozigotas, entretanto, diminui a citodiferenciação induzida pelo FSH, que leva ao aumento do número de folículos de Graaf que sofrem maturação precoce e ovulam mesmo pequenos. Em ovelhas homozigotas com mutação no BMP15, a ausência de mitose das células da granulosa induzidas pelo BMP15 impede o desenvolvimento folicular após o estágio primário. Abreviações: BMP15: proteína óssea morfogenética-15; GC: células da granulosa; GDF9: fator de crescimento e diferenciação-9; FSH: homônio foliculo estimulante (Moore et al., 2004).

Comparativamente às ovelhas, estudos genéticos usando ratas poliovulatórias como modelo revelam ambas similaridades básicas e importantes diferenças nos fenótipos de animais com mutações nos genes BMP15 e GDF9 (Yan et al., 2001, Dong et al., 1996). De maneira similar às ovelhas, as ratas homozigotas portadoras de deleção no gene GDF9 são inférteis com um fenótipo ovariano que se assemelha às ovelhas homozigotas portadoras de mutação no gene BMP15 (o crescimento e desenvolvimento folicular é interrompido à fase primária/secundária de transição) (Carabatsos et al., 1998). Diferente das ovelhas, as ratas heterozigotas com deleções no gene GDF9 não exibem um fenotipo aberrante. Em contraste com as ovelhas homozigotas com mutações no BMP15 e ratas sem GDF9, ratas homozigotas sem BMP15 tiveram apenas a fertilidade diminuída. Esta subfertilidade não é causada pela parada do desenvolvimento do folículo, mas por defeitos na ovulação e desenvolvimento embrionário precoce (Yan et al., 2001). Por conseguinte, existem diferenças notáveis nos fenótipos reprodutivos de ratas sem BMP15 e ovelhas portadoras de mutação no BMP15 (tabela 1).

Tabela 1: Descrição dos fenótipos de ovelhas e ratas com mutações ou deleções nos genes BMP15 e GDF9.

BMP15		
Genótipo	Ovelha (mutação FecXI, FecXH, FecXB, FecXC)	Rata (com deleção no segundo exon do gene <i>BMP15</i>)
Heterozigoto	Desenvolvimento folicular precoce levando ao aumento da taxa de ovulação	Não foram observados defeitos fenotípicos
Homozigoto	Infertilidade com parada da foliculogênese no estágio primário	Diminuição da fertilidade causando defeito nas taxas de ovulação e desenvolvimento embrionário
GDF9		
Genótipo	Ovelha (deleção no segundo exon do gene <i>BMP15</i>)	Rata (com deleção no segundo exon do gene <i>GDF9</i>)
Heterozigoto	Desenvolvimento folicular precoce levando ao aumento da taxa de ovulação e coorte folicular	Não foram observados defeitos fenotípicos
Homozigoto	Infertilidade: fenótipo ovariano indisponível	Infertilidade: parada da foliculogênese no estágio primário

(Moore et al., 2004)

Como descrito na Figura 2, a fertilidade de uma ovelha adulta heterozigota com mutação nos genes BMP15 e GDF9 aumenta devido ao aumento no número de folículos dominantes e oócitos ovulados (Galloway et al., 2000; Hanrahan in press; Juengel et al., 2000). Análises dos ovários das ovelhas adultas revelaram que o corpo lúteo é relativamente menor do que em ovelhas selvagens também adultas. A explicação para isso é que o aumento no número de ovulações é causado pelo desenvolvimento precoce de um pool de folículos dominantes que conferem a habilidade de ovular mesmo sendo de pequeno tamanho. Não há diferenças consideráveis nos níveis de FSH circulantes entre as ovelhas selvagens e ovelhas heterozigotas adultas. Por esta razão, uma hipótese é que o pool de desenvolvimento folicular adquire uma supersensibilidade para a estimulação de FSH.

1.4. Desenvolvimento folicular e esteroidogênese na síndrome dos ovários policísticos

A SOP é uma das mais comuns causas de anovulação, infertilidade e irregularidade menstrual em mulheres, afetando entre 5 a 10% das mulheres em idade reprodutiva. Tem sido definida como uma síndrome que envolve ovários policísticos, hiperandrogenismo, e anovulação crônica com exclusão de doenças específicas nos ovários, adrenais e hipófise (Dunalf et al., 1992).

Os ovários na SOP contêm o dobro do número normal de folículos em crescimento. Esse achado é particularmente significativo porque sugere que todos os passos no processo de foliculogênese podem ser aberrantes nesta síndrome. Outra evidência é que os folículos na SOP param seu crescimento e desenvolvimento quando atingem um diâmetro de 4 a 7 mm. A parada da foliculogênese nesse estágio resulta no acúmulo de grande número de pequenos folículos na túnica albugínea. As células intersticiais da teca associadas ao desenvolvimento dos folículos exibem altos níveis de biossíntese de androgênios e também suportam o papel

dos ovários na fisiopatologia da SOP (Ehrmann et al., 1999). De acordo com Gougeon et al., 1996, o desenvolvimento folicular é interrompido no estágio de seleção do folículo dominante, quando a atividade da aromatase e a produção de estradiol nas CG normalmente aumenta. A quantidade de estrógeno produzido pelo folículo, medida pela proporção entre estrógeno:andrógeno, indica a vitalidade do folículo e o sucesso da ovulação (Hillier et al., 1980). Em pacientes SOP, as concentrações dos andrógenos são altas e de estrógenos no FF são baixas, quando comparadas a mulheres normais (Eden et al., 1990).

Excesso na biossíntese de andrógenos é um parâmetro no diagnóstico da SOP. O excesso de androstenediona e testosterona circulante é produzido principalmente pelo ovário. A população de células da teca, o local da biossíntese *de novo* de andrógenos, apresenta-se em maior concentração nos ovários policísticos, e têm maior capacidade esteroidogênica. O aumento da capacidade esteroidogênica é induzido pela superexpressão das enzimas da esteroidogênese devido ao aumento da transcrição e da estabilidade do RNAm. Os principais fatores da hiperestimulação da produção de andrógenos tecais provavelmente são o aumento das concentrações do LH em algumas mulheres e da elevação das concentrações de insulina secundária à resistência insulínica. As contribuições adicionais podem ser feitas por outros fatores intraovarianos que podem aumentar os efeitos estimulatórios do LH na biossíntese de andrógenos na teca.

As células da granulosa de folículos em que sofreram parada do seu desenvolvimento presentes nos ovários policísticos são refratárias ao aumento da expressão de aromatase, resultando na redução acentuada da secreção de estrogênio. As CGs também expressam maiores concentrações das enzimas 5α -redutase, levando à produção de 5α -androstano-3,17-dione, um inibidor competitivo da atividade da aromatase. As células da granulosa expressam prematuramente a enzima P450_{scc} e receptores de LH, portanto, elas são mais responsivas ao LH e secretam maior quantidade de progesterona, em comparação com as células da

granulosa de folículos em estágio similar de desenvolvimento, nas mulheres com ciclos ovulatórios. Assim, ovários policísticos produzem um aumento de andrógenos e progesterona, diminuição das concentrações de estrógenos, e concentrações anormalmente elevadas de andrógenos 5α reduzidos, em comparação com ovários normais.

Os mecanismos celulares e moleculares responsáveis pela produção excessiva de andrógenos em pacientes com SOP ainda não são bem compreendidos. O exame da biossíntese de esteróides por células da teca interna isoladas de ovários de mulheres normais e de ovários de mulheres com SOP foi recentemente avaliado, contribuindo para avanços na compreensão das anomalias esteroideogênicas que resultam em aumento da síntese de andrógenos na SOP. Nos últimos anos, a combinação dos dados provenientes de estudos utilizando células da teca recém-isoladas demonstraram que tanto a biossíntese de andrógenos quanto de progesterona está aumentada em células da teca obtidas de ovários de mulheres com SOP. Este aumento na biossíntese de esteróides resulta da expressão seletivamente aumentada dos genes da P450_{scc} (CYP11A), 3β -hidroxisteróide desidrogenase tipo II (HSD3B2) e 17α -hidroxilase (CYP17) (Wickenheisser et al., 2002).

Devido a foliculogênese alterada e formação de cisto nesta síndrome, a expressão de GDF9 e BMP15 tem sido avaliada em mulheres com SOP e mulheres com ovários policísticos durante o desenvolvimento folicular. Os níveis de RNAm de GDF9, mas não de BMP15 mostraram-se reduzidos em cortes de ovários neste grupo de mulheres, sem HOC, durante a fase de diferenciação e crescimento (Filho et al., 2002). Contudo, a literatura é extremamente escassa sobre a função dessas proteínas oocitárias na foliculogênese humana e sobre a influência da associação da SOP e HOC (pacientes que sofreram intervenção da para fins de reprodução assistida), no perfil de expressão das BMPs ovarianas, particularmente as BMPs secretadas pelo oócito como o GDF9 e BMP15.

Os estudos em animais de laboratório mostram um papel chave do BMP15 e GDF9 na foliculogênese de fêmeas férteis. Os estudos de hibridização *in situ* em uma variedade de mamíferos demonstraram que esses genes são expressos seletivamente no desenvolvimento oocitário durante a foliculogênese. O achado de RNAm do GDF9 e BMP15 presentes em oócitos humanos normais prediz que esses fatores de crescimento podem ter função fundamental na foliculogênese e fertilidade nas mulheres (Filho et al., 2002).

1.5. Síndrome dos ovários policísticos e os resultados da FIV

Frequentemente, o sucesso da FIV está comprometido em mulheres com SOP por apresentarem recrutamento de maior número de folículos com diâmetros reduzidos, taxa reduzida de fertilização e elevada taxa de síndrome do hiperestímulo ovariano. Na SOP, as mulheres apresentam resposta excessiva à estimulação ovariana devido ao fato dos ovários policísticos apresentarem vários folículos parcialmente desenvolvidos que estariam prontos para a estimulação, propiciando típica resposta multifolicular. Os folículos ovarianos seriam altamente sensíveis ao FSH, o que favorece aumento dos receptores devido a alta concentração local de estrógenos e, como resultado, haveria desenvolvimento de múltiplos folículos associado com alta concentração de estrógenos circulantes (Reis et al., 2004). Outras particularidades do resultado da FIV em pacientes com SOP são oócitos de baixa qualidade, pouca maturidade e conseqüentemente, com maior dificuldade de fertilização oocitária (MacDougall et al., 1993).

Nas técnicas de reprodução assistida, a qualidade dos oócitos obtidos com a hiperestimulação ovariana controlada, independente da etiologia da fertilidade, varia consideravelmente. Análises da maturação oocitária descreveram alguns genes envolvidos neste processo e o ponto específico da regulação necessária para a ovulação e fertilização.

Alguns estudos demonstraram que mudanças na expressão de genes como o GDF9 e o BMP15 nos oócitos, ou pentraxina 3 nas células do cumulus, podem ser monitoradas para uma seleção apropriada do oócito a ser fertilizado (Zhang et al., 2005).

O conhecimento de processos moleculares envolvidos no desenvolvimento e competência do oócito, obtido com a hiperestimulação ovariana controlada (HOC), pode demonstrar novas opções de protocolos de indução da ovulação, contribuindo para um aperfeiçoamento da qualidade, cultura e manipulação do oócito (Assou et al., 2006).

Por esta razão, estudos em oócitos e células do cumulus podem contribuir não apenas para o esclarecimento dos mecanismos da maturação oocitária mas também determinar importantes marcadores moleculares da expressão anormal em oócitos com competência diminuída.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Avaliar a expressão dos genes GDF9 e BMP15 em oócitos individuais e dos receptores BMPR2 nas células do cumulus de mulheres com SOP submetidas à fertilização *in vitro*.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a expressão gênica dos genes GDF9 e BMP15 em oócitos e receptores BMPR2 em células do cumulus em mulheres com SOP e com ciclos ovulatórios submetidas à fertilização *in vitro*.
- Analisar a relação dos níveis de testosterona, androstenediona, estradiol e progesterona no fluido folicular dos folículos pequenos e grandes de mulheres com SOP e mulheres com ciclos ovulatórios submetidas à fertilização *in vitro*.
- Analisar a correlação dos níveis dos esteróides sexuais no fluido folicular pequenos (imaturos) e grandes (maduros) com a expressão gênica do GDF9 e BMP15 nos oócitos e do BMPR2 nas células do cumulus de mulheres com SOP e mulheres com ciclos ovulatórios submetidas à fertilização *in vitro*.
- Avaliar se a expressão dos genes em estudo está associada às taxas de gravidez das mulheres com SOP e mulheres com ciclos ovulatórios submetidas à fertilização *in vitro*.

3. HIPÓTESES

H0 – Não há diferença da expressão dos genes GDF9 e BMP15 e receptores entre pacientes com SOP e grupo controle.

H1 – Há diferença da expressão dos genes GDF9 e BMP15 e receptores entre pacientes com SOP e grupo controle.

4. CASUÍSTICA E METODOLOGIA

4.1. Desenho do estudo

Foi realizado um estudo prospectivo tipo caso-controle incluindo pacientes atendidas no Ambulatório de Infertilidade Conjugal do Setor de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP).

4.1.1. Critérios de Inclusão

A participação dos casos e controle ocorreu de forma voluntária e documentada pela assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. A idade das pacientes foi de 20 a 38 anos.

Foram incluídas no estudo pacientes com Índice de massa corpóreo (IMC) até 35. O IMC foi realizado de acordo com os critérios adotado pelo WHO (*World Health Organization, June 1997*), através da fórmula de Quetelet.

A infertilidade foi definida como inabilidade de conceber após um ano de relação sexual sem proteção. Todas as pacientes foram submetidas a tratamento com técnicas de Reprodução Assistida de alta complexidade: fertilização *in vitro* ou microinjeção de espermatozóides (ICSI).

4.1.2. Grupo de Estudo

Foram incluídas 18 pacientes com diagnóstico de SOP, com história de infertilidade conjugal e que necessitaram de tratamento com técnicas de reprodução assistida.

O diagnóstico de SOP foi feito de acordo com os critérios de *Rotterdam ESHRE-ASRM-sponsored PCOS consensus workshop (Rotterdam, 2004)* pela presença de pelo menos dois dos três seguintes critérios: (a) oligomenorréia (intervalo intermenstrual de 45 dias ou menos que 8 meses por ano) ou amenorréia (intervalo maior que 3 meses); (b) sinais clínicos de hiperandrogenismo (escore de Ferriman-Gallwey (Ferriman *et al.*, 1961) ≥ 8) ou bioquímicos; e (c) achados ultra-sonográficos de ovários policísticos (presença de mais de 12 folículos em cada ovário medindo 2-9 mm de diâmetro, e/ou aumento de volume ovariano >10 mL).

4.1.3. Grupo Controle

Foram incluídas 35 pacientes como controles pareadas por idade e paridade, com infertilidade conjugal por fator masculino, com espermatozóides recuperados após capacitação com concentração superior a 1×10^6 /ml e que não apresentaram qualquer distúrbio menstrual.

4.1.4. Critérios de Exclusão

Foram excluídas do estudo, pacientes com presença de doenças como hiperplasia adrenal congênita, hiperprolactinemia, doenças tireoideanas, assim como pacientes com qualquer outra causa de infertilidade.

Outros critérios de exclusão foram o uso de medicamentos que sabidamente afetavam a função reprodutiva ou metabólica, como tratamento com glicocorticóides ou antiandrogênios por um período mínimo de 60 dias.

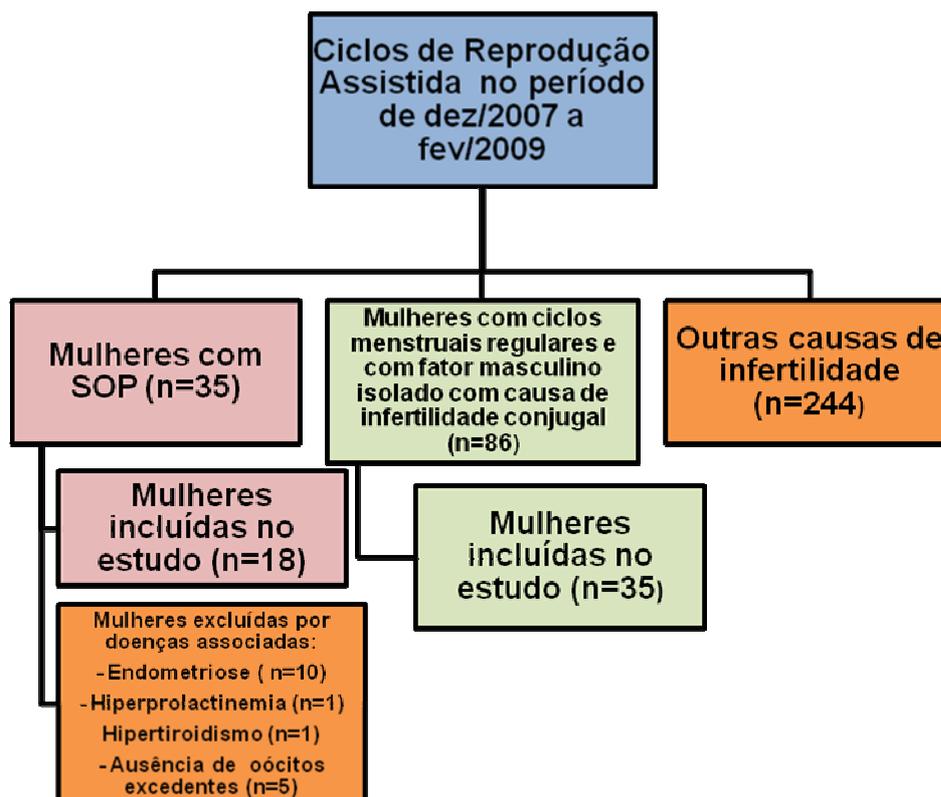


Figura 3: Organograma de inclusão e seguimento do estudo.

4.1.5. Cálculo amostral

Em estudo anterior (Teixeira Filho et al., 2002), foi demonstrado por hibridização *in situ* em cortes histológicos de ovários normais e de ovários de portadoras de SOP que os folículos secundários desta síndrome expressam mais GDF9 que os folículos das pacientes controles, ao passo que há diferença na expressão do BMP15.

Assim, o cálculo amostral foi realizado em termos de alteração de expressão de GDF9 em folículos secundários de pacientes com SOP. Para uma alteração de 40% na expressão do GDF9 em folículos secundários destas pacientes ovulatórias em relação às pacientes ovulatórias do grupo controle, foram necessárias 18 pacientes em cada grupo para um $\alpha = 5\%$ e poder de teste de 80%.

4.1.6. Seleção da Amostra

No início do estudo foi realizada uma avaliação das candidatas por uma anamnese completa, incluindo a anamnese alimentar, exame físico detalhado, cálculo do índice de massa corporal, dosagens plasmáticas de Testosterona, SDHEA, 17 OHP, insulina, glicose, lipidograma e exame pélvico ultrassonográfico.

A distribuição da casuística foi homogênea entre os grupo com SOP e grupo controle.

O teste utilizado para esta análise estatística foi o teste t não pareado (Tabela 2 e 3).

Tabela 2 – Distribuição da casuística das mulheres com SOP quanto à idade, peso, índice de massa corporal (IMC), hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio tireotrófico estimulante (TSH) e prolactina.

Mulheres SOP	Idade (anos)	Peso (Kg)	IMC (Kg/m ²)	FSH (mUI/mL)	TSH (μU/mL)	Prolactina (ng/mL)
1	36	78,6	28,3	2,2	1,93	16,5
2	33	50,7	20,5	4,79	2,3	5,29
3	27	61,5	25,9	2,1	2,7	11
4	32	67,5	24,2	0	0	0
5	33	83,4	27,86	3,9	2,9	7,8
6	33	60	1,65	22,03	2	26,1
7	30	81,3	32,1	5,9	1,8	8,2
8	30	66,3	24,6	5,8	1,51	5,1
9	30	55,4	19,86	6,9	2,2	12,6
10	37	71,3	27,1	4,24	4,26	14,24
11	35	59,6	26	4,4	1,4	14,4
12	29	76,6	26,8	1,9	1,6	59
13	38	67	26,8	5,9	1,03	24,9
Mediana	33	67	26	4,59	1,90	13,42
Média	32,54	67,63	23,7	5,39	2,13	17,09
DP	3,31	10,20	7,42	5,37	0,85	14,83

Tabela 3 – Distribuição da casuística das mulheres do grupo controle quanto à idade, peso, índice de massa corporal (IMC), hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio tireotrófico estimulante (TSH) e prolactina.

Mulheres controles	Idade (anos)	Peso (Kg)	IMC (Kg/m ²)	FSH (mUI/mL)	TSH (μU/mL)	Prolactina (ng/mL)
1	24	53	22,06	3,3	40	13,2
2	27	60,4	21,66	5,5	2	9,1
3	36	77,5	28,47	3,1	1,4	5,6
4	29	59,9	21,74	5,99	2,15	14,2
5	34	67	26,5	2,84	1,9	12,5
6	36	60	24,03	5,7	5,11	43,4
7	25	84,3	31,34	3	4,05	17,2
8	36	79	31,65	2,25	4,8	18,5
9	32	60,5	22,77	4	2,29	18,3
10	28	84	31,62	6,9	1,5	23
11	40	67	26,84	6,6	2,4	10,5
12	29	54	21,63	3,7	1,03	10,2
13	34	71,1	30,37	7,1	2,09	8,7
14	36	66,3	24,65	3,6	1,6	5,7
15	32	68	26,56	6,1	1,59	11,4
16	36	80,5	27,21	7,19	2,48	11,5
17	29	77	30,84	7,4	3,2	6,3
18	25	63,2	25,64	9,2	1,9	7,4
19	29	58,6	19,13	3,2	1,9	10,7
20	37	62,3	22,61	7,9	1,5	15
21	31	94,8	35,25	2,4	1,7	6,2
22	33	63,1	27,31	6	1,8	9,1
23	39	60	10,4	10,8	4,7	1,62
24	33	49,7	20,96	6,6	5,8	24
25	29	54,5	20,26	10,3	1	15
26	33	59,5	22,39	6,7	1,76	10,8
27	29	56,6	21,84	6,07	0,54	14,6
28	37	75	28,58	5,5	2,35	14,7
29	36	54,5	21,03	6,3	1,6	23,1
30	36	55,1	22,07	6	1,4	5,9
31	31	54	22,19	4,5	2,21	17,5
Mediana	33	62,3	24,03	6	1,97	11,5
Média	32,30	65,5	24,83	5,67	3,54	13,38
DP	4,25	11,13	4,92	2,21	6,88	7,84

4.2. PROCEDIMENTOS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA

4.2.1. Programação da Menstruação

As pacientes receberam anticoncepcional oral de baixa dosagem (Etinilestradiol 20 + Gestodene 75) ou progestogênio (acetato de medroxiprogesterona 10 mg/dia) no ciclo anterior para HCFMRP-USP.

4.2.2. Bloqueio hipofisário

O bloqueio hipofisário foi feito com análogo do Hormônio Liberador das Gonadotrofinas (*GnRHa*) (Acetato de Nafarelina – *Synarel*[®] - *Pfizer*) por via nasal, com uma borifada a cada 12h iniciado na metade da fase lútea do ciclo anterior e mantida até o dia da administração da Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG).

4.2.3. Dia do início da indução

No dia programado para o início da indução da ovulação, a paciente foi submetida a exame de ultra-sonografia (*ATL – Advanced Technology Laboratory – Modelo HDI 3500*) com transdutor trans-vaginal de 5 a 9 mHz, com a finalidade de avaliar os ovários para afastar a presença de cistos ovarianos que pudessem interferir com a monitoração da indução da ovulação, o volume ovariano e número de folículos antrais e também para observar o útero: topografia, padrão endometrial/miometrial e espessura do endométrio. Serão coletadas amostras sanguíneas para posterior dosagem de estradiol para verificar a supressão hipofisária.

4.2.4. Indução da ovulação

A indução da ovulação foi iniciada imediatamente após a verificação dos critérios citados acima, de acordo com o protocolo de indução de ovulação estabelecido pelo Serviço de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. Foi administrado FSH recombinante (Gonal[®] 75 UI – Laboratório SERONO ou Puregon[®] - 50 UI – Laboratório *ORGANON*) na dose de 100 a 200 mg/dia por via subcutânea (sc) sempre às 18 horas nos primeiros 5 dias de indução, sendo que esta dose pode ter variado devido a fatores próprios de cada paciente. A partir do sexto dia, a dose de FSH foi ajustada de acordo com o crescimento folicular observado por meio de ultrassonografia trans-vaginal e com os níveis de estradiol, sendo essa monitoração feita diariamente ou mesmo em dias alternados. Na presença de pelo menos 2 folículos com diâmetro superior a 17 milímetros (mm), foi administrado hCG recombinante (Ovidrel[®]) na dose de 250µg sc 22 horas. Após um intervalo de 34 a 36 horas, foi realizada a captação dos oócitos (CO).

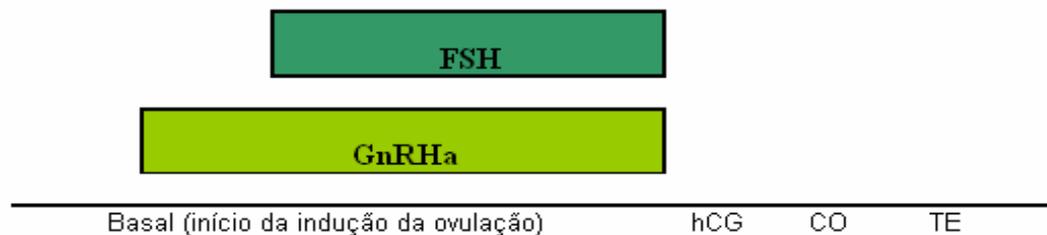


Figura 4: Representação esquemática da indução de ovulação com associação. GnRHα/FSH/hCG. CO = captação dos oócitos, TE = transferência de embriões.

4.2.5. Captação dos oócitos

A captação dos oócitos (aspiração folicular) foi feita mediante prévia anestesia geral endovenosa com Propofol (Diprivam – Zeneca) na dose de 10 mg/mL sendo a ampola de 20 ml, diluída em 250 ml de solução salina a 0,9%, via endovenosa.

Os folículos foram puncionados com agulha própria para aspiração de oócitos (CCD, França), de lúmen simples com diâmetro externo de 19 G com duplo bisel cortante, tendo um comprimento de 30 cm, guiada por transdutor vaginal. A aspiração dos folículos foi obtida por uma pressão aspirativa artificial constante de 100 milímetros de mercúrio (mmHg), por meio de uma bomba da aspiração de folículos, com controle eletrônico (*Labotect GmbH*, modelo 3014), onde o líquido aspirado foi coletado em tubos de ensaio estéreis de polipropileno (tubos *Falcon* - Costar) previamente aquecidos e mantidos a temperatura de 37° C. Os tubos foram identificados e encaminhados para o laboratório, aos cuidados de uma bióloga, para se identificar a presença de oócitos, assim como classificar a sua maturidade. Todos os folículos com diâmetro superior a 14 mm foram puncionados e aspirados.

4.3. PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS DA GRANULOSA E DO FLUIDO FOLICULAR

Os oócitos foram colocados em placas de petri (*Nunc* 150288) previamente aquecidas em uma superfície a 37° C, para evitar mudanças de temperatura. O meio utilizado foi HTF-M. As células da granulosa foram obtidas com a realização de cortes dos cumulus de cada oócito, a partir da técnica de microdissecção, utilizando agulhas de 25 G acopladas a seringas de insulina de 1 mL. Foram realizados vários cortes longitudinais, paralelos à superfície de trabalho, em movimentos suaves, evitando tocar a placa para com isso não liberar partículas plásticas que poderiam ser tóxicas ao oócito. Uma seringa foi utilizada para fixar o cumulus oocitário, e com o bisel da outra seringa se cortou as células. As células da granulosa obtidas a partir do cumulus de oócitos individuais foram lavadas com meio HTF-M em uma placa limpa. Após a lavagem, as células da granulosa de cada oócito foram depositadas em criotubos com a menor quantidade possível de meio e, imediatamente, imergidas em nitrogênio líquido para congelação. Foram armazenadas a -80° C até o momento da extração.

O FF resultante dos oócitos individuais de onde foram retiradas as células da granulosa foram depositados em tubos Falcon com um volume máximo de 6 mL. Os tubos foram imediatamente centrifugados a 2500 rpm por 10 minutos, em centrífuga refrigerada a 4° C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi pipetado e armazenado em três tubos *Gobolet*. Os FFs foram armazenados a -80° C até o momento da avaliação hormonal.

4.4. IDENTIFICAÇÃO DOS OÓCITOS

Os oócitos maduros foram coletados 4 horas após a aspiração folicular e colocados individualmente em criotubos, imediatamente submergidos em nitrogênio líquido para congelação e armazenados a -80° C até a extração do RNA.

4.5. EXPRESSÃO GÊNICA

Os oócitos foram processados para a avaliação da expressão dos genes GDF9 e BMP15 e as células da granulosa para a expressão do gene BMPR2, utilizando como gene endógeno a β -actina (ACTB) de acordo com as técnicas descritas a seguir.

4.5.1. Extração e amplificação do RNA

O RNA total foi extraído de oócitos individuais. Foram utilizados kits apropriados para extração de pequenas amostras (*RNeasy Micro Kit, Qiagen*), seguindo-se as recomendações do fabricante. Foi necessária adaptação da técnica como descrito no anexo II.

4.5.2. Preparo dos reagentes do *RNEASY Micro Kit (Qiagen)*

Ao utilizar o kit pela primeira vez, foi necessário preparar o etanol 80%, misturando 24ml de etanol (96-100%) e 6 ml de água *RNAse-free* (presente no kit). Adicionou-se 10 μ l β -

Mercaptoetanol (β -ME) a 1 ml do tampão RLT em tubo *ependorf* de 1,5 mL. Adicionou-se 4 volumes de etanol (96-100%) como indicado no frasco do tampão RPE. Preparou-se uma solução estoque de DNase 1 utilizando DNase livre de RNase pela primeira vez. Dissolveu-se a DNase 1 sólida em água *RNase-free* (550 μ l) e misturou-se gentilmente invertendo o tubo. Adicionou-se 5 μ l de *poly-A* dissolvido em 34 μ l de RLT (tubo 0,2ml) misturando por pipetagem. Utilizou-se 6 μ l desta mistura para misturar com 54 μ l de RLT (tubo 0,2 mL). A concentração final foi de 4 ng/ μ l. Utilizou 5 μ l por amostra.

4.5.3. Procedimento de extração dos oócitos e células da granulosa individuais

As células foram lisadas pela adição de 75 μ l de RLT (c/ β -ME) para os oócitos e 350 μ l para as células da granulosa no criotubo. Ao processar as células da granulosa, adicionou-se 20 ng de RNA carreador (5 μ l de uma solução de 4 ng/ μ l - *poly-A*) ao lisado antes de homogeneizar, conforme recomendações do fabricante. Vortexou-se as amostras por \pm 1 minuto para homogeneizar. Foi adicionado 1 volume de etanol 70% (75 μ l e 350 μ l, respectivamente) ao lisado homogeneizado, misturando-se bem por pipetagem. As amostras foram transferidas para uma *MinElute SpinColumn* em um tubo de coleta 2 mL, incluindo qualquer precipitado que possa ter se formado.

As amostras foram centrifugadas por 15 segundos a $\geq 8000 \times g$ (≥ 10000 rpm). Descartou-se o conteúdo do tubo de coleta. A *SpinColumn* foi recolocada no tubo de coleta e adicionou-se 75 μ l de RW1 nos oócitos e 350 μ l nas CGs. Centrifugou-se novamente por 15 segundos a $\geq 8000 \times g$ (≥ 10000 rpm) para lavar a coluna e o conteúdo do tubo de coleta foi descartado. Adicionou-se 10 μ l de DNase 1 estoque (*stock*) a 70 μ l de RDD (tubo 0,2 mL) para cada amostra. Misturou-se pipetando gentilmente invertendo o tubo, pois DNase é sensível a desnaturação física. O mix de incubação DNase1 (80 μ l) foi pipetado diretamente

sobre a membrana de sílica-gel *MinElute*, colocando a mesma no tubo de coleta. Incubou-se em temperatura ambiente por 15min.

Após incubação, adicionou-se 75 μ l de RW1 (oócitos) e 350 μ l (CGs) na *SpinColumn*, e centrifugou-se por 15 segundos a $\geq 8000 \times g$ (≥ 10000 rpm) para lavar a coluna. O conteúdo do tubo de coleta foi descartado. Transferiu-se a *SpinColumn* para um novo tubo de coleta (2 mL). Adicionou-se 500 μ l de RPE à coluna. Centrifugou-se por 15 segundos a $\geq 8000 \times g$ (≥ 10000 rpm) para lavagem e descartou-se o conteúdo do tubo de coleta. Adicionou-se 500 μ l de etanol 80% à *SpinColumn* e centrifugou-se por 2 minutos a $\geq 8000 \times g$ (≥ 10000 rpm) para secar a membrana de sílica-gel. Descartou-se o conteúdo e o tubo de coleta. A *SpinColumn* foi transferida para um novo tubo de coleta (2ml). Centrifugou-se as amostras por 5 minutos em velocidade máxima com a tampa da *SpinColumn* aberta para secar a membrana, descartando o conteúdo do tubo de coleta. Para eluição, transferiu-se a *SpinColumn* para um novo tubo de coleta (1,5 mL), pipetou-se 14 μ l de água *RNase-free* diretamente no centro da membrana de sílica-gel e, com a tampa fechada, centrifugou-se por 1 minuto na velocidade máxima para eluição. O volume final foi de 12 μ l.

4.5.4. Síntese do cDNA

A síntese do cDNA foi realizada com a utilização do Kit para Transcrição Reversa da *Applied Biosystems*® (*High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit Applied Biosystems*®). Os procedimentos referentes à síntese do cDNA foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante. Para cada reação de transcrição reversa foram utilizados 2 μ L de RNA das amostras dos oócitos e CGs do grupo SOP e controle. Assim, para cada reação com 2 μ L de RNA, utilizou-se 2,5 μ L de buffer, 1 μ L de dNTP, 2,5 μ L de Random Primers, 1,25 μ L de multiscribe, 0,63 μ L de RNase OUT e 15,12 μ L de água tratada com DEPC. A

quantidade citada de cada reagente foi multiplicada pelo número de amostras de RNA para a confecção de um Mix. Posteriormente, 23 μL desse Mix foram adicionados a cada tubo *epENDORF*. Em seguida foram adicionados 2 μL de RNA de cada amostra nos frascos devidamente identificados. Finalmente os tubos *epENDORF* foram submetidos ao termociclador onde foram realizados os ciclos de PCR a 25°C por 10 minutos e 37°C por 120 minutos. As amostras de cDNA foram armazenadas em um freezer a uma temperatura de -80°C.

4.5.5. Quantificação do cDNA em NanoDrop

Por razões técnicas, a quantificação do RNA dos oócitos e células da granulosa não foi possível, pois a quantidade de RNA foi indetectável nos métodos disponíveis. Então, foi feita a quantificação do cDNA, utilizando 1 μl do eluído obtido na extração para quantificação em aparelho NanoDrop (ND1000 - Espectrofotômetro) no Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental do Hospital das Clínicas da Faculdade de Ribeirão Preto - USP.

4.5.6. Análise da expressão dos genes GDF9 e BMP15 e BMPR2

As reações foram feitas utilizando-se o kit comercial com o sistema *TaqMan*[®] *Gene Expression Assays* (*TaqMan*[®] *MGB probes*, *FAM*[™] *dye-labeled*) de acordo com as recomendações do fabricante. As sondas para os genes foram: BMP15 – Hs00193763_m1, GDF9 – Hs00193364_m1, BMPR2 – Hs00176148_m1 e ACTB – Hs99999903_m1. Controles negativos foram preparados omitindo-se cDNA durante a reação de PCR-RT. As amostras foram então incubadas no termociclador *ABI PRISM*[®] *7000 Sequence Detection System* (*Applied Biosystems*). A quantificação das amostras foi realizada no Laboratório de

Biologia Molecular do Departamento de Pediatria do HCFMRP-USP, utilizando-se a metodologia de PCR-RT.

4.5.7. Cálculo dos resultados

A análise dos resultados do PCR quantitativo foi realizada usando-se o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak, 2001) sendo que os resultados foram expressos relativos a um grupo referência ou calibrador. Neste experimento o grupo referência foi o grupo constituído pelos oócitos e células da granulosa captados de pacientes sadias sem síndrome dos ovários policísticos. O C_T do gene alvo (GDF9, BMP15 e BMPR2) e do gene controle endógeno (ACTB) foram determinados para cada amostra, respectivamente. A diferença entre o C_T do alvo e o C_T endógeno, denominado ΔC_T , foi calculada para cada amostra nos grupos referência (pacientes sadias) e experimental (pacientes com SOP), objetivando-se normalizar as diferenças nas extrações de RNA e eficiência das reações de transcrição reversa. O ΔC_T de cada gene obtido em cada amostra do grupo experimental foi subtraído do ΔC_T obtido no grupo referência, o resultado obtido foi chamado de $\Delta\Delta C_T$ ($\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T \text{ Exp}} - \Delta C_{T \text{ Ref}}$). A quantidade do gene alvo no grupo experimental, já normalizada pelo controle endógeno (ACTB) e pelo grupo referência (ΔC_T do grupo referência), foi calculada usando $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Deste modo, os dados obtidos foram expressos no grupo experimental como X vezes relativas ao grupo referência.

4.6. DOSAGEM DOS ESTERÓIDES SEXUAIS NO FF

Para as dosagens dos esteróides nos FFs, foram utilizados 14 FF pequenos e 34 FF grandes de ambos os grupos estudados.

4.6.1. Dosagens de estradiol e progesterona no FF

As amostras para dosagens de estradiol e progesterona no FF foram realizadas pelo método de quimioluminescência, que combina anticorpos específicos com enzima amplificada, em um aparelho *Immulite – Diagnostic Products Corporation* (DPC) sistema randômico automatizado. Para dosagem no FF foi necessário uma diluição de 1:500 para estradiol e de 1:1000 para dosagem de progesterona. A diluição foi feita utilizando diluente fornecido pelo fabricante dos respectivos kits. A sensibilidade do teste para estradiol foi de 15 pg/mL e o coeficiente de variação (CV) de 3,78%. Para a dosagem de progesterona a sensibilidade foi de 0,1 pg/mL e o CV de 4,30%. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do HCFMRP-USP.

4.6.2. Dosagens de testosterona e de androstenediona no FF

As dosagens de testosterona e androstenediona foram realizadas pelo método de radioimunoensaio (RIE). Para a dosagem de testosterona em FF foi necessário uma diluição de 1:5 dos FF grandes e de 1:10 para os FF pequenos. Para a dosagem de androstenediona foi necessário uma diluição de 1:5 de todas as amostras. Os FF foram diluídos em tampão fosfato gel 0,02M, próprio para diluição de esteróides. A sensibilidade do teste para androstenediona foi menor que 10 ng/dL e o CV de 9,6%. Para a dosagem de testosterona a sensibilidade foi menor que 10 ng/dL e o CV de 1,58%. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Clínica Médica do HCFMRP-USP.

4.6.3. Dosagens de glicose e insulina no plasma

As amostras para dosagem de glicose no plasma foram realizadas pelo método enzimático em um aparelho *Termo Scientific* modelo *Konelab 60i* (*Wiener Lab.*, Rosario – Argentina). A sensibilidade do teste foi de 0,54 mg/dL e o CV de 1,92%. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Bioquímica – Laboratório Central do HCFMRP-USP.

As amostras para dosagens de insulina no plasma foram realizadas pelo método de quimioluminescência, em um aparelho *Immulate – Diagnostic Products Corporation* (DPC) sistema randômico automatizado. A sensibilidade do teste para insulina foi de 2 μ UI/mL e o CV de 7,3%. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do HCFMRP-USP.

4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para verificar a normalidade ou não da distribuição dos valores amostrais, foi utilizado o teste não-paramétrico de *Kolmogorov-Smirnov*, onde todos os parâmetros foram considerados normais. A comparação entre idade, peso, IMC, FSH, TSH, prolactina dosagens foliculares de estradiol, progesterona, testosterona e androstenediona entre os grupos SOP e mulheres controle foi realizado com teste t não pareado, bem como a comparação entre as concentrações dos fluidos foliculares de estradiol, progesterona, testosterona e androstendiona entre os folículos entre 10 e 14 mm e folículos maiores que 18 mm. Para a comparação entre as dosagens foliculares entre os quatro grupos, ou seja, G1 (FF pequeno do grupo controle), G2 (FF pequeno do grupo SOP), G3 (FF grande do grupo controle) e G4 (FF grande do grupo SOP) foi utilizado o *ANOVA*, com pós teste de comparação múltipla *Newman-Keuls*. O nível de significância adotado neste estudo foi de 5%, com o resultado das variáveis expresso em

média e desvio-padrão. Os procedimentos estatísticos foram realizados utilizando os seguintes programas estatísticos: *software GraphPad Prism version 3.00 for Windows*.

Para avaliar a taxa de gravidez entre os grupos SOP e controle utilizou-se o teste exato de *Fisher*. Para avaliar a expressão gênica dos genes estudados, utilizou-se o teste de *Mann Whitney*. Para avaliar se a expressão dos genes BMP15 e GDF9 influenciaram nas taxas de gravidez, utilizou-se o teste de *Mann Whitney*.

Para a análise de correlação utilizou-se o método de *Pearson*, pelo procedimento *Corr* do programa estatístico SAS (*Statistic Analysis System*, 2003). Para verificar se as variáveis durante o ciclo de fertilização *in vitro* influenciaram na expressão dos genes foi utilizado o teste exato de *Fisher*.

5. RESULTADOS

5.1. Dosagem de estradiol no FF

Com relação às dosagens de estradiol no FF não houve diferença significativa entre os grupos estudo e controle. Os níveis de estradiol também não foram diferentes entre os folículos pequenos e grandes dos respectivos grupos G1 (393.640,15±211.418,36 pg/mL), G2 (427.771,79±197.817,94 pg/mL), G3 (406.582,06±223.111,99 pg/mL) e G4 (503.091,43±161.769,48 pg/mL) $p=0,5737$ (Figura 5).

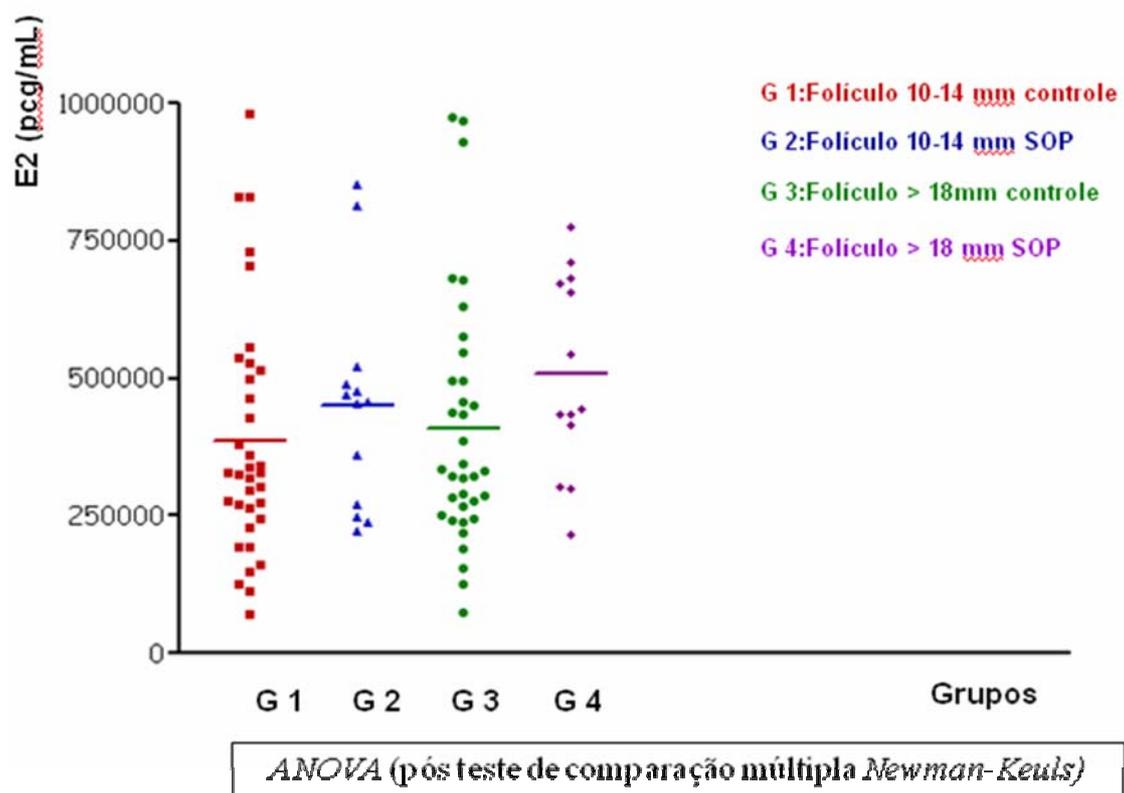


Figura 5: Comparação entre as dosagens de estradiol no FF entre folículos de 10 a 14 mm e folículos maiores que 18 mm do grupo controle e do grupo SOP. A linha que cruza o meio de cada quadro representa a média.

5.2. Dosagem de progesterona no FF

Na análise de progesterona no FF, entre os quatro grupos estudados, houve diferença significativa entre os grupos G2 ($7.596,29 \pm 3.519,94$ ng/mL) e G3 ($10.571,18 \pm 2.684,54$ ng/mL) $p=0,004$ (Figura 6). Ao compararmos todos os folículos entre 10 e 14 mm com todos os folículos maiores que 18 mm, foi possível constatar que os folículos pequenos (8.435 ± 3.305 ng/mL) apresentam valores menores de progesterona do que os folículos grandes (10.280 ± 3.475 ng/mL), com $P < 0,01$. (Figura 7) A análise de todos os folículos do grupo controle comparados com todos do grupo SOP revelou que as dosagens foliculares de progesterona são maiores no grupo controle (9.824 ± 3128 ng/mL) do que no grupo com SOP (8.095 ± 4151 ng/mL), com $P = 0,03$. (Figura 8).

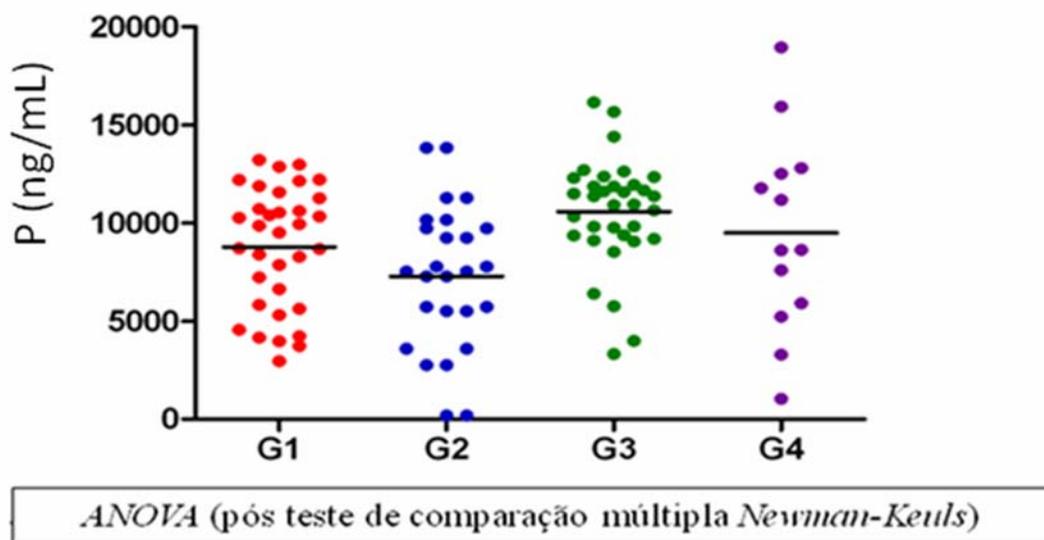
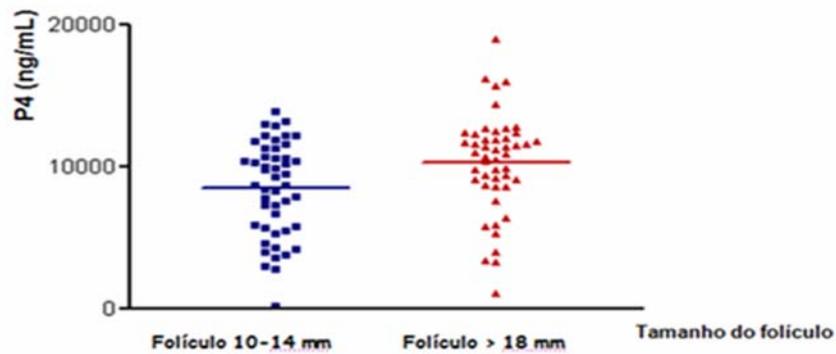
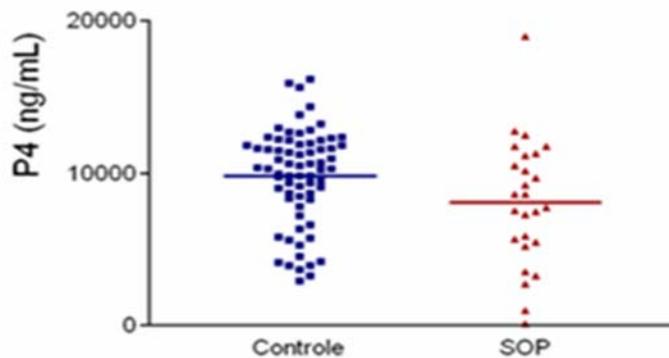


Figura 6: Comparação entre as dosagens de progesterona no FF de folículos pequenos e grandes do grupo SOP e grupo controle. A linha que cruza o meio de cada quadro representa a média.



Teste t não pareado

Figura 7: Comparação entre as dosagens de progesterona em todos os FF pequenos e todos os FF grandes. A linha que cruza o meio de cada quadro representa a média.

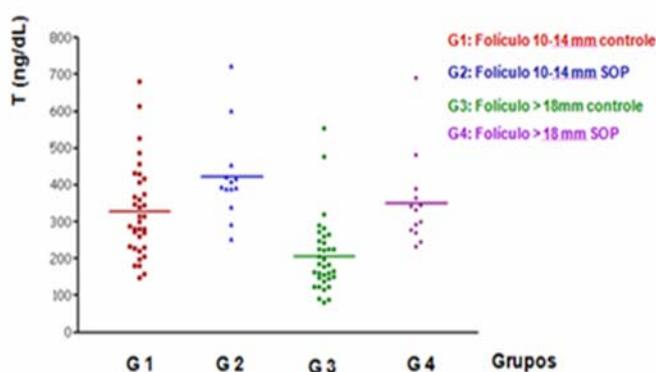


Teste t não pareado

Figura 8: Comparação entre as dosagens de progesterona em todos os FF do grupo controle e todos os FF do grupo SOP. A linha que cruza o meio de cada quadro representa a média.

5.3. Dosagem de testosterona no FF

Nas dosagens de testosterona no FF, entre os quatro grupos analisados, foi observado diferença significativa entre o G1 ($326,6 \pm 124,4$ ng/dL) e o G3 ($205,8 \pm 98,91$ ng/dL) $p < 0,001$, e entre o G3 ($205,8 \pm 98,91$ ng/dL) e o G4 ($351,10 \pm 122,1$ ng/dL) $p < 0,001$. Ao compararmos todos os folículos entre 10 e 14 mm com todos os folículos maiores que 18 mm, foi possível constatar que os folículos pequenos ($508,9 \pm 266$ ng/dL) apresentaram valores maiores de testosterona do que os folículos grandes ($245,10 \pm 123$ ng/dL), com $p < 0,0001$. Ao analisarmos todos os folículos do grupo controle comparados com todos do grupo SOP não foram observadas diferenças significativas (SOP= $386,4 \pm 125,2$ ng/dL) (controles= $373,5 \pm 277,5$ ng/dL), $p = 0,82$. (Figura 9).



ANOVA (pós teste de comparação múltipla Newman-Keuls)

Figura 9: Comparação entre as dosagens de testosterona no FF de folículos pequenos e grandes do grupo SOP e grupo controle. A linha que cruza o meio de cada quadro representa a média.

5.4. Dosagem de androstenediona no FF

As dosagens de androstenediona no FF não apresentaram diferença significativa entre os grupos SOP e controle. Os níveis de androstenediona também não foram diferentes entre os folículos pequenos e grandes dos respectivos grupos: G1 (547,44±291,38 ng/dL), G2 (485,209±261,23 ng/dL), G3 (454,97±206,44 ng/dL), e G4 (512,36±299,45 ng/dL) $p=0,56$ (Figura 10).

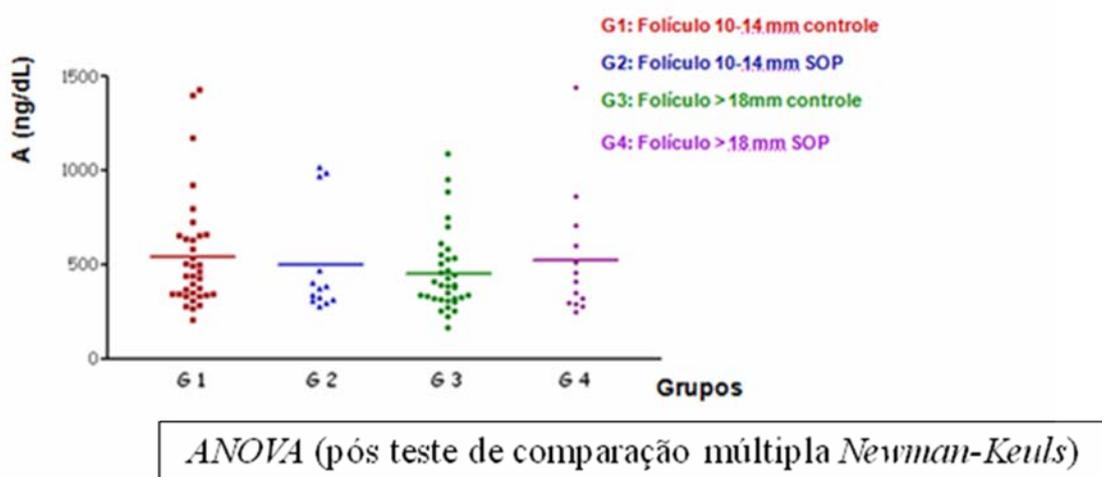


Figura 10: Comparação entre as dosagens de androstenediona no FF de folículos de 10 a 14 mm e folículos maiores que 18 mm do grupo controle e do grupo SOP. A linha que cruza o meio de cada quadro representa a média

5.5. Dosagem de glicose e insulina no plasma

As dosagens de glicose no plasma não apresentaram diferença significativa entre os grupos SOP (92,25 ± 10,82) e controle (87,81 ± 7,44) $p=0,13$. (Figura 11), As dosagens de

insulina também não tiveram diferença significativa entre os grupos SOP ($6,27 \pm 3,62$) e controle ($5,96 \pm 4,40$) $p=0,82$ (Figura 12).

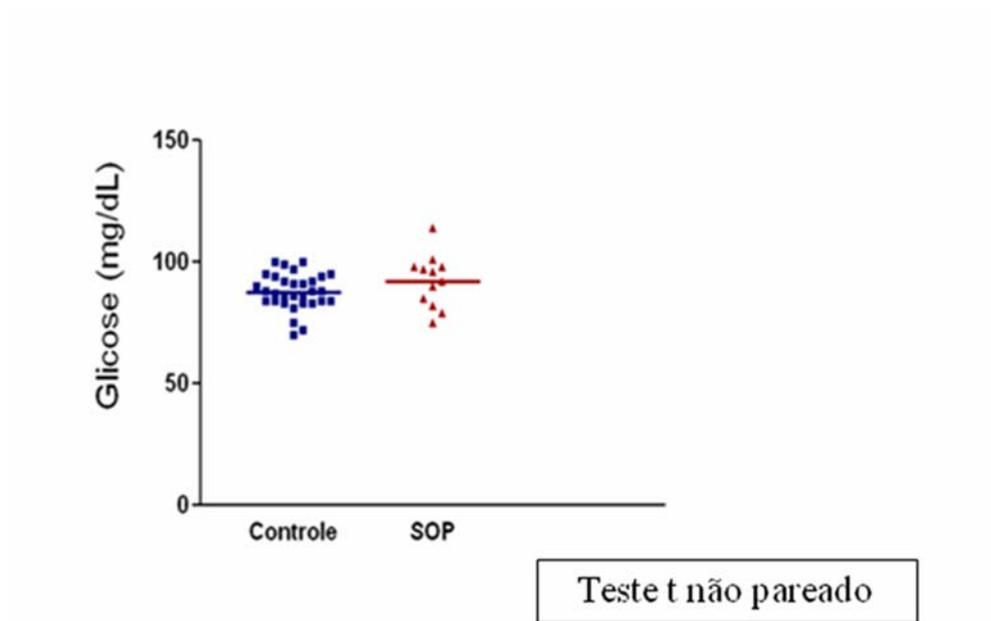


Figura 11: Comparação das dosagens de glicose no plasma entre os grupos SOP e controle.

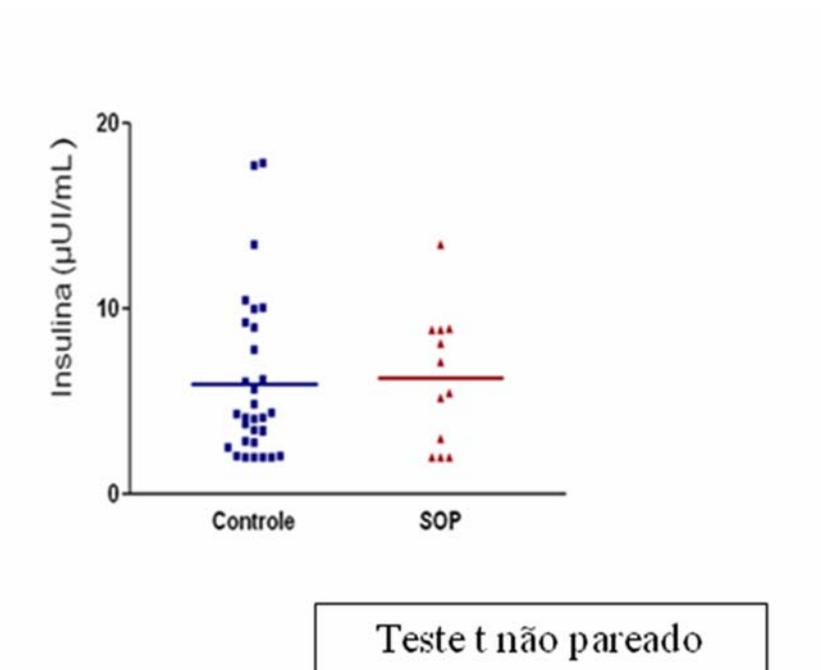
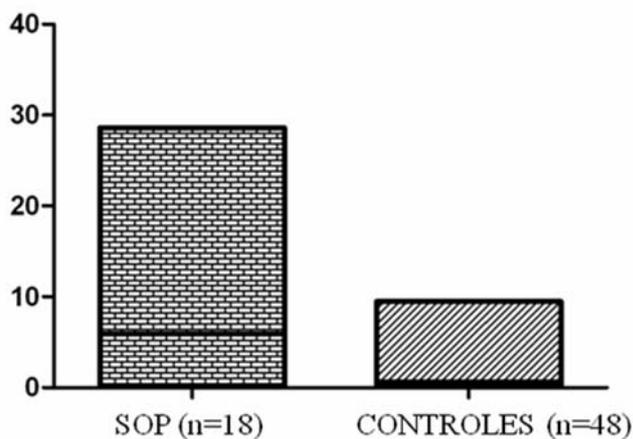


Figura 12: Comparação das dosagens de insulina no plasma entre os grupos SOP e controle.

5.6. Expressão do BMP15 e do GDF9 nos oócitos

Foram analisados 18 oócitos maduros de 18 mulheres com SOP e 48 oócitos maduros de 35 mulheres controles. A expressão do gene BMP15 nos oócitos foi significativamente maior nas mulheres com SOP quando comparada ao grupo controle (Mediana = 5,95 e 0,59, respectivamente) com $P=0,0005$, assim como a expressão do GDF9, que também mostrou-se elevada nas mulheres com SOP quando comparadas ao grupo controle (Mediana = 2,70 e 0,63, respectivamente), com $P=0,0006$. A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste de *Mann Whitney* (Figura 13 e 14).

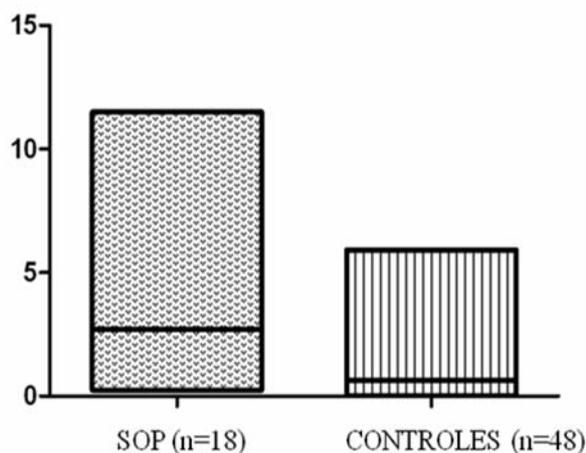
Expressão do BMP15 nos oócitos individuais



Mann Whitney test (p=0,006)

Figura 13: Gráfico representativo da expressão do gene BMP15 em oócitos individuais de mulheres com SOP e controles. A linha que cruza as colunas representa a mediana.

Expressão do GDF9 nos oócitos individuais



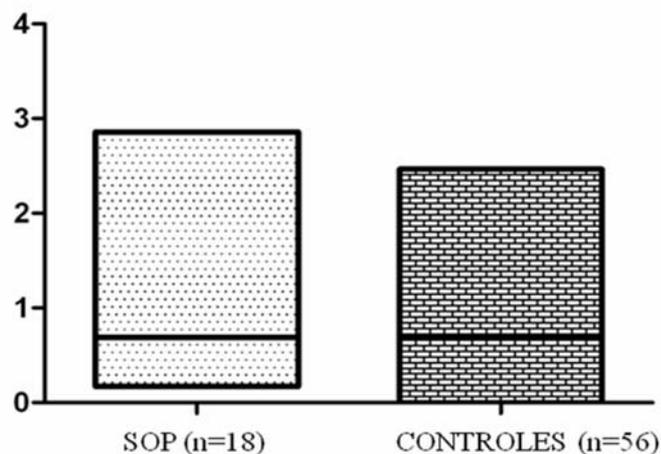
Mann Whitney test ($p=0,0006$)

Figura 14: Gráfico representativo da expressão do gene GDF9 em oócitos individuais de mulheres com SOP e controles. A linha que cruza as colunas representa a mediana.

5.7. Expressão do BMPR2 nas células da granulosa

Foram analisadas 18 células da granulosa de 18 mulheres com SOP e 56 células da granulosa de 35 mulheres controles. A expressão do BMPR2 não teve diferença significativa entre os dois grupos analisados (Mediana 0,74 – SOP e 0,70 – controle) $P=0,7588$. A análise estatística foi feita utilizando-se o teste de *Mann Whitney* (Figura 15).

Expressão do BMPR2 nas células da granulosa



Mann Whitney test (p=0,7588)

Figura 15: Gráfico representativo da expressão do gene BMPR2 em células da granulosa de mulheres com SOP e controles. A linha que cruza as colunas representa a mediana.

5.8. AVALIAÇÃO DA TAXA DE GRAVIDEZ

A taxa de gravidez entre os grupos SOP e controle foi avaliada pela dosagem do β -hCG no plasma. As taxas não foram diferentes entre os grupos. A análise estatística foi feita utilizando-se o teste exato de *Fisher* (Tabela 4).

Tabela 4: Taxa de gravidez das mulheres com SOP e controles

	SOP (n=18)	Controle (n=35)	<i>p</i>
β -hCG positivo	9/18 (50%)	13/35 (37,14%)	0,3941

5.9. Análise da correlação da expressão dos genes BMP15, GDF9 em oócitos e do receptor BMPR2 nas células da granulosa luteinizadas com os níveis de esteróides sexuais no FF

Ao correlacionar a expressão do BMP15 com os níveis de esteróides sexuais presentes no FF grande, não houve correlação positiva entre a expressão do gene com estes esteróides, analisando todos os grupos e separadamente.

O BMP15 mostrou ter correlação positiva com as taxas de gravidez ($r=0.36$, $p=0,0060$). Ao correlacionar a expressão do gene com os grupos separadamente, observamos que no grupo SOP, quanto maior a expressão do BMP15 maior a taxa de gestação ($r=0.60$, $p=0,0062$), enquanto que no grupo controle não observamos esta correlação ($r = -0.04293$, $p=0,7980$).

A correlação entre a expressão do GDF9 e a testosterona no FF grande foi positiva quando analisamos ambos os grupos ($r=0.26504$, $p=0,0398$), porém ao analisarmos os grupos separadamente, não observamos correlação com o grupo SOP ($r=0.32527$, $p=0,7454$) nem com o grupo controle ($r=0.11887$, $p=0,1969$). A correlação da expressão do GDF9 com os demais esteróides não teve resultados significativos. A expressão do GDF9 também está relacionada com a taxa de gravidez. Quanto maior a expressão, maior a taxa de gestação em ambos os grupos ($r=0.26504$, $p=0.0463$). Ao analisarmos esta correlação com os grupos separadamente, não houve diferença significativa no grupo SOP ($r=0.32527$, $p=0,1742$) e também não houve diferença no grupo controle ($r=0.11887$, $p=0,4772$).

Comparando a expressão do BMPR2 com os níveis de esteróides no FF grande, observamos que sua expressão teve uma correlação positiva com a testosterona ($r=0.29293$, $p=0,0433$). Na análise por grupo, esta correlação foi positiva apenas no grupo SOP

($r=0.62756$, $p=0,0163$). Com relação à androstenediona, a expressão do receptor BMPR2 foi positiva no grupo SOP ($r=0.55966$, $p=0,0374$).

Além dessas análises, também correlacionamos as taxas de gravidez com a quantidade de oócitos imaturos e maduros aspirados, número de embriões clivados e embriões formados. Observamos que a taxa de gravidez teve uma correlação positiva com o número de embriões formados ($r=2,726$ $p=0,050$) quando analisamos ambos os grupos. Separadamente, não houve diferenças entre eles (correlação de *Pearson*).

6. DISCUSSÃO

6.1. Os esteróides sexuais no FF

No presente estudo, comparamos a resposta de pacientes com SOP submetidas a hiperestimulação ovariana e FIV com um grupo controle cujo único fator de infertilidade era a presença de um fator masculino leve, a fim de termos pacientes controles com ovários normais.

Os níveis de testosterona de todas as pacientes analisadas, independente do grupo experimental, mostraram-se aumentados nos folículos pequenos (10-14 mm). Este dado reflete a baixa conversão de testosterona em estradiol pelas células da granulosa nos folículos imaturos, com acúmulo de testosterona no FF, compatível com o baixo potencial estrogênico desses folículos. Os níveis de testosterona no FF, independente do tamanho do folículo, foram mais elevados nas pacientes com SOP quando comparado com o grupo controle. Este achado pode ser justificado pelo hiperandrogenismo presente nas mulheres com esta síndrome, podendo influenciar a qualidade oocitária e o processo de fertilização. A literatura demonstra que as concentrações de andrógenos são altas na SOP e que a proporção entre andrógenos e estrógenos (relação T/E2) é alta no FF de mulheres com SOP. O aumento na atividade da enzima CYP17, na etapa inicial da cascata esteroidogênica, associada com a redução da 3 β HSD contribui para o aumento significativo dos níveis da 17-OHSP, com consequente aumento da DHEA, androstenediona e testosterona em mulheres com SOP.

Os níveis de androstenediona no FF não diferiram entre os grupos de folículos maduros ou imaturos e entre os grupos SOP e controle avaliados neste estudo. De fato, as concentrações de androstenediona no plasma ou FF podem apresentar variações consideráveis devido à sua produção pela adrenal e tecido periférico (50% de sua produção é

originária da glândula adrenal e ovários e os 50% restantes originam de conversão em tecido periférico), não sendo o melhor marcador biológico do hiperandrogenismo ovariano.

Os níveis de progesterona foram mais elevados nos folículos maduros de todas as mulheres analisadas (SOP e controles), quando comparados aos folículos imaturos. Este aumento da progesterona é condizente com o estágio de maturação folicular. A progesterona no FF de pacientes com SOP apresentou-se diminuída em comparação com as mulheres do grupo controle. Inversamente, estudos utilizando células da teca (CT) recém-isoladas demonstraram que tanto a biossíntese de andrógenos quanto de progesterona está aumentada em células da teca obtidas de ovários de mulheres com SOP. Este aumento na biossíntese de esteróides resulta da expressão seletivamente aumentada dos genes da P450sc (CYP11A), 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo II (HSD3B2) e 17 α -hidroxilase (CYP17) (Wickenheisser et al., 2002). A redução da concentração de progesterona no FF de pacientes SOP pode ser explicada pela inibição da síntese de progesterona nas CG e CT pelo GDF9 e BMP15. De fato, observou-se aumento na expressão dos genes que codificam para estes 2 fatores nos oócitos de pacientes SOP, os quais são inibidores potentes de luteinização nas células foliculares. O GDF9 inibe a produção de progesterona estimulada pelo AMPc nas células da granulosa e da teca humanas (Yamamoto et al., 2002). Da mesma forma, o BMP15 inibe a produção de P4 induzida pelo 8-bromo-AMPc nas células foliculares (Otsuka et al., 2000).

O tratamento de CTs humanas com GDF9 bloqueia a produção de progesterona estimulada pela forskolina, e a síntese de 17 α -hidroxiprogesterona e deidroepiandrosterona. As células da teca apresentaram maior sensibilidade ao GDF9, sugerindo que esta célula pode ser um alvo primário do GDF9. Além disso, o GDF9 aumentou o número de células da teca em cultura, mas não teve efeito sobre o crescimento de células da granulosa. Estes achados implicam o GDF9 na modulação da esteroidogênese folicular, especialmente a função das

células da teca, já que transcritos do GDF9 e proteína são detectáveis nas células da granulosa luteínicas após o pico de LH (Yamamoto et al., 2002).

As concentrações de estradiol não foram estatisticamente diferentes entre os grupos SOP e controle e também não diferiram em relação ao diâmetro folicular. Na SOP, não associada à HOC, frequentemente as concentrações de estrógeno no FF são baixas quando comparadas com mulheres normais (Eden et al., 1990). Contudo, pacientes em SOP submetidas à HOC o FSH recombinante utilizado no tratamento de FIV estimula a atividade de aromatase nas CG corrigindo os níveis de estrógenos no FF. É importante considerar a possibilidade da participação do GDF9 e BMP15 no processo de aromatização em associação com o FSH nas concentrações de estradiol nas pacientes SOP .

A composição do fluido pode influenciar e/ou determinar a qualidade oocitária. Estudos anteriores demonstraram que a concentração dos hormônios esteróides, hormônios pituitários, citocinas e fatores de crescimento no FF está relacionada com o desenvolvimento oocitário, taxa de fertilização e desenvolvimento embrionário precoce (Salamassi et al., 2005). Como os níveis de progesterona, estradiol e testosterona no FF são significativamente modificados durante o período pré-ovulatório, especialmente depois do pico do LH, a análise de suas concentrações no FF de ciclos de fertilização *in vitro*, foram correlacionadas com a maturação oocitária e demonstrado que os níveis de estradiol e testosterona podem ser utilizados como parâmetros preditivos para a maturação oocitária. No entanto, não foi observado correlação dos esteróides do FF com as taxas de fertilização dos oócitos (Costa et al., 2004).

Tem sido bastante questionado o papel da SOP nos resultados de fertilização *in vitro*. A evolução do tratamento com HOC e FIV nessas mulheres parece ser similar a mulheres normais no que diz respeito as taxas de gravidez (Franks et al., 2003). Em estudo prévio, evidenciamos que o resultado de fertilização *in vitro* em mulheres com SOP está

comprometido por apresentar no recrutamento folicular um maior número de folículos com diâmetros reduzidos, taxa reduzida de fertilização e elevada taxa de Síndrome de hiperestimulação ovariana (Reis et al., 2004).

Frente a alta incidência de folículos de tamanho reduzido com a HOC em mulheres com SOP, questiona-se a influência dos altos níveis dos esteróides sexuais presentes no FF no desenvolvimento folicular e qualidade oocitária.

6.2. A expressão dos fatores BMP15 e GDF9 nos oócitos

O progresso de um folículo através dos sucessivos estágios da foliculogênese depende da comunicação bidirecional entre os oócitos e as células somáticas presentes no ovário, além de depender também da sinalização endócrina de gonadotrofinas e esteróides (Binelli e Murphy, 2010).

Neste estudo, onde foram analisados oócitos maduros de mulheres com SOP submetidas a HOC para tratamento de fertilização *in vitro*, a expressão do BMP15 e do GDF9 nos oócitos foi maior quando comparada ao grupo de mulheres com ciclos ovulatórios, também submetidas ao mesmo esquema terapêutico. Em ovários de mulheres com SOP, onde há uma mudança na arquitetura ovariana caracterizada pelo acúmulo de folículos estacionados nas fases iniciais da foliculogênese, foi observado que existe uma diminuição na expressão desses fatores, possivelmente influenciando na qualidade oocitária e taxas de fertilização (Filho et al., 2002). Entretanto, um estudo recente demonstrou que mulheres com SOP quando submetidas a HOC para tratamento de fertilização *in vitro* não tiveram diminuição da expressão destes fatores em oócitos imaturos (em fase de vesícula germinativa e metáfase I), comparadas a um grupo controle, sugerindo que o uso do FSH exógeno pode corrigir uma disfunção na expressão destes fatores (Zhao et al., 2009). Na última década, pesquisadores

demonstraram a importância do BMP15 e do GDF9 na foliculogênese, mostrando que estes fatores estão diretamente relacionados ao crescimento folicular e a uma melhor qualidade oocitária (Chand et al., 2006; Moore et al., 2004; Vitt et al., 2000). Nossos resultados reforçam a hipótese de Zhao et al., 2009, de que o uso de FSH exógeno pode estimular não só o crescimento folicular, mas também aumentar a expressão do gene BMP15 e GDF9 nos oócitos, levando a uma melhor qualidade oocitária e consequentemente fertilização.

Nossos resultados mostraram que o BMP15 apresentou-se mais expresso que o GDF9 em ambos os grupos estudados. Sendo o papel biológico do BMP15 iniciar o crescimento folicular e o GDF9 crucial para a progressão da foliculogênese desde a fase folicular primária até a fase de folículo pré-ovulatório (Chand et al., 2006), estes achados sugerem que o BMP15 seja mais sensível ao estímulo do FSH exógeno, ao passo que este atua estimulando o crescimento folicular já nos estágios iniciais da foliculogênese.

Relatos de grande quantidade de folículos pequenos presentes no recrutamento folicular e baixas taxas de fertilização dos oócitos tem sido descrita em mulheres com SOP quando submetidas a ciclos de fertilização *in vitro* (Franks et al., 2003; Reis et al., 2004). Na nossa amostra as pacientes do grupo SOP apresentaram quantidade de oócitos maduros capturados durante a aspiração folicular semelhante às pacientes do grupo controle, não havendo diferença entre elas. As taxas de fertilização também foram semelhantes entre os dois grupos. Este achado pode ser justificado pela maior expressão de BMP15 e GDF9 encontrada nas pacientes com SOP submetidas a HOC, visto que este gene é um potente promotor da expansão das células do cumulus (Vitt et al., 2005) e, consequentemente, maturação e melhor qualidade oocitária. O aumento na expressão gênica do BMP15 e GDF9 em pacientes com SOP submetidas a HOC com FSH recombinante, também poderia explicar porque as mulheres deste estudo apesar dos níveis elevados de testosterona no FF apresentam taxas de gravidez semelhantes ao grupo controle.

Não encontramos diferença na expressão do receptor do BMPR2 nas células da granulosa das pacientes com SOP e nas com ciclos menstruais ovulatórios. O BMP15 pode ligar-se a vários receptores nas CGs, como o BMPR2, receptor de ativinas do tipo 2, *activin-like kinase-2* (ALK2) e ALK6. Os três tipos de receptores das BMPs são expressos nos diferentes tipos de células ovarianas, incluindo oócito, células da granulosa, células da teca, células epiteliais e endoteliais em ovários de ratas, porcas, ovelhas e na mulher, embora haja diferenças sutis nos padrões de expressão entre as espécies (Kovanci et al., 2007). De todos estes receptores, ALK6 é o mais eficiente em se ligar ao BMP15 enquanto que o BMPR2 é o mais eficiente em sua bioatividade (Moore et al., 2003). Isto possivelmente explica porque a expressão do receptor BMPR2 nas CGs das pacientes com SOP submetidas à HOC não diferiu do grupo controle, apesar da maior expressão do BMP15 e do GDF9 nos oócitos das portadoras de SOP.

Embora mulheres com SOP tenham bons resultados de gravidez com o tratamento com indução da ovulação e FIV (Homburg et al., 1993, MacDougall et al., 1993), essas mulheres têm maior risco de desenvolver síndrome de hiperestimulação ovariana após indução da ovulação para ciclos de fertilização *in vitro*, altas taxas de cancelamento de ciclo e maior número de oócitos com diâmetro reduzido coletados (Costello et al., 2006). Também tem sido documentada complicações na evolução da gestação dessas mulheres como diabetes gestacional, hipertensão induzida pela gravidez e pré-eclâmpsia (Boomsma et al., 2006). Os bebês destas mulheres apresentam ainda hipoglicemia, icterícia e síndrome do sofrimento respiratório. Estas complicações são mais frequentemente observadas em pacientes com obesidade ou IMC aumentado associada à SOP (Kristensen et al., 2005).

O ambiente intra-folicular, incluindo hormônios e citocinas em concentrações apropriadas, é crucial para o desenvolvimento folicular e maturação oocitária (Wu et al.,

2007). Estudos adicionais serão necessários para determinar quanto o BMP15 e o GDF9 estão relacionados com a qualidade de cada oócito.

6.3. Análise da correlação entre a expressão do BMP15 e do GDF9 em oócitos e do BMP2 nas células do cumulus com os níveis de esteróides sexuais no FF de folículos maduros

A expressão do BMP15 e do GDF9 não mostrou ter nenhuma correlação positiva com os níveis de esteróides sexuais presentes nos FF maduros. Diante desses dados, podemos sugerir que os altos níveis de andrógenos presentes na SOP não influenciaram na expressão destes genes. Este achado pode explicar porque mulheres com hiperandrogenismo tiveram resultados semelhantes às pacientes normais no que diz respeito a taxa de gravidez, número de oócitos maduros captados e quantidade de embriões formados. Este achado sugere ainda que a expressão destes genes é influenciada pela ação do FSH recombinante utilizado nos tratamentos com HOC e não sofre alterações com altos níveis de andrógenos presentes no FF de mulheres com SOP.

Podemos observar ainda que a expressão do BMP15 e do GDF9 está diretamente relacionada à melhores taxas de gravidez, demonstrando a importância destes fatores na qualidade oocitária, fertilização e desenvolvimento embrionário. principalmente nas pacientes com SOP. Estes dados demonstram também que o tratamento com FSH recombinante pode corrigir a disfunção ovariana presente na SOP e melhorar os resultados nos tratamentos de FIV, aumentando a expressão dos genes BMP15 e GDF9.

Assim como não obtivemos resultado significativo na expressão do BMP2 nos grupos estudados, também não encontramos uma correlação positiva entre a expressão desse receptor com nenhum dos dados analisados. Este achado reforça a hipótese de que os genes

podem estar se ligando a outros receptores de BMPs presentes nas células da granulosa. Para analisar esta hipótese será necessário avaliar a expressão dos demais receptores de BMPs em estudos futuros.

Apesar de estar bem estabelecido o papel do sistema BMP15/GDF9 na foliculogênese em modelos animais, estudos para definir o envolvimento preciso destes fatores na fisiologia/fisiopatologia ovariana humana são necessários para os avanços da ciência básica e a aplicação potencial dos conhecimentos obtidos em biotecnologias clínicas envolvendo o sistema BMP ovariano.

Os resultados deste estudo em oócitos maduros são inéditos e complementam a compreensão do papel desses fatores de diferenciação celular na fisiopatologia da síndrome dos ovários policísticos.

7. CONCLUSÕES

Diante destes dados, podemos concluir que mulheres com SOP submetidas a hiperestimulação ovariana controlada para tratamento de fertilização *in vitro* tem um aumento na expressão dos genes BMP15 e GDF9 nos oócitos maduros, possivelmente por uma maior sensibilidade ao uso de FSH exógeno utilizado no tratamento. O BMP2 não se mostrou aumentado nas pacientes com SOP, possivelmente pelo BMP15 e GDF9 poder se ligar a outros receptores para BMPs presentes não só na células da granulosa, mas também em outras células ovarianas, incluindo oócitos.

A progesterona no FF de pacientes com SOP apresentou-se diminuída em comparação com as mulheres controle, sugerindo que a redução da conversão de C21 para C19 não está sendo realizada de maneira eficiente nas mulheres com SOP como ocorre nas mulheres com ciclos ovulatórios, proporcionando um excesso de androgênios no FF dessas mulheres.

O aumento na expressão do BMP15 e GDF9 contribuiu para melhor qualidade oocitária, melhores taxas de fertilização e gravidez nas pacientes com SOP, sugerindo que o hiperandrogenismo presente não prejudicou o tratamento destas pacientes.

A taxa de gravidez não foi diferente entre os grupos, sugerindo que o aumento da expressão do BMP15 e do GDF9 nas pacientes com SOP melhorou as taxas de fertilização e, conseqüentemente, a taxa de gravidez.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aittomeaki K, *et al.* (1996). Clinical features of primary ovarian failure caused by a point mutation in the follicle-stimulation hormone receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab* 81, 3722-3726.
2. Beau I, *et al.* (1998). A novel phenotype related to partial loss of function mutations of the follicle stimulation hormone receptor. *J Clin Invest* 102, 1352-1359.
3. Bergh C, Broden H, Lundin K, Hamberger L. (1998). Comparasion of fertilization, cleavage and pregnancy rates of oocyte from large and small follicles. *Hum Reprod* 13(7): 1912-1915.
4. Binelli MAB and Murphy BD (2010). Coordinated regulation of follicle development by germ and somatic cells Reproduction. *Fertil Develop* 22: 1–12.
5. Buccione R, Vanderhyden BC, Caron PJ, Eppig JJ (1990). FHS-induced expansion of the mouse cumulus oophorus in vitro is dependent upon a specific factor(s) secreted by the oocyte. *Dev Biol* 138:16-25.
6. Camargos AF, Lemos CNCD (2003). Fisiologia Reprodutiva In: Sheffer BB, Remohí J, Garcia-Veslasco J, Pellicer A, Simon C. Reprodução Humana Assistida. Editora Atheneu, São Paulo, p. 13-31.
7. Carabatsos MJ, *et al* (1998). Characterization of oocyte and follicle development in growth differentiation factor-9-deficient mice. *Dev Biol* 204: 373-384.
8. Cedars MI, Steingold KA, de Ziegler D, Lapolt PS, Chang RJ, Judd HL (1992). Long-term administration of gonadotropin-releasing hormone agonist and dexamethasone: assessment of the adrenal role in ovarian dysfunction, *Fertil Steril* 57 (3) 495–500.
9. Chand AL, Ponnampalam AP, Harris SE, Winship IM, Shelling AN (2006). Mutational analysis of BMP15 and GDF9 as candidate genes for premature ovarian failure. *Fertil Steril* 86(4): 1009-1012.
10. Choi, Y., and Rajkovic, A. (2006). Genetics of early mammalian folliculogenesis. *Cell Mol Life Sc.* (63): 579–590. (doi:10.1007/S00018-005-5394-7)
11. Costa LOB, Mendes MC, Ferriani RA, Moura MD, Reis RM, Silva de Sá MF (2004). Estradiol and testosterone concentrations in follicular fluid as criteria to discriminate between mature and immature oocytes. *Braz J Med Biol Res* 37(11) 1747-1755

12. Coulam CB, Adamson SC, Annegers JF (1986). Incidence of premature ovarian failure. *Obstet Gynecol* 67(4):604-6.
13. Dong J, *et al.* (1996). Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 383, 531-535.
14. Dubey AK, Wang HA, Duffy P, Penzias AS (1995). The correlation between follicular measurements, oocyte morphology, and fertilization rates in an *in vitro* fertilization program. *Fertil Steril* 64: 787-790.
15. Dunalf A, Givens JR, Haseltine FP, Merrian GR (1992). Polycystic ovary syndrome. London: *Blackwell Scientific Publications, Inc.*: 392.
16. Ehrmann DA, Barnes RB, Rosenfield RL, Cavaghan MK, Imperial J (1999). Prevalence of impaired glucose tolerance and diabetes in women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes Care* 22: 141-146.
17. Elvin JA, *et al* (1999). Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Mol Endocrinol* 13, 1035-1048.
18. Elvin JA, Yan C, Matzuk MM (2000). Oocyte-expressed TGF-beta superfamily members in female fertility. *Mol Cell Endocrinol* 159:1-5.
19. Espey LL, Lipner H (1963). Measurements of intrafollicular pressures in the rabbit ovary. *Am J Physiol* 205:1067.
20. Ferriman DG, Gallwey JD (1961). Clinical assessment of body hair growth in women. *J Clin Endocrinol Metab* 21: 1440-7.
21. Filho FLT, Baracat EC, Lee TH, Suh CS, Matsui M, Chang RJ, Shimasaki S, Erickson GF (2002). Aberrant expression of growth differentiation factor-9 in oocytes of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metabol* 87(3): 1337-1344.
22. Franks S, Roberts LR, Hardy K (2003). Gonadotrophin regimens and oocyte quality in women with polycystic ovary syndrome. *Reprod Biomed Online* 6: 181-4
23. Galloway SM, *et al* (2000). Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Genet* 25, 279-283.
24. Gerard GF, Fox DK, Nathan M, D'Alessio JM (1997). The use of cloned moloney murine leukemia virus reverse transcriptase to synthesize DNA from RNA. *Mol Biothechnol* 1: 61-77.

25. Glistler C, Groome NP, Knight PG (2003). Oocyte-mediated suppression of follicle-stimulating hormone and insuline-like growth factor-induced secretion of steroids and inhibin-related proteins by bovine granulosa cells in vitro: possible role of transforming growth factor α^1 . *Biol Reprod* 68: 758-765.
26. Gougeon A (1996). Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 17, 121-155.
27. Hanharan JP, *et al.* Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (Ovisaries). *Biol Reprod* (*in press*).
28. Hiller SG, Reichert Jr & Van Hall EV (1981). Control of preovulation follicular estrogen biosynthesis in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metabol* 52: 847-856.
29. Hiller SG, Wickings EJ, Atnan M, Margara RA & Winston RM (1984). Granulosa cell steroidogenesis before in vitro fertilization. *Biol Reprod* 31:679-686.
30. Homburg R, Berkowitz D, Levy T, Feldberg D, Ashkenazi, Ben-Rafael Z (1993). In vitro fertilization and embryo transfer for the treatment of infertility associated with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 60: 858-63.
31. Jamnongjit M and Hammes SR (2006). Ovarian Steroids: The Good, the Bad, and the Signals that Raise Them *Cell Cycle* 5(11), 1178–1183.
32. Juengel JL, *et al* (2000). Gene expression in abnormal ovarian structures of ewes homozygous for the Inverdale prolificacy gene. *Biol Reprod* 62, 1467-1478.
33. Knight PG, Glistler C (2003). Local roles of TGF- β superfamily members in the control of ovarian follicle development. *Anim Reprod Sci* 78:165-83.
34. Kristensen J, Vestergaard M, Wisborg K, Kesmodel U and Secher NJ (2005) Pre-pregnancy weight and the risk of stillbirth and neonatal death. *BJOG* 112,403–408.
35. Kovanci E, Rohozinski J, Simpson JL, Heard MJ, Bishop CE, Carson SA (2007). Growth differentiation factor-9 mutations may be associated with premature ovarian failure. *Fertil Steril* 87(1): 143-146.
36. Latham KE, Wigglesworth K, NcMenamim M, Eppig JJ. (2004). Stage-dependent effects of oocytes and growth differentiation factor 9 on mouse granulosa cell development:

advantage programming and subsequent control of transition from preantral secondary follicles to early antral tertiary follicles. *Biol Reprod* (70):1253-1262.

37. Li R, Norman RJ, Armstrong DT, Gilchrist RB (2000). Oocyte-secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells. *Biol Reprod* 63:839-845.
38. Lighten AD, Moore GE, Winston RML, Hardy K (1998). Routine addition of human insuline-like growth factor-I ligant could benefit clinical in-vitro fertilization culture. *Hum Reprod* 13: 3144-3150.
39. Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4):402-8.
40. Luborsky, JL, Meyer, P, Sowers, MF, Gold, EB, Santoro, N (2003). Premature menopause in a multi-ethnic population study of the menopause transition. *Hum Reprod* 18(1):199-206.
41. MacDougall MJ, Tan SL, Balen A, Jacobs HS (1993). A controlled study comparing patients with and without polycystic ovaries undergoing in vitro fertilization. *Hum Reprod* 8:233-7.
42. Massagué J, Chen YG (2000). Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev* 14:627-644.
43. Matzuk MM (2000). Revelations of ovarian follicle biology from gene knockout mice. *Mol Cell Endocrinol* 163:61-66.
44. Mazerbourg S, Hsueh AJ (2006). Genomic analyses facilitate identification of receptors and signaling pathways for growth differentiation factor 9 and related orphan bone morphogenetic protein/growth differentiation factor ligands. *Human Reproduction Update* 12(4):373-383.
45. Miyazono K, Kusanagi K, Inoue H (2001) Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling. *J Cell Physiol* 187:265-276.
46. McGee EA, and Hsueh AJW (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrinol Erv* 21, 200-214.
47. Moore RK, et al (2003). Molecular basis of bone morphogenetic protein-15 signaling in granulosa cells. *J Biol Chem* 278: 304-310.

48. Moore RK, Erikson GF, Shimasaki S (2004). Are BMP15 and GDF9 primary determinants of ovulation quota in mammals? *Endocrinol Metabol* 15(8): 356-361.
49. Moore RK, Otsuka F, Shimasaki S. (2003) Molecular basis of bone morphogenetic protein-15 signaling in granulosa cells. *J Biol Chem* 278:304-10.
50. Ord T, Patrizio P, Mareello E, Balmaceda JP, Asch RH (1990). Mini-Percoll: a new method of semen preparation for IVF in severe male factor infertility. *Hum Reprod* 5: 987-990.
51. Otsuka F, Yao Z, Lee T, Yamamoto S, Ericson GF, Shimasaki S (2000). Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions. *J Biol Chem* 275(39): 523-28.26).
52. Pangas SA, Matzuk MM (2005). The art and artefact of GDF9 activity: cumulus expansion and the cumulus expansion-enabling factor. *Biol Reprod* 73: 582-585.
53. Parr EL (1974). Histological examination of the rat ovarian follicle wall prior to ovulation. *Biol Reprod* 11:483–503.
54. Rashtchian A, Buchman GW, Schuster DM, Berninger MS (1992). Uracil DNA glycoylase-mediated cloning of polymerase reaction – amplified DNA: application to genomic and cDNA cloning. *Anal Biochem* 206(1): 91-97.
55. Reis RM, De Angelo AG, Romão GS, Santana LF, Moura MD, Feriani RA (2004). A Síndrome dos ovários policísticos pode interferir nos resultados da fertilização *in vitro*? *Rev Bras Ginecol Obstet* (26)9, 727-733.
56. Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group (2004) Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 81: 19-25.
57. Salmassi A, Schmutzler AG, Schaefer S, Koch K, Hedderich J, Jonat W and Mettler L (2005). Is granulocyte colony-stimulating factor level predictive for human IVF outcome? *Hum Reprod* 20:2434–2440.
58. Shi Y, Massagué J (2003) Mechanisms of TGF-beta signalind from cell membrane to nucleus. *Cell* 113:685-700.
59. Shimasaki S, et al (2004). The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocrinol Rev* 25: 72-101.
60. Suh CS, et al (2002). Ovarian life cycle: a contemporary view. *Rev Endocrinol Metab Disord* 3:5-12.

61. Yamamoto N, Christenson LK, McAllister JM, Strauss JF (2002). Growth differentiation factor-9 inhibits 3'5'-adenosine monophosphate-stimulated steroidogenesis in human granulosa and theca cells. *J Clin Endocrinol Metabol* 87:2849–2856. (doi: 10.1210/jc.87.6.2849).
62. Yan C, et al (2001). Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Mol Endocrinol* 15: 854-866.
63. Vanderhyden BC, Telfer EE, Eppig JJ (1992). Mouse oocytes promote proliferation of granulosa cells from preantral and antral follicles in vitro. *Biol Reprod* 46:1196-1204.
64. Vitt UA, et al (2000). Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulation hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. *Biol Reprod* 62:370-377.
65. Welt CK, Hall JE, Adams JM, Taylor AE (2005). Relationship of estradiol and inhibin to the follicle-stimulating hormone variability in hipergonadotropic hipogonadism or premature ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab* 90(2):826-30.
66. Wickenheisser JK, Strauss JF, McAllister JM (2002). Reproductive endocrinology Steroidogenic abnormalities in ovarian theca cells in polycystic ovary syndrome. *Current Opinion in Endocrinology & Diabetes* 9(6): 486-491.
67. Wittmaack FM, Kreger DO, Blasco L (1994). Effect of follicular size on oocyte retrieval, fertilization, cleavage, and embryo quality in in vitro fertilization cycles: a 6-year data collection. *Fertil Steril* 62: 1205-1210.
68. World Health Organization. Obesity preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation on obesity. Geneva 3-5 June, 1997.
69. Wu YT, Tang L, Cai J, Lu XE, Xu J, Zhu XM, Luo Q, Huang HF (2007). High bone morphogenetic protein-15 level in follicular fluid is associated with high quality oocyte and subsequent embryonic development. *Hum Reprod* 22(6): 1526–1531.
70. Zhang X, Jafari N, Barnes RB, Confino E, Milad M, Kazer RR (2005). Studies of gene expression in human cumulus cells indicate pentraxin 3 as a possible marker for oocyte quality. *Fertil Steril* 83(1):1169-1179.

ANEXOS

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Grupo Controle

1. **Nome da Pesquisa:** Expressão do fator de crescimento e diferenciação-9 (GDF9) e da proteína óssea morfogenética-15 (BMP15) em oócitos humanos e seus receptores nas células da granulosa luteinizadas de mulheres normais e com síndrome dos ovários policísticos.
2. **Pesquisador Responsável:** Prof. Dra. Rosana Maria dos Reis

Você e seu marido estão sendo convidados a participar da pesquisa “Expressão do fator de crescimento e diferenciação-9 (GDF9) e da proteína óssea morfogenética-15 (BMP15) em oócitos humanos e seus receptores nas células da granulosa luteinizadas de mulheres normais e com síndrome dos ovários policísticos.”

Esclarecimentos: A Síndrome dos Ovários Policísticos é uma causa bastante comum de irregularidade menstrual e de dificuldade para engravidar (denominada infertilidade). Questiona-se um dos motivos responsáveis tanto pela maior dificuldade em engravidar, como pela chance aumentada de abortamento nas mulheres portadoras desta síndrome, seja a inadequada qualidade dos oócitos (células femininas responsáveis pela reprodução), que poderão produzir embriões de má qualidade. Contudo, na atualidade, não se realiza a avaliação adequada da qualidade dos oócitos devido à ausência de métodos bem estabelecidos capazes de predizer se os oócitos são bons ou não. A identificação da presença de alterações nos oócitos de pacientes portadoras desta síndrome e de outras causas de infertilidade, não somente ajudaria a elucidar o mecanismo causador da infertilidade e da maior chance de abortamento, como também abriria perspectivas futuras de tratamento para este grupo de pacientes. Os fatores de crescimento que serão estudados nesta pesquisa, são substâncias produzidas pelos oócitos e estão relacionados com a função normal dos ovários para produzir oócitos de boa qualidade. Por isso, é muito importante que nós tenhamos um grupo de pacientes que não têm a doença (que seriam pacientes do grupo controle) para que possamos comparar a diferença desses fatores com as pacientes que têm essa síndrome.

Uma forma indireta de avaliarmos a qualidade dos seus oócitos, sem lhe causar qualquer risco adicional ou prejuízo do sucesso de você engravidar durante este procedimento de reprodução assistida seria utilizar os oócitos que não amadureceram o suficiente para serem inseminados (denominados oócitos imaturos) e os oócitos excedentes ao limite de 7 para fertilização estabelecido pelo Departamento de Reprodução Humana que, portanto, serão descartados, não sendo úteis para o seu tratamento. Estes oócitos serão usados para estudar a presença de fatores de crescimento, como BMP15 e GDF9, permitindo que seja avaliada a presença ou ausência dessas substâncias no desenvolvimento dos seus oócitos. Devemos, portanto, ressaltar que este estudo e a doação dos seus oócitos não vão interferir no seu tratamento para engravidar, assim como não causarão prejuízo algum para a sua saúde, nem para a do futuro bebê.

Sua colaboração, portanto, na doação de seus oócitos será imprescindível para um melhor esclarecimento da qualidade dos oócitos de pacientes com dificuldade para engravidar e para levar uma gravidez adiante devido a Síndrome dos Ovários Policísticos. Este conhecimento no futuro poderá ser usado no sentido de propiciar um tratamento mais eficaz da infertilidade associada à Síndrome dos Ovários Policísticos. É importante ressaltarmos que este estudo não trará nenhuma despesa para você e seu companheiro. Todos os oócitos doados serão utilizados exclusivamente para a avaliação da expressão dos fatores BMP15 e GDF9 e não para outros fins que não a pesquisa. Não será necessário nenhum tipo de procedimento

extra, como coleta de sangue, ultrassonografia, ou qualquer outro tipo de exame além dos habituais para o procedimento de reprodução assistida, que o casal já irá realizar.

Informações adicionais: Todas as dúvidas com relação ao estudo que possam ocorrer durante o tratamento para engravidar, serão prontamente esclarecidas pelos pesquisadores responsáveis por este estudo. Você e seu companheiro têm a liberdade de retirar o vosso consentimento e de deixar de participar do estudo a qualquer momento sem que isso traga qualquer prejuízo à continuidade do seu tratamento. Asseguramos total sigilo em relação aos nomes dos integrantes deste estudo e garantimos ainda que será mantido o caráter confidencial de todas as informações relacionadas à vossa privacidade. Temos o compromisso de que serão prestadas informações atualizadas durante todo o estudo, ainda que isto possa afetar a vossa vontade de continuar participando. Asseguramos o compromisso de que você será devidamente acompanhada e assistida durante todo o período de participação neste projeto, bem como de que será garantida a continuidade do seu tratamento, após a conclusão dos trabalhos de pesquisa. Caso ocorra algum tipo de intercorrência, você e seu marido serão prontamente assistidos pelos responsáveis desta pesquisa, assim como toda a equipe do programa de fertilização assistida. Nos casos de dúvida em relação à pesquisa, vocês poderão procurar o CEP (Comitê de Ética e Pesquisa) – HC e FMRP-USP – Campus Universitário, situado no endereço: Av. dos Bandeirantes, 3900 – Monte Alegre, 14048-900 Ribeirão Preto – Fone: (16) 3602-2228. No caso se interesse pelos resultados da pesquisa, poderá entrar em contato com as pesquisadoras responsáveis, pelo telefone (16) 3602-2815, no Lab. de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

Eu, _____; RG nº _____, abaixo assinado, declaro que fui informado e estou inteiramente de acordo com o exposto acima e aceito livremente participar do estudo em questão, doando os oócitos que não serão utilizados em meu tratamento de infertilidade e autorizo os pesquisadores abaixo mencionados a utilizá-los para a pesquisa: “Expressão dos fatores proteína óssea morfogenética-15 (BMP15) e fator de crescimento e diferenciação-9 (GDF9) nos oócitos e células luteinizadas de mulheres normais e com Síndrome dos Ovários Policísticos.”

Ribeirão Preto, ____/____/____

Assinatura da Paciente

Pesquisadores Responsáveis:

Prof. Dra. Rosana Maria dos Reis
CRM: 61726

PG Luciana O. Teixeira de Resende
CRBM: 2274

Departamento de Ginecologia e Obstetrícia
Av. dos Bandeirantes, nº 3900 Tel.: (16) 3602-2815
Hospital das Clínicas - FMRP/USP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO **Grupo SOP**

1. **Nome da Pesquisa:** Expressão do fator de crescimento e diferenciação-9 (GDF9) e da proteína óssea morfogenética-15 (BMP15) em oócitos humanos e seus receptores nas células da granulosa luteinizadas de mulheres normais e com síndrome dos ovários policísticos.
2. **Pesquisador Responsável:** Prof. Dra. Rosana Maria dos Reis

Você e seu marido estão sendo convidados a participar da pesquisa “Expressão do fator de crescimento e diferenciação-9 (GDF9) e da proteína óssea morfogenética-15 (BMP15) em oócitos humanos e seus receptores nas células da granulosa luteinizadas de mulheres normais e com síndrome dos ovários policísticos.”

Esclarecimentos: A Síndrome dos Ovários Policísticos é uma causa bastante comum de irregularidade menstrual e de dificuldade para engravidar (denominada infertilidade). Questiona-se um dos motivos responsáveis tanto pela maior dificuldade em engravidar, como pela chance aumentada de abortamento nas mulheres portadoras desta síndrome, seja a inadequada qualidade dos oócitos (células femininas responsáveis pela reprodução), que poderão produzir embriões de má qualidade. Contudo, na atualidade, não se realiza a avaliação adequada da qualidade dos oócitos devido à ausência de métodos bem estabelecidos capazes de prever se os oócitos são bons ou não. A identificação da presença de alterações nos oócitos de pacientes portadoras desta síndrome e de outras causas de infertilidade, não somente ajudaria a elucidar o mecanismo causador da infertilidade e da maior chance de abortamento, como também abriria perspectivas futuras de tratamento para este grupo de pacientes. Os fatores de crescimento que serão estudados nesta pesquisa, são substâncias produzidas pelos oócitos e estão relacionados com a função normal dos ovários para produzir oócitos de boa qualidade. Por isso, é muito importante que nós tenhamos um grupo de pacientes que não têm a doença (que seriam pacientes do grupo controle) para que possamos comparar a diferença desses fatores com as pacientes que têm essa síndrome.

Uma forma indireta de avaliarmos a qualidade dos seus oócitos, sem lhe causar qualquer risco adicional ou prejuízo do sucesso de você engravidar durante este procedimento de reprodução assistida seria utilizar os oócitos que não amadureceram o suficiente para serem inseminados (denominados oócitos imaturos) e os oócitos excedentes ao limite de 7 para fertilização estabelecido pelo Departamento de Reprodução Humana que, portanto, serão descartados, não sendo úteis para o seu tratamento. Estes oócitos serão usados para estudar a presença de fatores de crescimento, como BMP15 e GDF9, permitindo que seja avaliada a presença ou ausência dessas substâncias no desenvolvimento dos seus oócitos. Devemos, portanto, ressaltar que este estudo e a doação dos seus oócitos não vão interferir no seu tratamento para engravidar, assim como não causarão prejuízo algum para a sua saúde, nem para a do futuro bebê.

Sua colaboração, portanto, na doação de seus oócitos será imprescindível para um melhor esclarecimento da qualidade dos oócitos de pacientes com dificuldade para engravidar e para levar uma gravidez adiante devido a Síndrome dos Ovários Policísticos. Este conhecimento no futuro poderá ser usado no sentido de propiciar um tratamento mais eficaz da infertilidade associada à Síndrome dos Ovários Policísticos. É importante ressaltarmos que este estudo não trará nenhuma despesa para você e seu companheiro. Todos os oócitos doados serão utilizados exclusivamente para a avaliação da expressão dos fatores BMP15 e GDF9 e não para outros fins

que não a pesquisa. Não será necessário nenhum tipo de procedimento extra, como coleta de sangue, ultrassonografia, ou qualquer outro tipo de exame além dos habituais para o procedimento de reprodução assistida, que o casal já irá realizar.

Informações adicionais: Todas as dúvidas com relação ao estudo que possam ocorrer durante o tratamento para engravidar, serão prontamente esclarecidas pelos pesquisadores responsáveis por este estudo. Você e seu companheiro têm a liberdade de retirar o vosso consentimento e de deixar de participar do estudo a qualquer momento sem que isso traga qualquer prejuízo à continuidade do seu tratamento. Asseguramos total sigilo em relação aos nomes dos integrantes deste estudo e garantimos ainda que será mantido o caráter confidencial de todas as informações relacionadas à vossa privacidade. Temos o compromisso de que serão prestadas informações atualizadas durante todo o estudo, ainda que isto possa afetar a vossa vontade de continuar participando. Asseguramos o compromisso de que você será devidamente acompanhada e assistida durante todo o período de participação neste projeto, bem como de que será garantida a continuidade do seu tratamento, após a conclusão dos trabalhos de pesquisa. Caso ocorra algum tipo de intercorrência, você e seu marido serão prontamente assistidos pelos responsáveis desta pesquisa, assim como toda a equipe do programa de fertilização assistida. Nos casos de dúvida em relação à pesquisa, vocês poderão procurar o CEP (Comitê de Ética e Pesquisa) – HC e FMRP-USP – Campus Universitário, situado no endereço: Av. dos Bandeirantes, 3900 – Monte Alegre, 14048-900 Ribeirão Preto – Fone: (16) 3602-2228. No caso se interesse pelos resultados da pesquisa, poderá entrar em contato com as pesquisadoras responsáveis, pelo telefone (16) 3602-2815, no Lab. de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

Eu, _____; RG nº _____, abaixo assinado, declaro que fui informado e estou inteiramente de acordo com o exposto acima e aceito livremente participar do estudo em questão, doando os oócitos que não serão utilizados em meu tratamento de infertilidade e autorizo os pesquisadores abaixo mencionados a utilizá-los para a pesquisa: “Expressão dos fatores proteína óssea morfogenética-15 (BMP15) e fator de crescimento e diferenciação-9 (GDF9) nos oócitos e células luteinizadas de mulheres normais e com Síndrome dos Ovários Policísticos.”

Ribeirão Preto, ____/____/____

Assinatura da Paciente

Pesquisadores Responsáveis:

Profª. Dra. Rosana Maria dos Reis
CRM: 61726

PG Luciana O. Teixeira de Resende
CRBM: 2274

Departamento de Ginecologia e Obstetrícia
Av. dos Bandeirantes, nº 3900 Tel.: (16) 3602-2815
Hospital das Clínicas - FMRP/USP

ANEXO II

PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO DE RNA EM OÓCITOS HUMANOS INDIVIDUAIS E CÉLULAS DO CUMULUS OOPHORUS DE PACIENTES COM SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS (SOP) SUBMETIDAS ÀS TÉCNICAS DE FERTILIZAÇÃO ASSISTIDA NO SETOR DE REPRODUÇÃO HUMANA – HCFMRP/USP

Padronização da Técnica utilizando oócitos ovários bovinos

Embora as técnicas de extração de RNA por meio de diferentes protocolos e kits sejam rotineiras em alguns laboratórios, a técnica de extração de RNA total de pequenas amostras torna-se um pouco mais complexa devido ao pequeno conteúdo de ácido ribonucleico por célula. Dessa forma, antes de iniciar a extração de RNA de um grande número de amostras de oócitos e células do cumulus já coletadas das pacientes submetidas aos procedimentos de RA, padronizamos a técnica de extração de RNA total de célula única utilizando células do cumulus e oócitos bovinos. O bovino foi utilizado como modelo experimental, devido à facilidade de obtenção dos ovários, estrutura disponível no laboratório de GO para a aspiração folicular e manipulação de oócitos bovinos, à similaridade entre tamanho, morfologia e conteúdo de RNA entre oócitos bovinos e humanos e para evitar a utilização de material humano em testes de padronização.

A partir da verificação de diferentes protocolos de extração (com ou sem kit), estabelecemos um protocolo utilizando o kit RNeasy Micro (Qiagen), após testar diferentes volumes de soluções indicados no kit.

1- Colheita e manipulação dos ovários para a aspiração folicular e obtenção dos oócitos

Imediatamente após o abate, os ovários foram removidos e imersos em solução fisiológica a 35-37° C, acrescida de penicilina e estreptomicina (SIRARD & BILODEAU, 1990). Posteriormente, foram levados ao laboratório, lavados em solução fisiológica pré-aquecida na temperatura de 37° C e mantidos nesta mesma solução, em banho-maria, durante a aspiração dos folículos ovarianos.

2- Aspiração e seleção dos Complexos Cumulus-Oócito (COCs)

Foram selecionados folículos apresentando entre 2 e 8 mm de diâmetro, boa vascularização e coloração do fluido folicular. A aspiração dos oócitos foi realizada com agulhas 25x7, adaptadas em seringas de 20 mililitros. Ao serem puncionados os folículos, o fluido folicular foi, imediatamente, aspirado e depositado em cálice cônico mantido à temperatura de 38-39° C. Após a decantação por 10 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspendido com meio Talp-Hepes e transferido para placa de Petri mantida em placa aquecedora na temperatura de 38° C.

Os complexos cumulus-oócitos selecionados foram lavados em meio Talp-Hepes, por meio do transporte destes para uma nova placa de Petri contendo o mesmo meio, com auxílio de micropipeta em microscópio estereoscópio. Em seguida, os oócitos foram lavados novamente em placa de vidro escavada contendo a solução de lavagem e o cumulus oophorus de cada oócito foi microdissecado e as células do cumulus remanescentes foram removidas utilizando-se hialuronidase por meio de agitação mecânica em vórtex durante 5 minutos. Os oócitos desnudos foram lavados novamente e congelados individualmente em criotubos contendo 1µl do meio TALP-Hepes. Os criotubos foram submergidos em nitrogênio líquido e depois armazenados em freezer a -80°C. As amostras foram processadas para a avaliação da expressão dos genes BMP15 e GDF9 de acordo com as técnicas descritas a seguir.

Tabela 1. Amostras e diferentes testes para a extração de RNA em oócitos e complexos cumulus-oócito bovinos.

Amostra	Material congelado	Volume meio criotubo	Método de homogeneização	Volume de RLT e etanol 70%
1	01 oócito	1 µl	vórtex	75 µl
2	01 oócito	1 µl	vórtex	75 µl
3	01 oócito	1 µl	pipetagem	75 µl
4	01 oócito	2 µl	pipetagem	75 µl
5	01 oócito	2 µl	pipetagem	75 µl
6	02 oócitos	1 µl	vórtex	75 µl
7	02 oócitos	1 µl	pipetagem	75 µl
8	04 oócitos	1 µl	pipetagem	75 µl
9	01 COC	1 µl	vórtex	350 µl
10	01 COC	1 µl	pipetagem	350 µl
11	01 COC EX	1 µl	pipetagem	350 µl
12	01 cumulus	1 µl	pipetagem	350 µl

Legenda: oócito = oócito desnudo mecanicamente; COC = complexo cumulus-oócito intacto; COC EX = complexo cumulus-oócito intacto; cumulus = complexo cumulus-oócito ocitectomizado.

Foi testado um total de 12 amostras, as quais consistiram em 1, 2 ou 4 oócitos por criotubo, 1 complexo cumulus-oócito (expandido ou não) e 1 cumulus oophorus (complexo ocitectomizado), por criotubo. Foram testados também diferentes volumes de meio (1 ou 2 microlitros) para o congelamento em nitrogênio líquido e das soluções RLT e etanol a 70% (75 ou 350 microlitros) para as etapas de lise das células e homogeneização. A solução RLT tem como função lisar a célula para expor o RNA. O etanol 70% é utilizado para homegeneização. As duas soluções são utilizadas sempre na mesma quantidade.

3 – Extração de RNA (RNEASY MICRO KIT – QIAGEN)

4 - Procedimentos:

- Foi preparado etanol 80%, misturando 24 ml de etanol (96-100%) e 6 ml de água RNase-free (presente no kit).
- Adicionou-se 10 µl β-Mercaptoetanol (β-ME) a 1 ml do tampão RLT a um tubo de 1,5 ml.
- Adicionou-se 4 volumes de etanol (96-100%) como indicado no frasco do tampão RPE.
- Prepararou-se a solução estoque de DNase1 utilizando DNase livre de RNase pela primeira vez. Dissolveu-se a DNase1 sólida em Água RNase-free (550 µl). Adicionou-se 5 µl de poly-A dissolvido em 34 µl de RLT (tubo 0,2ml) misturando por pipetagem.

Utilizou-se 6 μ l desta mistura para misturar com 54 μ l de RLT(tubo 0,2ml). A concentração final é de 4 ng/ μ l. Utilizou-se 5 μ l por amostra.

- As células foram lisadas pela adição de 350 μ l de RLT (c/ β -ME) no criotubo. Vortexou-se por 1 min cada tubo para homogeneizar.
- Adicionou-se 1 volume de etanol 70% (350 μ l) ao lisado homogeneizado, e misturou-se pipetando.
- Em seguida, transferiu-se a amostra para uma coluna de sílica “MinElute Spin Column” em um tubo de coleta 2ml. Centrifugou-se por 15s a $\geq 8000 \times g$ (≥ 10000 rpm). Após centrifugação, descartou-se o conteúdo do tubo de coleta. Imediatamente, a coluna foi recolocada no tubo de coleta e adicionado 350 μ l de RW1 e centrifugada por 15s a $\geq 8000 \times g$ para lavar a coluna.
- Em seguida, o conteúdo do tubo de coleta foi descartado e adicionado 10 μ l de DNase 1 estoque (stock) a 70 μ l de RDD (tubo 0,2ml). Misturou-se pipetando gentilmente invertendo o tubo, sem vortexar.
- Foi pipetado o mix de incubação DNase1 (80 μ l) diretamente sobre a membrana de sílica-gel MinElute colocado no tubo de coleta e os tubos permaneceram à temperatura ambiente por 15min.
- Adicionou-se 350 μ l de RW1 na SpinColumn centrifugando-se em seguida por 15s a $\geq 8000 \times g$ para lavar a coluna. Após centrifugação foi descartado o conteúdo e o tubo de coleta.
- Em seguida, transferiu-se a SpinColumn para um novo tubo de coleta (2ml), adicionou-se 500 μ l de RPE à coluna e procedeu-se à centrifugação por 15s a $\geq 8000 \times g$ para lavar a coluna. O conteúdo do tubo de coleta foi novamente descartado.
- Adicionou-se 500 μ l de etanol 80% à SpinColumn, fechando o tubo gentilmente e centrifugando por 2 min a $\geq 8000 \times g$ para secar a membrana de sílica-gel. Descartou-se o conteúdo e o tubo de coleta.
- A SpinColumn foi transferida para um novo tubo de coleta (2ml), onde a tampa da SpinColumn permaneceu aberta durante a centrifugação por 5min na maior velocidade para secagem da membrana. Descartou-se o conteúdo e o tubo de coleta.
- Para eluição, transferiu-se a SpinColumn para um novo tubo de coleta (1,5ml) e pipetou-se 14 μ l de água RNase-free diretamente no centro da membrana de sílica-gel. O tubo foi fechado gentilmente e centrifugado por 1 min na velocidade máxima para eluir obtendo-se um volume final foi de 12 μ l, conforme indicado no kit.

Após a extração do RNA, todas as amostras foram congeladas e estocadas à -80°C . Para testar a qualidade das amostras, uma vez que a quantidade de RNA obtida não permitiu a quantificação e nem a sua verificação em gel de agarose, foi realizada a síntese de cDNA com todo o volume do RNA obtido, seguido por PCR, utilizando-se 3 μl do cDNA.

5 - Síntese de cDNA

Foi realizada com o kit High Capacity da Applied Biosystems, de acordo com as instruções do fabricante, brevemente expostas a seguir:

- tampão da transcriptase: 2,0 μl
- dntps: 1,0 μl
- random primers: 2,5 μl
- multiscribe: 1,25 μl
- RNAinhibitor: 0,63 μl
- RNA Total: 16,0 μl

Os tubos de reação foram mantidos por 10' à temperatura ambiente e por 120' à 37°C . e logo em seguida congelados à -20°C .

6 - Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para testar a síntese de cDNA e, portanto do RNA extraído, utilizamos o primer do gene β -gus, um controle endógeno largamente utilizado para diversos tipos celulares e disponível no laboratório. Além disso, testamos os primers de duas empresas diferentes (Invitrogen e MGW), bem como duas Taqs polimerases diferentes: Platinum (da Invitrogen) e Taq polimerase (da Biotools).

Seqüência do primers Gus F: gaaaatatgtggttgagagctcatt

Gus R: ccgagtgaagatccccttttta

As condições da PCR foram de 1 ciclo inicial de 94°C por 1 minuto, 61°C por 1 minuto e 72°C por um minuto, seguidos de 40 ciclos de 94°C (30 sec), 61° (45 sec) e 72°C (30 sec) e, finalmente 72°C por 7 minutos.

O produto de PCR, de 100 pb foi visualizado em gel de agarose, exposto a seguir.

7 - Eletroforese

Foi preparado gel de agarose 2% em TBE, corado com brometo de etídeo e a eletroforese foi corrida por 30 minutos à 100 V. Após a corrida, o gel foi visualizado em transiluminador com luz UV (MiniBis DNR PRO) e fotografado

Dos diferentes primers e taqs testados durante a padronização, chegamos à conclusão de que o melhor primer foi o da INVITROGEN e ambas as taqs obtiveram resultado positivo, embora a Platinum tenha se apresentado mais eficiente..

8 - Resultados:

O RNA extraído de todas as amostras testadas (exceto as amostras 5, 7 e 11), independente dos volumes de meio de congelamento e soluções de lise e homogeneização utilizadas (tabela 1), se mostrou adequado para a utilização na síntese de cDNA e RT-PCR, como mostrado na figura 1. Os resultados obtidos validam a técnica de extração de RNA utilizando o kit RNeasy Micro para a extração de RNA de oócito único. O conteúdo total de RNA em um oócito bovino é estimado entre 2 and 3 ng¹, em humanos entre 2 e 5 ng¹, não diferindo substancialmente do conteúdo de RNA observado em oócitos humanos. Da mesma forma, o diâmetro do complexo-cumulus oócito, incluindo a quantidade de células da granulosa do cumulus, aproximadamente de 3.000 a 20.000 células, é similar entre as duas espécies.

A não detecção do RNA nas amostras 5, 7 e 11 ocorreu devido à abertura dos tubos durante a centrifugação para obtenção do eluído, o que foi devidamente registrado durante a realização do teste de extração.

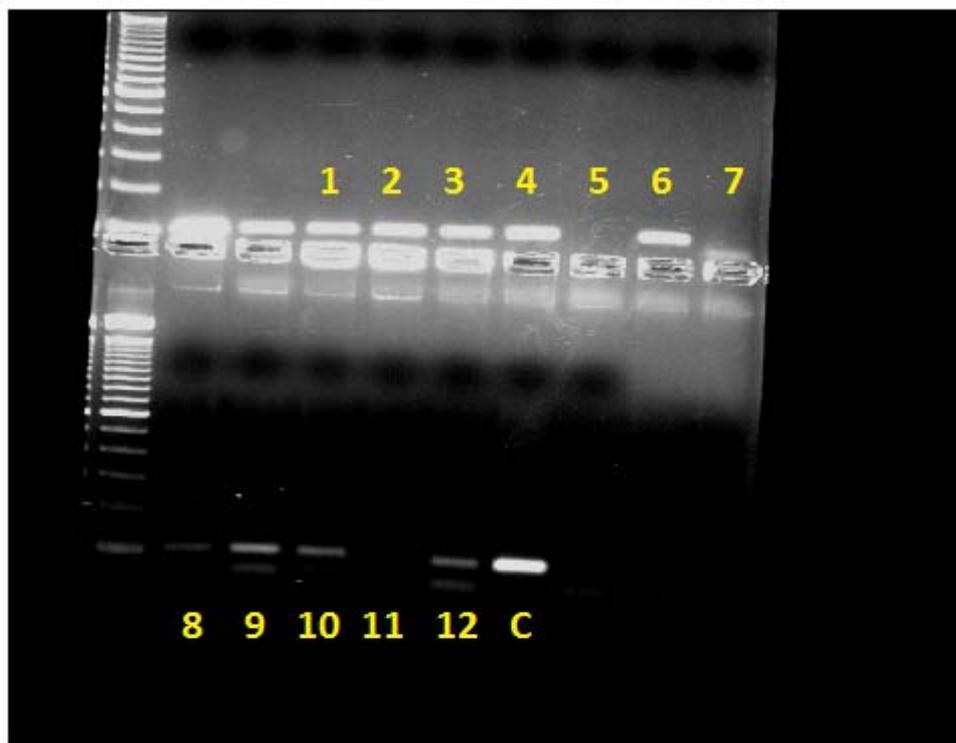


Figura 1: Resultado da eletroforese em gel de agarose das amostras de oócitos e células da granulosa de bovinos. Amostras não numeradas: rotina do laboratório de Biologia Molecular; 1 – 8 = oócitos 9 e 10 = COC, 11 = COC expandido, 12 = cumulus (tabela 1); C = controle.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

¹Lequarre, A. S., Traverso, J. M., Marchandise, J., Donnay, I. Poly(A) RNA is reduced by half during **bovine oocyte** maturation but increases when meiotic arrest is maintained with CDK inhibitors. Biol Reprod, 2004 (Vol. 71) (No. 2) 425-431

ANEXO III

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:
- $\Delta Ct = Ct (BMP15/GDF9/BMPR2) - Ct \beta\text{-actina}$
- $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ amostra de interesse} - \Delta Ct \text{ das amostras de referência}$
- $2^{-\Delta\Delta Ct}$ = fórmula utilizada para quantificação da expressão relativa dos genes *BMP15*, *GDF9* e *BMPR2* em relação ao gene da β -actina, usando como amostra de referência os oócitos e células da granulosa do grupo controle.

Tabela 1: Níveis de Ct (threshold cycle) comparativos entre os genes BMP15 e β -actina obtidos por PCR em tempo real, para análise da expressão gênica em oócitos de mulheres com SOP submetidas a HOC para tratamento de FIV

Amostra	Ct comparativo			β -actina	Média	Desvio Padrão	Δ Ct	Desvio Padrão	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}
	BMP15	Média	Desvio Padrão							
1	31,458 31,293	31,376	0,117	31,254 31,388	31,321	0,095	0,054	0,0113	0,0545	0,9629
2	30,398 30,352	30,375	0,033	29,211 29,636	29,424	0,301	0,952	0,0457	0,9515	0,5171
3	33,348 33,505	33,427	0,111	30,022 30,528	30,275	0,358	3,152	0,0702	3,1515	0,1125
4	32,254 32,033	32,144	0,156	28,647 29,013	28,830	0,259	3,314	0,0457	3,3135	0,1006
5	31,601 31,221	31,411	0,269	28,378 28,483	28,431	0,074	2,981	0,0389	2,9805	0,1267
6	33,054 32,062	32,558	0,701	28,47 28,465	28,468	0,004	4,091	0,2460	4,0905	0,0587
7	30,276 29,85	30,063	0,301	33,572 33,564	33,568	0,006	-3,505	0,0454	-3,5050	11,3530
8	29,449 29,069	29,259	0,269	31,03 31,533	31,282	0,356	-2,023	0,0994	-2,0225	4,0629
9	27,717 27,731	27,724	0,010	31,338 30,728	31,033	0,431	-3,309	0,0931	-3,3090	9,9108
10	28,113 28,437	28,275	0,229	30,028 30,477	30,253	0,317	-1,978	0,0766	-1,9775	3,9381
11	30,2 30,024	30,112	0,124	29,452 29,53	29,491	0,055	0,621	0,0093	0,6210	0,6502
12	29,415 29,338	29,377	0,054	34,658 35,364	35,011	0,499	-5,635	0,1261	-5,6345	49,6768

13	26,823 26,896	26,860	0,052	32,358 32,346	32,352	0,008	-5,493	0,0014	-5,4925	45,0202
14	27,421 27,356	27,389	0,046	33,415 33,046	33,231	0,261	-5,842	0,0351	-5,8420	57,3611
15	29,143 29,126	29,135	0,012	33,239 33,145	33,192	0,066	-4,058	0,0023	-4,0575	16,6506
16	28,312 28,242	28,277	0,049	31,816 32,031	31,924	0,152	-3,647	0,0128	-3,6465	12,5229
17	30,37 30,473	30,422	0,073	34,345 34,978	34,662	0,448	-4,240	0,1028	-4,2400	18,8959
18	30,41 30,378	30,394	0,023	32,829 33,652	33,241	0,582	-2,847	0,1696	-2,8465	7,1925
Amostra de Referência		30,44	0,222		31,278	0,276	-0,891	0,104	0,112	2,243

Tabela 2: Níveis de Ct (threshold cycle) comparativos entre os genes BMP15 e β -actina obtidos por PCR em tempo real, para análise da expressão gênica em oócitos de mulheres controles submetidas a HOC para tratamento de FIV

Ct comparativo										
Amostra	BMP15	Média	Desvio Padrão	β -actina	Média	Desvio Padrão	Δ Ct	Desvio Padrão	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}
1	29,245 29,211	29,228	0,024042	28,235 28,158	28,1965	0,054447	1,0315	0,001771	1,0315	0,489201
2	32,774 32,128	32,451	0,456791	28,74 29,207	28,9735	0,330219	3,4775	0,158851	3,4775	0,089778
3	30,615 29,487	30,051	0,797616	28,142 27,731	27,9365	0,290621	2,1145	0,360326	2,1145	0,230926
4	32,517 32,124	32,3205	0,277893	28,835 28,568	28,7015	0,188798	3,619	0,056434	3,619	0,08139
5	29,706 29,402	29,554	0,21496	29,594 29,621	29,6075	0,019092	-0,0535	0,023286	-0,0535	1,03778
6	32,271 31,983	32,127	0,203647	29,978 30,33	30,154	0,248902	1,973	0,051712	1,973	0,254723
7	31,788 31,622	31,705	0,11738	32,692 33,154	32,923	0,326683	-1,218	0,06025	-1,218	2,32624
8	30,258 30,078	30,168	0,127279	27,187 27,344	27,2655	0,111016	2,9025	0,014262	2,9025	0,13374
9	31,058 31,228	31,143	0,120208	31,071 31,055	31,063	0,011314	0,08	0,007289	0,08	0,946058
10	29,801 30,299	30,05	0,352139	28,746 28,707	28,7265	0,027577	1,3235	0,062381	1,3235	0,399564
11	30,877 29,707	30,292	0,827315	29,532 30,461	29,9965	0,656902	0,2955	0,557985	0,2955	0,81479
12	28,465 27,499	27,982	0,683065	29,359 29,426	29,3925	0,047376	-1,4105	0,234411	-1,4105	2,658293

13	28,477 28,191	28,334	0,202233	28,089 28,22	28,1545	0,092631	0,1795	0,024739	0,1795	0,883009
14	30,569 30,731	30,65	0,114551	28,215 28,561	28,388	0,244659	2,262	0,03649	2,262	0,208483
15	29,678 29,781	29,7295	0,072832	29,23 29,594	29,412	0,257387	0,3175	0,035776	0,3175	0,802459
16	29,578 29,137	29,3575	0,311834	29,117 30,073	29,595	0,675994	-0,2375	0,277104	-0,2375	1,178948
17	29,868 30,283	30,0755	0,293449	33,038 32,885	32,9615	0,108187	-2,886	0,048909	-2,886	7,392181
18	29,071 29,115	29,093	0,031113	32,804 33,876	33,34	0,758018	-4,247	0,28778	-4,247	18,98779
19	31,309 31,161	31,235	0,104652	32,425 32,616	32,5205	0,135057	-1,2855	0,014596	-1,2855	2,437665
20	30,974 31,196	31,085	0,156978	32,074 31,152	31,613	0,651952	-0,528	0,224842	-0,528	1,441929
21	Undet. Undet.	0	0	36,887 36,491	36,689	0,280014	0	0	0	0
22	31,389 31,243	31,316	0,103238	31,038 30,213	30,6255	0,583363	0,6905	0,175485	0,6905	0,619639
23	28,916 29,159	29,0375	0,171827	32,008 32,544	32,276	0,379009	-3,2385	0,086586	-3,2385	9,438123
24	30,165 30,028	30,0965	0,096874	31,459 31,48	31,4695	0,014849	-1,373	0,004803	-1,373	2,590086
25	30,472 30,22	30,346	0,178191	29,614 30,189	29,9015	0,406586	0,4445	0,098532	0,4445	0,734839
26	31,283 31,992	31,6375	0,501339	31,008 30,636	30,822	0,263044	0,8155	0,160266	0,8155	0,568212
27	31,495 32,161	31,828	0,470933	32,669 33,286	32,9775	0,436285	-1,1495	0,206061	-1,1495	2,21837

28	32,93 32,736	32,833	0,137179	31,466 31,44	31,453	0,018385	1,38	0,009578	1,38	0,384219
29	29,903 29,561	29,732	0,241831	31,051 31,274	31,1625	0,157685	-1,4305	0,041673	-1,4305	2,695401
30	30,372 30,15	30,261	0,156978	33,028 32,447	32,7375	0,410829	-2,4765	0,096711	-2,4765	5,565456
31	32,018 32,604	32,311	0,414365	34,249 35,045	34,647	0,562857	-2,336	0,244253	-2,336	5,049008
32	31,588 31,126	31,357	0,326683	32,734 32,491	32,6125	0,171827	-1,2555	0,068123	-1,2555	2,387499
33	30,942 30,418	30,68	0,370524	32,542 32,29	32,416	0,178191	-1,736	0,08452	-1,736	3,331103
34	27,67 27,567	27,6185	0,072832	30,461 30,658	30,5595	0,1393	-2,941	0,012355	-2,941	7,679434
35	30,781 30,432	30,6065	0,24678	33,137 33,281	33,209	0,101823	-2,6025	0,035634	-2,6025	6,073382
36	32,216 32,141	32,1785	0,053033	32,872 33,572	33,222	0,494975	-1,0435	0,123906	-1,0435	2,061222
37	29,536 29,505	29,5205	0,02192	33,233 33,778	33,5055	0,385373	-3,985	0,074496	-3,985	15,83451
38	29,362 29,365	29,3635	0,002121	30,099 30,542	30,3205	0,313248	-0,957	0,049064	-0,957	1,941269
39	29,065 29,173	29,119	0,076368	33,76 34,032	33,896	0,192333	-4,777	0,021412	-4,777	27,41702
40	30,034 29,918	29,976	0,082024	31,69 31,815	31,7525	0,088388	-1,7765	0,00727	-1,7765	3,42594
41	28,849 28,485	28,667	0,257387	33,276 33,012	33,144	0,186676	-4,477	0,050548	-4,477	22,26954
42	28,382 28,63	28,506	0,175362	29,53 29,554	29,542	0,016971	-1,036	0,01552	-1,036	2,050534

43	29,701 29,306	29,5035	0,279307	32,819 33,164	32,9915	0,243952	-3,488	0,068762	-3,488	11,21999
44	29,572 29,933	29,7525	0,255266	30,709 30,698	30,7035	0,007778	-0,951	0,032611	-0,951	1,933212
45	30,249 30,201	30,225	0,033941	34,33 34,002	34,166	0,231931	-3,941	0,027472	-3,941	15,35887
46	31,918 32,194	32,056	0,195161	34,37 33,668	34,019	0,496389	-1,963	0,142245	-1,963	3,898719
47	29,548 29,612	29,58	0,045255	33,498 32,411	32,9545	0,768625	-3,3745	0,296416	-3,3745	10,37112
48	33,437 33,448	33,4425	0,007778	34,419 33,699	34,059	0,509117	-0,6165	0,12963	-0,6165	1,533151
Amostra de referência		30,44	0,222		31,278	0,276	-0,891	0,104	0,112	2,243

Tabela 3: Níveis de Ct (threshold cycle) comparativos entre os genes GDF9 e β -actina obtidos por PCR em tempo real, para análise da expressão gênica em oócitos de mulheres com SOP submetidas a HOC para tratamento de FIV.

Amostra	Ct comparativo			β -actina	Média	Desvio Padrão	Δ Ct	Desvio Padrão	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}
	GDF9	Média	Desvio Padrão							
1	30,42 30,91	30,665	0,346	31,254 31,388	31,321	0,095	-0,656	0,0645	-0,6560	1,5757
2	28,478 28,413	28,446	0,046	29,211 29,636	29,424	0,301	-0,978	0,0462	-0,9780	1,9697
3	29,749 29,508	29,629	0,170	30,022 30,528	30,275	0,358	-0,647	0,0785	-0,6465	1,5654
4	28,184 28,042	28,113	0,100	28,647 29,013	28,830	0,259	-0,717	0,0385	-0,7170	1,6438
5	27,998 27,821	27,910	0,125	28,378 28,483	28,431	0,074	-0,521	0,0106	-0,5210	1,4349
6	27,94 28,496	28,218	0,393	28,47 28,465	28,468	0,004	-0,250	0,0773	-0,2495	1,1888
7	30,017 30,47	30,244	0,320	33,572 33,564	33,568	0,006	-3,325	0,0513	-3,3245	10,0178
8	29,244 28,798	29,021	0,315	31,03 31,533	31,282	0,356	-2,261	0,1130	-2,2605	4,7916
9	28,01 27,751	27,881	0,183	31,338 30,728	31,033	0,431	-3,153	0,1098	-3,1525	8,8920
10	28,018 27,948	27,983	0,049	30,028 30,477	30,253	0,317	-2,270	0,0516	-2,2695	4,8216
11	29,621 29,566	29,594	0,039	29,452 29,53	29,491	0,055	0,102	0,0023	0,1025	0,9314
12	29,537 29,533	29,535	0,003	34,658 35,364	35,011	0,499	-5,476	0,1246	-5,4760	44,5082

13	27,409 27,705	27,557	0,209	32,358 32,346	32,352	0,008	-4,795	0,0219	-4,7950	27,7612
14	28,18 28,083	28,132	0,069	33,415 33,046	33,231	0,261	-5,099	0,0364	-5,0990	34,2730
15	29,603 29,59	29,597	0,009	33,239 33,145	33,192	0,066	-3,596	0,0023	-3,5955	12,0880
16	28,995 29,113	29,054	0,083	31,816 32,031	31,924	0,152	-2,870	0,0150	-2,8695	7,3081
17	30,965 30,914	30,940	0,036	34,345 34,978	34,662	0,448	-3,722	0,1008	-3,7220	13,1957
18	30,456 30,767	30,612	0,220	32,829 33,652	33,241	0,582	-2,629	0,1935	-2,6290	6,1860
Amostra de referência		29,437	0,165		31,278	0,276	-1,84	0,083	0,112	1,663

Tabela 4: Níveis de Ct (threshold cycle) comparativos entre os genes GDF9 e β -actina obtidos por PCR em tempo real, para análise da expressão gênica em oócitos de mulheres controles submetidas a HOC para tratamento de FIV

Amostra	Ct comparativo			β -actina	Média	Desvio Padrão	Δ Ct	Desvio Padrão	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}
	GDF9	Média	Desvio Padrão							
1	28,035 28,101	28,068	0,047	28,235 28,158	28,197	0,054	-0,129	0,0026	-0,1285	1,0932
2	28,559 28,65	28,605	0,064	28,74 29,207	28,974	0,330	-0,369	0,0566	-0,3690	1,2915
3	27,382 27,282	27,332	0,071	28,142 27,731	27,937	0,291	-0,605	0,0447	-0,6045	1,5205
4	27,807 27,941	27,874	0,095	28,835 28,568	28,702	0,189	-0,828	0,0223	-0,8275	1,7746
5	29,462 29,151	29,307	0,220	29,594 29,621	29,608	0,019	-0,301	0,0244	-0,3010	1,2320
6	28,9 29	28,950	0,071	29,978 30,33	30,154	0,249	-1,204	0,0335	-1,2040	2,3038
7	30,438 30,361	30,400	0,054	32,692 33,154	32,923	0,327	-2,524	0,0548	-2,5235	5,7498
8	29,165 29,038	29,102	0,090	27,187 27,344	27,266	0,111	1,836	0,0102	1,8360	0,2801
9	29,842 29,698	29,770	0,102	31,071 31,055	31,063	0,011	-1,293	0,0052	-1,2930	2,4504
10	29,301 29,63	29,466	0,233	28,746 28,707	28,727	0,028	0,739	0,0274	0,7390	0,5992
11	30,035 29,832	29,934	0,144	29,532 30,461	29,997	0,657	-0,063	0,2261	-0,0630	1,0446
12	27,812 27,591	27,702	0,156	29,359 29,426	29,393	0,047	-1,691	0,0133	-1,6910	3,2288

13	27,495	27,479	0,023	28,089	28,155	0,093	-0,676	0,0045	-0,6755	1,5972
	27,463			28,22						
14	29,181	29,057	0,175	28,215	28,388	0,245	0,669	0,0453	0,6690	0,6289
	28,933			28,561						
15	28,28	28,298	0,025	29,23	29,412	0,257	-1,114	0,0334	-1,1140	2,1644
	28,316			29,594						
16	28,53	28,329	0,285	29,117	29,595	0,676	-1,267	0,2691	-1,2665	2,4058
	28,127			30,073						
17	29,14	29,175	0,049	33,038	32,962	0,108	-3,787	0,0070	-3,7870	13,8039
	29,209			32,885						
18	28,623	28,820	0,279	32,804	33,340	0,758	-4,520	0,3261	-4,5200	22,9433
	29,017			33,876						
19	29,613	29,867	0,359	32,425	32,521	0,135	-2,654	0,0734	-2,6540	6,2941
	30,12			32,616						
20	30,141	30,045	0,136	32,074	31,613	0,652	-1,568	0,2217	-1,5680	2,9649
	29,949			31,152						
21	Undet.			36,887	36,689	0,280	-36,689	0,0392	-36,6890	
	Undet.			36,491						
22	29,7	29,806	0,149	31,038	30,626	0,583	-0,820	0,1813	-0,8200	1,7654
	29,911			30,213						
23	28,461	28,488	0,038	32,008	32,276	0,379	-3,788	0,0726	-3,7880	13,8134
	28,515			32,544						
24	29,632	29,491	0,200	31,459	31,470	0,015	-1,979	0,0201	-1,9790	3,9422
	29,349			31,48						
25	28,783	28,752	0,045	29,614	29,902	0,407	-1,150	0,0836	-1,1500	2,2191
	28,72			30,189						
26	29,563	29,930	0,518	31,008	30,822	0,263	-0,893	0,1689	-0,8925	1,8564
	30,296			30,636						
27	29,633	29,564	0,098	32,669	32,978	0,436	-3,414	0,0999	-3,4135	10,6553
	29,495			33,286						

28	30,657 30,621	30,639	0,025	31,466 31,44	31,453	0,018	-0,814	0,0005	-0,8140	1,7581
29	28,407 28,391	28,399	0,011	31,051 31,274	31,163	0,158	-2,764	0,0125	-2,7635	6,7904
30	29,188 29,299	29,244	0,078	33,028 32,447	32,738	0,411	-3,494	0,0875	-3,4940	11,2668
31	33,277 32,907	33,092	0,262	34,249 35,045	34,647	0,563	-1,555	0,1926	-1,5550	2,9383
32	31,414 30,819	31,117	0,421	32,734 32,491	32,613	0,172	-1,496	0,1033	-1,4960	2,8206
33	30,377 30,465	30,421	0,062	32,542 32,29	32,416	0,178	-1,995	0,0178	-1,9950	3,9862
34	28,003 28,323	28,163	0,226	30,461 30,658	30,560	0,139	-2,397	0,0353	-2,3965	5,2652
35	30,164 29,742	29,953	0,298	33,137 33,281	33,209	0,102	-3,256	0,0497	-3,2560	9,5533
36	31,736 31,198	31,467	0,380	32,872 33,572	33,222	0,495	-1,755	0,1949	-1,7550	3,3753
37	29,653 29,425	29,539	0,161	33,233 33,778	33,506	0,385	-3,967	0,0873	-3,9665	15,6328
38	29,523 29,083	29,303	0,311	30,099 30,542	30,321	0,313	-1,018	0,0975	-1,0175	2,0244
39	28,856 29,256	29,056	0,283	33,76 34,032	33,896	0,192	-4,840	0,0585	-4,8400	28,6408
40	30,405 30,048	30,227	0,252	31,69 31,815	31,753	0,088	-1,526	0,0358	-1,5260	2,8799
41	28,29 28,249	28,270	0,029	33,276 33,012	33,144	0,187	-4,875	0,0178	-4,8745	29,3340
42	27,923 28,03	27,977	0,076	29,53 29,554	29,542	0,017	-1,566	0,0030	-1,5655	2,9598

43	29,384 29,075	29,230	0,218	32,819 33,164	32,992	0,244	-3,762	0,0536	-3,7620	13,5667
44	30,357 30,126	30,242	0,163	30,709 30,698	30,704	0,008	-0,462	0,0134	-0,4620	1,3775
45	29,207 29,349	29,278	0,100	34,33 34,002	34,166	0,232	-4,888	0,0319	-4,8880	29,6097
46	32,08 31,897	31,989	0,129	34,37 33,668	34,019	0,496	-2,031	0,1316	-2,0305	4,0855
47	29,198 29,229	29,214	0,022	33,498 32,411	32,955	0,769	-3,741	0,2956	-3,7410	13,3707
48	32,739 33,51	33,125	0,545	34,419 33,699	34,059	0,509	-0,935	0,2782	-0,9345	1,9112
Amostra de referência		29,437	0,166		31,278	0,277	-1,840	0,083	0,112	1,663

Tabela 5: Níveis de Ct (threshold cycle) comparativos entre os genes BMPR2 e β -actina obtidos por PCR em tempo real, para análise da expressão gênica em células da granulosa de mulheres com SOP submetidas a HOC para tratamento de FIV

Amostra	Ct comparativo			β -actina	Média	Desvio Padrão	Δ Ct	Desvio Padrão	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}
	BMPR2	Média	Desvio Padrão							
1	28,293	28,719	0,602	24,274	24,186	0,125	4,533	0,189	4,533	0,0432
	29,144			24,097						
2	30,141	29,942	0,281	26,419	25,993	0,602	3,949	0,221	3,949	0,0647
	29,743			25,567						
3	29,273	29,391	0,166	24,014	23,992	0,031	5,399	0,014	5,399	0,0237
	29,508			23,970						
4	29,250	29,500	0,354	24,380	24,418	0,054	5,082	0,064	5,082	0,0295
	29,750			24,456						
5	26,156	26,131	0,035	18,614	18,596	0,026	7,536	0,001	7,536	0,0054
	26,106			18,577						
6	29,563	29,551	0,018	24,572	24,411	0,228	5,140	0,026	5,140	0,0284
	29,538			24,249						
7	25,378	25,519	0,199	18,875	18,717	0,224	6,803	0,045	6,803	0,0090
	25,660			18,558						
8	26,432	25,983	0,635	19,466	19,298	0,238	6,685	0,230	6,685	0,0097
	25,534			19,130						
9	24,537	24,614	0,108	18,226	18,023	0,287	6,591	0,047	6,591	0,0104
	24,690			17,820						
10	28,026	27,832	0,274	21,341	21,420	0,111	6,413	0,044	6,413	0,0117
	27,638			21,498						
11	27,025	26,721	0,431	19,410	19,647	0,335	7,074	0,149	7,074	0,0074
	26,416			19,884						
12	29,805	29,761	0,063	24,362	24,598	0,334	5,163	0,058	5,163	0,0279
	29,716			24,834						

13	25,236 24,719	24,978	0,366	17,208 17,418	17,313	0,148	7,665	0,078	7,665	0,0049
14	24,258 24,127	24,193	0,093	17,780 18,799	18,290	0,721	5,903	0,264	5,903	0,0167
15	25,039 24,937	24,988	0,072	18,830 18,947	18,889	0,083	6,100	0,006	6,100	0,0146
16	32,349 32,536	32,443	0,132	24,582 25,080	24,831	0,352	7,612	0,071	7,612	0,0051
17	35,242 35,264	35,253	0,016	27,481 27,503	27,492	0,016	7,761	0,000	7,761	0,0046
18	37,193 37,042	37,118	0,107	29,546 28,693	29,120	0,603	7,998	0,188	7,998	0,0039
Amostra de referência		26,622	0,267		22,664	0,234	5,657	0,102	0,485	0,911

Tabela 6: Níveis de Ct (threshold cycle) comparativos entre os genes BMPR2 e β -actina obtidos por PCR em tempo real, para análise da expressão gênica em células da granulosa de mulheres controles submetidas a HOC para tratamento de FIV

Ct comparativo										
Amostra	BMPR2	Média	Desvio Padrão	β -actina	Média	Desvio Padrão	Δ Ct	Desvio Padrão	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}
1	Undet.	0	0	33,179	33,201	0,030	-33,201	0,0005	-33,2005	0
	Undet.			33,222						
2	Undet.	0	0	31,446	31,372	0,105	-31,372	0,0055	-31,3720	0
	Undet.			31,298						
3	34,575	34,734	0,224	29,189	29,320	0,185	5,414	0,0422	5,4140	0,0235
	34,892			29,45						
4	35,574	35,372	0,286	30,783	30,565	0,308	4,807	0,0885	4,8065	0,0357
	35,169			30,347						
5	33,182	33,339	0,222	26,966	27,236	0,381	6,104	0,0973	6,1035	0,0145
	33,496			27,505						
6	27,962	27,920	0,059	23,414	23,866	0,639	4,055	0,2056	4,0545	0,0602
	27,878			24,317						
7	36,058	35,868	0,269	29,867	29,528	0,479	6,340	0,1510	6,3400	0,0123
	35,678			29,189						
8	32,001	31,533	0,662	27,276	27,556	0,395	3,978	0,2971	3,9775	0,0635
	31,065			27,835						
9	26,387	26,531	0,204	21,123	21,399	0,390	5,132	0,0969	5,1320	0,0285
	26,675			21,675						
10	30,375	29,895	0,679	24,261	23,720	0,765	6,175	0,5231	6,1750	0,0138
	29,415			23,179						
11	31,713	31,364	0,494	27,316	27,447	0,185	3,917	0,1390	3,9170	0,0662
	31,015			27,578						
12	32,836	32,614	0,314	27,35	27,191	0,225	5,423	0,0746	5,4230	0,0233
	32,392			27,032						

13	23,918 23,655	23,787	0,186	18,167 18,059	18,113	0,076	5,674	0,0202	5,6735	0,0196
14	26,79 26,626	26,708	0,116	22,278 22,649	22,464	0,262	4,245	0,0411	4,2445	0,0528
15	26,287 26,348	26,318	0,043	22,001 21,38	21,691	0,439	4,627	0,0973	4,6270	0,0405
16	26,368 26,027	26,198	0,241	20,651 21,008	20,830	0,252	5,368	0,0609	5,3680	0,0242
17	27,8 27,421	27,611	0,268	23,057 23,01	23,034	0,033	4,577	0,0365	4,5770	0,0419
18	24,589 25,041	24,815	0,320	18,435 18,732	18,584	0,210	6,232	0,0731	6,2315	0,0133
19	28,144 27,504	27,824	0,453	21,655 21,875	21,765	0,156	6,059	0,1145	6,0590	0,0150
20	25,918 26,046	25,982	0,091	20,132 20,051	20,092	0,057	5,891	0,0057	5,8905	0,0169
21	28,193 27,882	28,038	0,220	23,48 22,659	23,070	0,581	4,968	0,1927	4,9680	0,0320
22	26,184 26,195	26,190	0,008	22,048 22,006	22,027	0,030	4,163	0,0005	4,1625	0,0558
23	28,255 27,935	28,095	0,226	23,105 23,164	23,135	0,042	4,961	0,0265	4,9605	0,0321
24	30,116 30,21	30,163	0,066	26,093 25,836	25,965	0,182	4,199	0,0187	4,1985	0,0545
25	26,07 25,34	25,705	0,516	20,263 20,461	20,362	0,140	5,343	0,1430	5,3430	0,0246
26	26,2 26,556	26,378	0,252	21,041 21,107	21,074	0,047	5,304	0,0328	5,3040	0,0253
27	27,236 26,83	27,033	0,287	21,804 21,437	21,621	0,260	5,413	0,0749	5,4125	0,0235

28	27,603	27,388	0,305	22,667	23,028	0,510	4,360	0,1764	4,3600	0,0487
	27,172			23,388						
29	26,507	26,377	0,184	20,611	20,581	0,043	5,797	0,0178	5,7965	0,0180
	26,247			20,55						
30	27,385	27,770	0,544	21,038	20,898	0,199	6,872	0,1676	6,8720	0,0085
	28,154			20,757						
31	27,812	27,393	0,593	21,065	21,007	0,082	6,386	0,1793	6,3855	0,0120
	26,973			20,949						
32	29,755	29,434	0,454	22,056	22,277	0,313	7,157	0,1519	7,1570	0,0070
	29,113			22,498						
33	27,136	26,703	0,612	19,965	19,960	0,007	6,743	0,1875	6,7430	0,0093
	26,27			19,955						
34	27,582	27,314	0,379	19,798	19,878	0,113	7,436	0,0782	7,4360	0,0058
	27,046			19,958						
35	27,865	27,333	0,753	18,095	18,641	0,772	8,692	0,5817	8,6915	0,0024
	26,8			19,187						
36	26,047	25,927	0,170	19,453	19,430	0,033	6,497	0,0151	6,4970	0,0111
	25,806			19,406						
37	26,357	26,262	0,134	19,212	19,314	0,144	6,948	0,0194	6,9480	0,0081
	26,167			19,416						
38	34,579	34,121	0,648	25,491	25,414	0,110	8,707	0,2162	8,7070	0,0024
	33,662			25,336						
39	Undet.	0	0	30,595	30,560	0,050	-30,560	0,0013	-30,5595	0
	Undet.			30,524						
40	24,438	24,471	0,047	19,004	19,032	0,039	5,440	0,0018	5,4395	0,0230
	24,504			19,059						
41	31,862	31,682	0,255	26,113	26,228	0,162	5,455	0,0455	5,4545	0,0228
	31,502			26,342						
42	26,847	26,528	0,451	18,957	19,316	0,507	7,213	0,2303	7,2125	0,0067
	26,209			19,674						

43	26,296 26,31	26,303	0,010	19,643 19,401	19,522	0,171	6,781	0,0147	6,7810	0,0091
44	23,271 22,871	23,071	0,283	16,79 16,877	16,834	0,062	6,238	0,0419	6,2375	0,0133
45	27,163 26,952	27,058	0,149	19,822 19,932	19,877	0,078	7,181	0,0142	7,1805	0,0069
46	30,049 30,139	30,094	0,064	22,002 22,235	22,119	0,165	7,976	0,0156	7,9755	0,0040
47	27,6 27,126	27,363	0,335	20,423 20,694	20,559	0,192	6,805	0,0745	6,8045	0,0089
48	25,899 26,162	26,031	0,186	19,45 20,02	19,735	0,403	6,296	0,0985	6,2955	0,0127
49	25,518 25,214	25,366	0,215	18,153 18,286	18,220	0,094	7,147	0,0275	7,1465	0,0071
50	25,388 25,728	25,558	0,240	19,908 20,522	20,215	0,434	5,343	0,1231	5,3430	0,0246
51	26,083 26,012	26,048	0,050	19,29 19,21	19,250	0,057	6,798	0,0029	6,7975	0,0090
52	31,167 31,417	31,292	0,177	25,326 25,079	25,203	0,175	6,090	0,0309	6,0895	0,0147
53	26,372 27,197	26,785	0,583	20,178 19,745	19,962	0,306	6,823	0,2170	6,8230	0,0088
54	22,587 22,398	22,493	0,134	17,214 17,163	17,189	0,036	5,304	0,0096	5,3040	0,0253
55	28,429 28,291	28,360	0,098	21,579 21,927	21,753	0,246	6,607	0,0350	6,6070	0,0103
56	36,423 36,139	36,281	0,201	26,419 27,478	26,949	0,749	9,333	0,3005	9,3325	0,0016
Amostra de referência		26,622	0,267		22,664	0,234	5,657	0,102	0,485	0,911

ANEXO IV

Tabela 1: Dosagem dos esteróides sexuais no fluido folicular de mulheres com SOP submetidas à FIV

Pacientes	Estradiol (pg/mL)		Progesterona (ng/mL)		Testosterona (ng/dL)		Androstenediona (ng/dL)	
	FF peq	FF grande	FF peq	FF grande	FF peq	FF grande	FF peq	FF grande
1	359210	542525	5730	11170	418	300	970	320
2	854120	710955	9240	11770	724	692	372	860
3	477495	414695	5500	18940	390	292	277	512
4	520495	683195	10150	12790	292	246	340	247
5	490550	655060	11780	10490	410	342	312	299
5	249265	216475	3600	5230	454	278	297	600
6	453430	435260	11270	12500	340	332	470	292
7	456025	443350	7270	7590	390	344	405	350
8	239530	673245	7520	1050	392	270	307	412
9	468945	435075	9730	8610	252	232	1015	460
10	269725	303345	7780	5910	396	364	325	1440
11	223255	301145	198	8620	422	390	384	280
12	813440	776680	2750	3290	602	482	990	707
13	113320	452275	13830	15920	348	148	330	394
Média	427771,79	503091,43	7596,29	9562,86	416,43	336,57	485,29	512,36
Mediana	453430,00	452275,00	7596,29	9562,86	396,00	332,00	372,00	412,00
DP	197817,94	161769,48	3519,94	4511,64	111,47	120,30	261,23	299,45

Tabela 2: Dosagem dos esteróides sexuais no fluido folicular de mulheres controles submetidas ao tratamento de FIV.

Pacientes	Estradiol (pg/mL)		Progesterona (ng/mL)		Testosterona (ng/dL)		Androstenediona (ng/dL)	
	FF peq	FF grande	FF peq	FF grande	FF peq	FF grande	FF peq	FF grande
1	499690	333205	11550	10940	198	124	500	457
2	429050	321865	4560	11360	408	266	345	255
3	360355	277845	9510	10320	260	161	375	537
4	71490	73315	11250	11350	206	89	505	425
5	296935	191705	10610	11860	432	225	442	322
6	463250	435305	12860	9820	456	321	535	382
7	325730	631980	5630	4000	316	273	795	750
8	558350	681630	2950	9370	345	248	442	385
9	328725	496260	9940	10640	430	260	660	887
10	194040	343855	12970	12350	280	178	370	347
11	730710	930760	12140	15660	368	199	925	585
11	301925	439265	10260	11940	274	185	342	470
12	228950	291445	8680	9800	182	115	632	270
12	265560	283325	8280	9060	280	163	430	700
13	272570	240680	5300	10900	158	91	205	167
14	276315	238690	10390	9110	314	150	400	445
15	125605	548625	3720	6390	526	476	655	530
16	329240	335440	11880	11580	288	184	492	320
17	194530	218540	8710	12690	180	147	352	392
18	830895	973470	8400	9190	270	205	1402	412
19	161075	249760	7230	12290	220	156	462	312
20	337935	323405	5820	5750	280	225	342	327
21	317755	318610	4230	12340	300	226	727	255
22	830895	968130	7860	11600	682	553	267	612
23	538495	455975	10710	9350	230	138	332	225
23	270850	268580	12190	8520	418	222	337	335

24	341200	496850	13200	14390	374	291	310	307
25	514130	387815	12210	12630	232	124	652	952
26	378880	285455	4160	11490	360	284	280	330
27	245055	125795	10330	16150	228	123	580	335
28	982550	678130	3980	3320	340	166	1430	1087
29	705495	576505	10530	9760	614	161	1170	502
30	527670	245780	6620	11850	486	243	635	300
31	147865	155795	9850	11650	148	82	285	552
Média	393640,15	406582,06	8779,71	10571,18	325,97	207,47	547,44	454,97
Mediana	329240,00	333205,00	9510,00	10940,00	300,00	185,00	462,00	392,00
DP	211418,36	223111,99	2996,54	2684,75	122,64	97,05	291,38	206,44

ANEXO V

Tabela 1: Resultado da análise de pós teste de comparação múltipla Newman-Keuls da dosagem de estradiol no FF de mulheres com SOP e controles.

Grupos	Média	q	p (< 0,05)
G1 vs G4	-97760	1.952	ns
G1 vs G2	-29300	---	ns
G1 vs G3	-12940	---	ns
G3 vs G4	-84820	---	ns
G3 vs G2	-16360	---	ns
G2 vs G4	-68460	---	ns

Tabela 2: Resultado da análise de pós teste de comparação múltipla Newman-Keuls da dosagem de progesterona no FF de mulheres com SOP e controles.

Grupos	Média	q	p (< 0,05)
G2 vs G3	-3297	4,211	*
G2 vs G4	-2217	2.355	ns
G2 vs G1	-1505	---	ns
G1 vs G3	-1791	3.077	ns
G1 vs G4	-7118	---	ns
G4 vs G3	-1080	---	ns

Tabela 3: Resultado da análise de pós teste de comparação múltipla Newman-Keuls da dosagem de testosterona no FF de mulheres com SOP e controles.

Grupos	Média	q	p (< 0,05)
G1 vs G2	-215,9	8,169	*
G3 vs G4	-145,3	5,497	*
G3 vs G1	-120,8	6,211	*
G1 vs G2	-95,09	3,598	ns
G1 vs G4	-24,48	0,926	ns
G4 vs G2	-70,62	2,212	ns

Tabela 4: Resultado da análise de pós teste de comparação múltipla Newman-Keuls da dosagem de androstenediona no FF de mulheres com SOP e controles.

Grupos	Média	q	p (< 0,05)
G3 vs G1	-92,47	1,974	ns
G3 vs G4	-73,80	---	ns
G3 vs G2	-43,64	---	ns
G2 vs G1	-48,83	---	ns
G2 vs G4	-30,15	---	ns
G4 vs G1	-18,67	---	ns

Legenda: ns= não significativo, * $p < 0,05$

ANEXO VI

Tabela 1: Resultado da ado tratamento de fertilização *in vitro* das pacientes com SOP e grupo controle.

	SOP (média/DP)	Controle (média/DP)	p (<0,05)
VOD basal	9,76 ± 6,06	6,29 ± 3,23	0,012*
nº folículos ovário direito basal	8,74 ± 5,00	4,98 ± 2,75	0,0016*
VOE basal	9,82 ± 5,12	6,83 ± 4,41	0,0075*
nº folículos ovário esquerdo basal	9,21 ± 5,62	4,68 ± 4,10	0,0005*
Dose total FSH	1.384,21 ± 499,82	1.884,21 ± 480,73	< 0,0001*
nº de dias de tratamento	8,79 ± 1,51	8,82 ± 1,21	0,914 (ns)
nº de folículos 10-14 mm	8,95 ± 3,47	5,03 ± 3,13	0,0002*
nº de folículos > 14 mm	10,16 ± 5,27	7,50 ± 3,79	0,02*
nº de folículos > 18 mm	3,89 ± 2,75	2,95 ± 2,10	0,10 (ns)
oócitos captados	8,89 ± 5,13	7,84 ± 4,45	0,30 (ns)
oócitos maduros	5,71 ± 3,68	7,53 ± 3,87	0,053 (ns)
oócitos imaturos	2,11 ± 2,38	1,06 ± 1,43	0,0834 (ns)
oócitos injetados	5,74 ± 2,07	4,42 ± 2,32	0,0483*
oócitos fertilizados	4,47 ± 1,76	3,50 ± 1,84	0,0431*
embriões clivados	3,73 ± 1,52	3,07 ± 1,64	0,145 (ns)
embriões formados	3,57 ± 1,60	2,94 ± 1,49	0,2608 (ns)

VOD= volume do ovário direito; VOE= volume do ovário esquerdo; ns= não significativo; * significativo.

ANEXO VII

Pacientes com síndrome dos ovários policísticos submetidas a hiperestimulação ovariana controlada para tratamento de fertilização *in vitro* tem altos níveis de expressão do BMP15 e GDF9 nos oócitos

Resende LOT¹, Reis RM^{2,6}, Vireque AA¹, Santana LF³, Moreno DA⁴, Rosa e Silva ACJ⁵,
Ferriani RA⁵

Setor de Reprodução Humana, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil

1 - Pós-graduanda do Programa Biologia da Reprodução – Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP (DGO-FMRP-USP)

2 - Professor Livre Docente do DGO-FMRP-USP

3 - Doutora e Médica Assistente do DGO-FMRP-USP

4 – Pós-graduando do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

5 - Professor Titular do DGO-FMRP-USP.

6 - Correspondência:

Profª Dra Rosana Maria dos Reis

Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

8º andar – Departamento de Ginecologia e Obstetrícia

Avenida dos Bandeirantes nº 3800, Campus da USP. CEP 14049-900. Ribeirão Preto –

São Paulo, Brasil. Fone: (16) 3602-2926 Fax: (16) 3633-1028

email: romareis@fmrp.usp.br

Abstract

Objective: To determine the expression of bone morphogenetic protein 15 (BMP15) and of growth differentiation factor 9 (GDF9) in patients with polycystic ovary syndrome (POS) subjected to controlled ovarian hyperstimulation (COH) for *in vitro* fertilization (IVF) treatment and to analyze the correlation between the expression of these genes and the sex steroid levels present in the follicular fluid (FF) of patients with PCOS and control patients.

Design: case-control study.

Patients: 18 oocytes were obtained from 18 patients with PCOS and 48 oocytes were obtained from control patients. Eighteen granulosa cells (GC) were obtained from 18 patients with PCOS and 56 from control patients. The patients were subjected to COH for IVF treatment. FF was obtained from a small follicle (10-14 mm) and from a large follicle (<18 mm) of each patient for steroid measurement.

Methods: Real-time PCR was used to quantitate the expression of BMP15 and GDF9 in the oocytes and of the BMP2 receptor in the GC. Estradiol and progesterone were determined by chemoluminescence and testosterone and androstenedione were determined by radioimmunoassay.

Results: BMP15 expression in the oocytes was significantly higher among women with PCOS than among controls (median = 5.95 and 0.59, respectively) with $p=0.0005$, as was also the case for the expression of GDF9 (median = 2.70 and 0.63, respectively), with $p=0.0006$. The expression of BMP2 did not differ between patients with PCOS (median 0.74) and controls (median 0.70) $p=0.7588$. BMP15 was positively correlated with pregnancy rate (β -hCG determination) ($r=0.36$, $p=0.0060$). When correlating the expression of this gene with each group separately, we observed that in the PCOS group, the higher the expression of BMP15, the higher the pregnancy rate ($r=0.60$, $p=0.0062$) whereas no such correlation was observed in

the control group ($r = -0.04293$, $p=0.7980$). The expression of GDF9 was also correlated with pregnancy rate, with a higher pregnancy rate in both groups the higher the expression of this gene ($r=0.26504$, $p=0.0463$). When this correlation was analyzed separately for each group, no significant difference was observed in the PCOS group ($r=0.32527$, $p=0.1742$) or in the control group ($r=0.11887$, $p=0.4772$). When we analyzed the two groups as a whole, the pregnancy rate was found to be positively correlated with the number of embryos formed ($r=2.762$, $p=0.050$) and separate analysis of each group showed no difference between them. Analysis of all follicles showed that progesterone levels in the FF were lower in small follicles (8.435 ± 3.305 ng/mL) than in large follicles (10.280 ± 3.475 ng/mL), $p<0.01$. Progesterone levels were lower in the follicles of the PCOS group (8.095 ± 4.151 ng/mL) compared to control (9.824 ± 3.128 ng/mL), $p=0.03$. FF testosterone levels differed between group 1 (small control FF) ($325,97\pm 122.64$ ng/dL) and group 3 (large control FF) ($207,47\pm 97,05$ ng/dL), $p<0.001$, and between group 3 ($207,47\pm 97,05$ ng/dL) and group 4 (large PCOS FF) ($336,57\pm 120,30$ ng/dL) $p<0.001$. Comparison of all follicles showed that the small ones (508.9 ± 266 ng/dL) contained higher levels of testosterone than the large ones (245.10 ± 123 ng/dL), $p<0.0001$.

Conclusions: The expression of BMP15 and GDF9 was higher in patients with PCOS subjected to COH for IVF treatment than in control patients, suggesting that the use of recombinant FSH may have corrected the expression of these genes, resulting in better pregnancy rates. Progesterone was reduced in the FF of PCOS patients and testosterone was increased in mature follicles compared to control, demonstrating the role of hyperandrogenism in ovarian folliculogenesis.

Key-words: BMP15, GDF9, PCOS, folliculogenesis, IVF

Introdução

Uma das questões mais importantes a serem consideradas na sobrevivência das espécies está baseada no determinante do número de ovulações e o número de folículos a serem descartados. Nos mamíferos, o número de oócitos ovulados está relacionado ao número de folículos pré-ovulatórios que são estimulados em cada ciclo reprodutivo (1).

A regulação da função reprodutiva feminina é realizada pelo eixo hipotálamo-hipófise-ovariano por meio do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), do hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), estradiol e progesterona. Além desses hormônios, existem substâncias secretadas no ovário pelo oócito e células foliculares somáticas (fatores autócrinos/parácrinos) que participam deste complexo sistema (2).

O crescimento folicular é um processo contínuo até a ovulação ou atresia. Da coorte de folículos que inicia o crescimento, apenas um será selecionado para ser o dominante e atingir a ovulação. A partir de um determinado momento a presença de FSH torna-se essencial para que a coorte de folículos recrutada continue em crescimento e ocorra a dominância folicular. Na ausência de FSH toda a coorte entra em apoptose (2).

A foliculogênese é uma sequência ordenada de maturação e diferenciação que inclui células somáticas e germinativas alcançando, posteriormente, a produção de um oócito competente para ser fertilizado (3). Uma comunicação bidirecional ocorre entre as células da teca, células da granulosa e o oócito durante o desenvolvimento folicular (4). Estudos *in vitro*, realizados em roedores, envolvendo cocultura de células da granulosa, demonstraram que fatores secretados pelo oócito são capazes de influenciar na proliferação e diferenciação das células da granulosa (5). Pesquisadores demonstraram que dois fatores secretados pelos oócitos, BMP15 e GDF9, desenvolvem um papel crucial na determinação da foliculogênese (6). Estes fatores fazem parte da superfamília TGF β – fator de crescimento e diferenciação- β (3).

As BMPs são citocinas multifuncionais capazes de regular a proliferação/diferenciação celular, a deposição de matriz extracelular e apoptose (7). O GDF9 e a BMP15 são expressos seletivamente pelo oócito em diferentes espécies, já nos estágios iniciais da foliculogênese (3).

A síndrome dos ovários policísticos (SOP) é uma complexa alteração endocrinológica caracterizada principalmente pelo hiperandrogenismo, anovulação crônica e ovários policísticos (8). A SOP representa a principal endocrinopatia ginecológica na idade reprodutiva, com incidência de 6 a 10% das mulheres no menacme (9). É considerada a causa mais comum de infertilidade por anovulação, podendo, em alguns países, como nos Estados Unidos, representar a principal causa de infertilidade feminina (10).

Devido a foliculogênese alterada e formação de cisto nesta síndrome, a expressão de GDF9 e BMP15 foi avaliada em mulheres com SOP e mulheres com ovários policísticos durante o desenvolvimento folicular. Os níveis de RNAm de GDF9, mas não de BMP15 em cortes de ovários, mostraram-se reduzidos neste grupo de mulheres durante a fase de diferenciação e crescimento (11).

Nas técnicas de reprodução assistida, a qualidade dos oócitos obtidos com a hiperestimulação ovariana controlada varia consideravelmente. Análises da maturação oocitária descreveram alguns genes envolvidos neste processo e o ponto específico da regulação necessária para a ovulação e fertilização. Alguns estudos demonstraram que mudanças na expressão de genes como o GDF9 e o BMP15 nos oócitos, ou pentraxina 3 nas células do *cumulus*, podem ser monitoradas para uma seleção apropriada do oócito a ser fertilizado (12).

O conhecimento de processos moleculares envolvidos no desenvolvimento e competência do oócito, obtido com a hiperestimulação ovariana controlada (HOC), pode

demonstrar novas opções de protocolos de indução da ovulação, contribuindo para um aperfeiçoamento da qualidade, cultura e manipulação do oócito.

Materiais e métodos

Foram incluídas nesta pesquisa 18 pacientes com SOP e 35 pacientes controles, cuja causa da infertilidade foi fator masculino leve ou moderado. O diagnóstico de SOP foi feito de acordo com os critérios de *Rotterdam ESHRE-ASRM-sponsored PCOS consensus workshop* (Rotterdam, 2004). As pacientes incluídas neste estudo foram recrutadas no Setor de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP). Todas as pacientes concordaram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética da instituição recebeu financiamento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

A indução da ovulação foi realizado com FSH recombinante, na dose de 100 a 200 mg/dia, para o bloqueio hipofisário utilizou-se GnRHa, no esquema longo, e foi administrado hCG recombinante para a maturação folicular.

Os oócitos foram obtidos da aspiração folicular e foram separados individualmente em criotubos contendo 1 µl de meio HTF-M, congelados em nitrogênio líquido e mantidos em freezer -80°C até o momento da extração. As CGs foram otidas por microdisseção. Foram realizados vários cortes longitudinais para a separação das células. Após, foram separadas individualmente em criotubos contendo 1 µl de meio HTF-M, , congeladas em nitrogênio líquido e mantidos em freezer -80°C até o momento da extração. A extração de RNA foi realizada utilizando-se o RNeasy Micro Kit (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante.

A síntese do cDNA foi realizada com a utilização do Kit para Transcrição Reversa da *Applied Biosystems*® (*High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit Applied Biosystems*®). Os procedimentos referentes à síntese do cDNA foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante.

As reações foram feitas utilizando-se o kit comercial com o sistema *TaqMan*® *Gene Expression Assays* (*TaqMan*® *MGB probes, FAM*™ *dye-labeled*) de acordo com as recomendações do fabricante. As sondas para os genes foram: BMP15 – Hs00193763_m1, GDF9 – Hs00193364_m1, BMPR2 – Hs00176148_m1. Como gene endógeno utilizou-se o gene beta-actina (ACTB) – Hs99999903_m1. Controles negativos foram preparados omitindo-se cDNA durante a reação de PCR-RT. As amostras foram então incubadas no termociclador *ABI PRISM*® *7000 Sequence Detection System* (*Applied Biosystems*). A quantificação das amostras foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Pediatria do HCFMRP-USP, utilizando-se a metodologia de PCR-RT.

A análise dos resultados do PCR-RT quantitativo foi realizada usando-se o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak, 2001), sendo que os resultados foram expressos relativos a um grupo referência ou calibrador. Neste experimento o grupo referência foi o grupo constituído pelos oócitos e células da granulosa captados de pacientes saudáveis sem síndrome dos ovários policísticos. O C_T do gene alvo (GDF9, BMP15 e BMPR2) e do gene controle endógeno foram determinados para cada amostra, respectivamente.

Para verificar a normalidade ou não da distribuição dos valores amostrais, foi utilizado o teste não-paramétrico de *Kolmogorov-Smirnov*, onde todas as amostras foram consideradas normais. A comparação entre idade, peso, IMC, FSH, TSH, prolactina dosagens foliculares de estradiol, progesterona, testosterona e androstenediona entre os grupos SOP e mulheres controle foi realizado com teste t não pareado, bem como a comparação entre as concentrações dos fluidos foliculares de estradiol, progesterona, testosterona e androstendiona

entre os folículos entre 10 e 14 mm e folículos maiores que 18 mm. Para a comparação entre as dosagens foliculares entre os quatro grupos, ou seja, G1 (FF pequeno do grupo controle), G2 (FF pequeno do grupo SOP), G3 (FF grande do grupo controle) e G4 (FF grande do grupo SOP) foi utilizado o ANOVA, com pós teste de comparação múltipla *Newman-Keuls Multiple*. O nível de significância adotado neste estudo foi de 5%, com o resultado das variáveis expresso em média e desvio-padrão. Utilizou-se o software *GraphPad Prism version 3.00 for Windows*. Para avaliar a taxa de gravidez entre os grupos SOP e controle utilizou-se o teste exato de *Fisher*. Para avaliar a expressão gênica dos genes estudados e se a expressão desses genes está relacionada à taxa de gravidez utilizou-se o teste de *Mann Whitney*. Para a análise de correlação utilizou-se o método de correlação de *Pearson*, pelo programa *Corr SAS* (Statistical Analysis System, 2003). Para verificar se as variáveis durante o ciclo de fertilização *in vitro* influenciaram na expressão dos genes foi utilizado o teste exato de *Fisher*.

Resultados

A distribuição da casuística foi homogênea entre os grupos controle e grupo com SOP. (Tabela 1).

Foram analisados 18 oócitos maduros de 18 mulheres com SOP e 48 oócitos maduros de 35 mulheres controles. A expressão do gene BMP15 nos oócitos foi significativamente maior nas mulheres com SOP quando comparada ao grupo controle (Mediana = 5,95 e 0,59, respectivamente) com $P=0,0005$, assim como a expressão do GDF9, que também mostrou-se elevada nas mulheres com SOP quando comparadas ao grupo controle (Mediana = 2,70 e 0,63, respectivamente), com $P=0,0006$. A análise estatística foi realizada utilizando-se o método *Mann Whitney test* (Figura 1 e 2).

Foram analisadas 18 células da granulosa de 18 mulheres com SOP e 56 células da granulosa de 35 mulheres controles. A expressão do BMP2 não teve diferença significativa

entre os dois grupos analisados (Media 0,74 – SOP e 0,70 – controle) $p=0,7588$. A análise estatística foi feita utilizando-se o método de *Mann Whitney test* (Figura 3).

O BMP15 mostrou ter correlação positiva com as taxas de gravidez (dosagem de β -hCG) ($r=0.36$, $p=0,0060$). Ao correlacionar a expressão do gene com os grupos separadamente, observamos que no grupo SOP, quanto maior a expressão do BMP15 maior a taxa de gestação ($r=0.60$, $p=0,0062$) enquanto que no grupo controle não observamos esta correlação ($r = -0.04293$, $p=0,7980$).

A correlação entre a expressão do GDF9 e a testosterona no FF grande foi positiva quando analisamos ambos os grupos ($r=0.26504$, $p=0,0398$), porém ao analisarmos os grupos separadamente, não observamos correlação com o grupo SOP ($r=0.32527$, $p=0,7454$) nem com o grupo controle ($r=0.11887$, $p=0,1969$). A correlação da expressão do GDF9 com os demais esteróides não teve resultados significativos. A expressão do GDF9 também está relacionada com a taxa de gravidez. Quanto maior a expressão, maior a taxa de gestação em ambos os grupos ($r=0.26504$, $p=0.0463$). Ao analisarmos esta correlação com os grupos separadamente, não houve diferença significativa no grupo SOP ($r=0.32527$, $p=0,1742$) e também não houve diferença no grupo controle ($r=0.11887$, $p=0,4772$).

Comparando a expressão do BMPR2 com os níveis de esteróides no FF grande, observamos que sua expressão teve uma correlação positiva com a testosterona ($r=0.29293$, $p=0,0433$). Na análise por grupo, esta correlação foi positiva apenas no grupo SOP ($r=0.62756$, $p=0,0163$). Com relação à androstenediona, a expressão do receptor BMPR2 foi positiva no grupo SOP ($r=0.55966$, $p=0,0374$).

Além dessas análises, também correlacionamos as taxas de gravidez com a quantidade de oócitos imaturos e maduros aspirados, número de embriões clivados e embriões formados. Observamos que a taxa de gravidez teve uma correlação positiva com o número de embriões

formados ($r=2,762$, $p=0,050$) quando analisamos ambos os grupos. Separadamente, não houve diferenças entre eles.

Com relação às dosagens de estradiol no FF não houve diferença significativa entre os grupos estudo e controle. Os níveis de estradiol também não foram diferentes entre os folículos pequenos e grandes dos respectivos grupos (Figura 4).

Ao compararmos todos os folículos entre 10 e 14 mm com todos os folículos maiores que 18 mm, foi possível constatar que os folículos pequenos (8.435 ± 3.305 ng/mL) apresentam valores menores de progesterona do que os folículos grandes (10.280 ± 3.475 ng/mL), com $p < 0,01$. (Figura 5) A análise de todos os folículos do grupo controle comparados com todos do grupo SOP revelou que as dosagens foliculares de progesterona são maiores no grupo controle (9.824 ± 3128 ng/mL) do que no grupo com SOP (8.095 ± 4151 ng/mL), com $p = 0,03$. (Figura 6).

Nas dosagens de testosterona no FF, entre os quatro grupos analisados, foi observado diferença significativa entre o G1 ($325,97\pm 122,64$ ng/dL) e o G3 ($207,47\pm 97,05$ ng/dL) $p < 0,001$, e entre o G3 ($207,47\pm 97,05$ ng/dL) e o G4 ($336,57\pm 120,30$ ng/dL) $p < 0,001$. Ao compararmos todos os folículos entre 10 e 14 mm com todos os folículos maiores que 18 mm, foi possível constatar que os folículos pequenos ($508,9\pm 266$ ng/dL) apresentaram valores maiores de testosterona do que os folículos grandes ($245,10\pm 123$ ng/dL), com $p < 0,0001$. Ao analisarmos todos os folículos do grupo controle comparados com todos do grupo não foram observadas diferenças significativas entre grupo controle ($373,5\pm 277,5$ ng/dL) e SOP ($386,4\pm 125,2$ ng/dL), $p = 0,82$ (Figura 7).

As dosagens de androstenediona no FF não apresentaram diferença significativa entre os grupos SOP e controle. Os níveis de androstenediona também não foram diferentes entre os folículos pequenos e grandes dos respectivos grupos: G1 ($541,20\pm 297,60$ ng/dL), G2

(497,20±286,60 ng/dL), G3 (453,20±209,40 ng/dL), e G4 (521,50±331,70 ng/dL) $p=0,59$ (Figura 8).

Discussão

O progresso de um folículo através dos sucessivos estágios da foliculogênese depende da comunicação bidirecional entre os oócitos e as células somáticas presentes no ovário, além de depender também da sinalização endócrina de gonadotrofinas e esteróides (13). Na última década, pesquisadores demonstraram a importância do BMP15 e do GDF9 na foliculogênese, mostrando que estes fatores estão diretamente relacionados ao crescimento folicular e a uma melhor qualidade oocitária (14, 6, 15).

Foi mostrado que em mulheres com SOP, onde há uma mudança na arquitetura ovariana caracterizada pelo acúmulo de folículos estacionados nas fases iniciais da foliculogênese, apresentam uma diminuição na expressão desses fatores e, conseqüentemente, má qualidade oocitária e baixas taxas de fertilização (11). Entretanto, recentemente um estudo demonstrou que mulheres com SOP submetidas a HOC para tratamento de fertilização *in vitro* não tiveram diminuição da expressão destes fatores em oócitos imaturos (em fase de vesícula germinativa e metáfase I), comparadas a um grupo controle, sugerindo que o uso do FSH exógeno pode corrigir uma disfunção na expressão destes fatores (16).

Em nosso estudo, a expressão do BMP15 e do GDF9 nos oócitos maduros de mulheres com SOP submetidas a HOC para tratamento de fertilização *in vitro* foi maior quando comparada ao grupo controle. Nossos dados reforçam ainda mais a teoria de que o uso do FSH exógeno pode estimular não só o crescimento folicular, mas também a expressão do BMP15 e do GDF9.

Nossos resultados mostraram ainda que o BMP15 apresentou-se mais expresso que o GDF9 em ambos os grupos estudados. Sendo o papel biológico do BMP15 iniciar o

crescimento folicular primário e o GDF9 crucial para a progressão da foliculogênese na fase folicular primária (14), estes achados sugerem que o BMP15 seja mais sensível ao estímulo induzido pelo FSH exógeno, ao passo que este atua estimulando o crescimento folicular já nos estágios iniciais da foliculogênese.

A expressão do BMP15 e do GDF9 não mostrou ter nenhuma correlação positiva com os níveis de esteróides sexuais presentes nos FF maduros, sugerindo que os altos níveis de andrógenos presentes na SOP não influenciaram na expressão destes genes. Este achado pode explicar porque mulheres com hiperandrogenismo tiveram resultados semelhantes a pacientes normais no que diz respeito a taxa de gestação, número de oócitos maduros captados e quantidade de embriões formados. Este achado sugere ainda que a expressão destes genes é influenciada pela ação do FSH recombinante utilizado nos tratamentos com HOC e não sofre alterações com altos níveis de andrógenos presentes no FF de mulheres com SOP.

Podemos observar ainda que a expressão do BMP15 e do GDF9 está diretamente relacionada à melhores taxas de gestação, demonstrando a importância destes fatores na qualidade oocitária, desenvolvimento embrionário e fertilização. principalmente nas pacientes com SOP. Estes dados demonstram também que o tratamento com FSH recombinante pode corrigir a disfunção ovariana presente na SOP e melhorar os resultados nos tratamentos de FIV, aumentando a expressão dos fatores BMP15 e GDF9.

Assim como não obtivemos resultado significativo na expressão do BMP2 nos grupos estudados, também não encontramos uma correlação positiva entre a expressão desse receptor com nenhum dos dados analisados. Este achado reforça a hipótese dos genes estarem se ligando a outros receptores de BMPs presente nas células da granulosa. Para analisar esta hipótese será necessário avaliar a expressão dos demais receptores de BMPs em estudos futuros.

Relatos de grande quantidade de folículos pequenos presentes no recrutamento folicular e baixas taxas de fertilização dos oócitos tem sido descrita em mulheres com SOP quando submetidas a ciclos de fertilização *in vitro* (18). Na nossa amostra as pacientes do grupo SOP apresentaram quantidade de oócitos maduros captados durante a aspiração folicular semelhante às pacientes do grupo controle, não havendo diferença entre elas. As taxas de fertilização também foram semelhantes entre os dois grupos. Este achado pode ser justificado pela maior expressão de GDF9 encontrada nas pacientes com SOP, visto que este gene é um potente promotor da expansão das células do cumulus (15) e, conseqüentemente, maturação e melhor qualidade oocitária.

Há relatos onde a expressão do GDF9 nas CGs de pacientes tratadas com HOC apresentou-se diminuída quando comparada com pacientes controles, podendo estar relacionado com uma luteinização precoce dessas células (21). Diferente deste estudo, nós avaliamos a expressão do receptor BMPR2 nas CGs e não encontramos diferenças entre os grupos estudados.

A produção ovariana de esteróides é importante para o desenvolvimento e funcionamento adequado de vários órgãos na mulher, incluindo útero, mama, osso e cérebro. Além disso, possuem ações locais que são essenciais para a fisiologia ovariana (17). Entretanto, a produção excessiva de esteróides leva a uma disfunção ovariana.

O FF tem um papel importante na fisiologia do crescimento folicular, na maturação oocitária e na ovulação. A composição do fluido pode influenciar e/ou determinar a qualidade oocitária. Pesquisadores demonstraram que a concentração dos hormônios esteróides, hormônios pituitários, citocinas e fatores de crescimento no FF está relacionada com o desenvolvimento oocitário, taxa de fertilização e desenvolvimento embrionário precoce (19). Como os níveis de progesterona, estradiol e testosterona no FF são significativamente modificados durante o período pré-ovulatório, especialmente depois do pico do LH, a análise

de suas concentrações no FF de ciclos de fertilização *in vitro*, foram correlacionadas com a maturação oocitária e demonstrado que os níveis de estradiol e testosterona podem ser utilizados como parâmetros preditivos para a maturação oocitária. No entanto, não foi observado correlação dos esteróides do FF com as taxas de fertilização dos oócitos (20).

Nos nossos resultados, os níveis de testosterona de todas as pacientes analisadas foram mais altos nos folículos de menor diâmetro. Este dado reflete a inadequada conversão de testosterona em estradiol pelas células da granulosa nos folículos imaturos, com acúmulo nos níveis de testosterona, diretamente relacionada ao desenvolvimento folicular ineficiente. No entanto, os níveis de testosterona no FF foram mais elevados nas pacientes com SOP. Esta diferença também foi evidenciada no FF de folículos maduros de pacientes com SOP quando comparado com o grupo controle. Este achado pode ser justificado pelo hiperandrogenismo presente nas mulheres com esta síndrome, podendo influenciar a qualidade oocitária e o processo de fertilização.

Os níveis de androstenediona não diferiram entre os folículos maduros e imaturos. Da mesma maneira, como podemos observar nas dosagens plasmáticas de testosterona e androstenediona, os níveis de testosterona no FF de mulheres submetidas à hiperestimulação ovariana controlada parece ser o melhor marcador biológico do hiperandrogenismo ovariano. No plasma a explicação para a androstenedina não ser o melhor marcador de atividade androgênica ovariana é o fato de que 50% de sua produção é originária da glândula adrenal e ovários e os 50% restantes originam de conversão em tecido periférico. Ao passo que a testosterona, a maior parte de sua produção é de origem ovariana e adrenal.

Os níveis de progesterona foram mais elevados nos folículos maduros de todas as mulheres analisadas, quando comparados aos folículos imaturos. Este aumento da progesterona, associado a diminuição da testosterona no FF de folículos maduros corresponde a redução no metabolismo de progestogênios (C21) para androgênios (C19) (22). A

progesterona no FF de pacientes com SOP apresentou-se diminuída em comparação com as mulheres controle, sugerindo que a redução da conversão de C21 para C19 não está sendo realizada de maneira eficiente nas mulheres com SOP como ocorre nas mulheres com ciclos ovulatórios, proporcionando um excesso de androgênios no FF dessas mulheres.

Antes do pico de LH, os níveis de estradiol no fluido de folículos periovulatórios aumenta progressivamente de maneira proporcional a atividade da enzima aromatase nas CG (22). No entanto, poucas horas após o pico do LH a secreção de estradiol ovariano diminui abruptamente, e conseqüentemente os níveis de estradiol no FF e plasma são também marcadamente reduzidos (23). Este comportamento do estradiol possivelmente explica os achados deste estudo, onde os valores do estradiol no FF não diferiram em relação ao diâmetro folicular.

Analisando a correlação entre a expressão do BMP15 e GDF9 com os níveis de esteróides no FF, podemos observar que nossas pacientes apresentam o hiperandrogenismo clássico presente na SOP, entretanto, o aumento da expressão do BMP15 e do GDF9 contribuiu para uma melhor qualidade oocitária e maiores taxas de fertilização, melhorando os resultados do tratamento de fertilização *in vitro* de mulheres portadoras dessa síndrome.

Os resultados deste estudo em oócitos maduros são inéditos e complementam a compreensão do papel desses fatores de diferenciação celular na fisiopatologia da síndrome dos ovários policísticos.

Conclusões

Diantes destes dados, podemos concluir que mulheres com SOP submetidas a hiperestimulação ovariana controlada para tratamento de fertilização *in vitro* tem um aumento na expressão dos genes BMP15 e GDF9 nos oócitos maduros, possivelmente por uma maior sensibilidade ao uso de FSH exógeno utilizado no tratamento. O BMPR2 não se mostrou

aumentado nas pacientes com SOP, possivelmente pelo BMP15 e GDF9 poder se ligar a outros receptores para BMPs presentes não só na células da granulosa, mas também em outras células ovarianas, incluindo oócitos.

A progesterona no FF de pacientes com SOP apresentou-se diminuída em comparação com as mulheres controle, sugerindo que a redução da conversão de C21 para C19 não está sendo realizada de maneira eficiente nas mulheres com SOP como ocorre nas mulheres com ciclos ovulatórios, proporcionando um excesso de androgênios no FF dessas mulheres.

O aumento na expressão do BMP15 e GDF9 contribuiu para melhor qualidade oocitária, melhores taxas de fertilização e gravidez nas pacientes com SOP, sugerindo que o hiperandrogenismo presente não prejudicou o tratamento destas pacientes.

A taxa de gravidez não foi diferente entre os grupos, sugerindo que o aumento da expressão do BMP15 e do GDF9 nas pacientes com SOP melhorou as taxas de fertilização e, conseqüentemente, a taxa de gravidez.

Apesar de estar bem estabelecido o papel do sistema BMP15/GDF9 na foliculogênese em modelos animais, estudos para definir o envolvimento preciso destes fatores na fisiologia/fisiopatologia ovariana humana são necessários para os avanços da ciência básica e a aplicação potencial dos conhecimentos obtidos em biotecnologias clínicas envolvendo o sistema BMP ovariano.

Referências bibliográficas

1. Gougeon A (1996). Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 17, 121-155.
2. Camargos AF, Lemos CNCD (2003). Fisiologia Reprodutiva In: Sheffer BB, Remohí J, Garcia-Veslasco J, Pellicer A, Simon C. Reprodução Humana Assistida. Editora Atheneu, São Paulo, p. 13-31.

3. Glister C, Groome NP, Knight PG (2003). Oocyte-mediated suppression of follicle-stimulating hormone and insuline-like growth factor-induced secretion of steroids and inhibin-related proteins by bovine granulosa cells in vitro: possible role of transforming growth factor α^1 . *Biol Reprod* 68: 758-765.
4. Matzuk MM (2000). Revelations of ovarian follicle biology from gene knockout mice. *Mol Cell Endocrinol* 163:61-66.
5. Li R, Norman RJ, Armstrong DT, Gilchrist RB (2000). Oocyte-secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells. *Biol Reprod* 63:839-845.
6. Moore RK, Erikson GF, Shimasaki S (2004). Are BMP15 and GDF9 primary determinants of ovulation quota in mammals? *Endocrinol Metabol* 15(8): 356-361.
7. Massagué J, Chen YG (2000). Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev* 14:627-644.
8. Norman RJ, Dewailly D, Legro RS, Hickey TE (2007) Polycystic ovary syndrome. *Lancet* 370:685–697
9. Asunción M, Calvo RM, San Millán JL, Sancho J, Avila S, Escobar-1. Morreale HF (2000) A prospective study of the prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected Caucasian women from Spain. *J Clin Endocrinol Metabol* 85(7):2434-8.
10. Homburg R. (1996) Polycystic ovary syndrome – from gynaecological 2. curiosity to multisystem endocrinopathy. *Hum Reprod.* 11(1):29-39.
11. Filho FLT, Baracat EC, Lee TH, Suh CS, Matsui M, Chang RJ, Shimasaki S, Erickson GF (2002). Aberrant expression of growth differentiation factor-9 in oocytes of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metabol* 87(3): 1337-1344.
12. Zhang X, Jafari N, Barnes RB, Confino E, Milad M, Kazer RR (2005). Studies of gene expression in human cumulus cells indicate pentraxin 3 as a possible marker for oocyte quality. *Fetil Steril* 83(1):1169-1179.

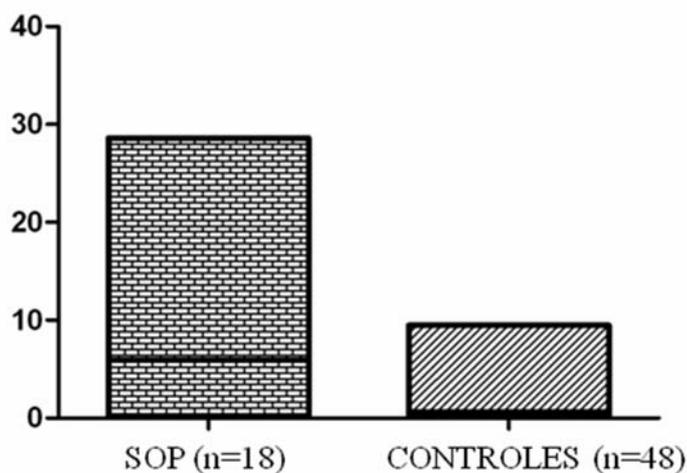
13. Vireque AA, Reis RM, Rosa e Silva AAM, Resende LOT, Ferreira EM, Rosa e Silva ACJS and Ferriani RA (2008). Involvement of Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) in Ovarian Function and Infertility. *The Open Reproduct Scie J* 1:11-15
14. Chand AL, Ponnampalam AP, Harris SE, Winship IM, Shelling AN (2006). Mutational analysis of BMP15 and GDF9 as candidate genes for premature ovarian failure. *Fertil Steril* 86(4): 1009-1012.
15. Vitt UA, et al (2000). Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulation hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. *Biol Reprod* 62:370-377.
16. Zhao SY, Qiao J, Chen YJ, Liu P, Li J, Yan J (2009). Expression of growth differentiation factor-9 and bone morphogenetic protein-15 in oocytes and cumulus granulosa cells of patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril in press*.
17. Jamnongjit M and Hammes SR (2006). Ovarian Steroids: The Good, the Bad, and the Signals that Raise Them *Cell Cycle* 5(11), 1178–1183.
18. Reis RM, De Angelo AG, Romão GS, Santana LF, Moura MD, Feriani RA (2004). A Síndrome dos ovários policísticos pode interferir nos resultados da fertilização *in vitro*? *Rev Bras Ginecol Obstet* (26)9, 727-733.
19. Salmassi A, Schmutzler AG, Schaefer S, Koch K, Hedderich J, Jonat W and Mettler L (2005). Is granulocyte colony-stimulating factor level predictive for human IVF outcome? *Hum Reprod* 20:2434–2440.
20. Costa LOB, Mendes MC, Ferriani RA, Moura MD, Reis RM, Silva de Sá MF (2004). Estradiol and testosterone concentrations in follicular fluid as criteria to discriminate between mature and immature oocytes. *Braz J Med Biol Res* 37(11) 1747-1755.

21. Takebayashi K, Takakura K, Wang H, Kimura F, Kasahara K, Noda Y, et al. (2000) Mutation analysis of the growth differentiation factor-9 and -9B genes in patients with premature ovarian failure and polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 74:9769.
22. Hiller SG, Reichert Jr & Van Hall EV (1981). Control of preovulation follicular estrogen biosynthesis in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metabol* 52: 847-856.
23. Hiller SG, Wickings EJ, Atnan M, Margara RA & Winston RM (1984). Granulosa cell steroidogenesis before in vitro fertilization. *Biol Reprod* 31:679-686.

Tabela 1 – Distribuição da casuística das mulheres do grupo controle e do grupo SOP quanto à idade, peso, índice de massa corporal (IMC), hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio tireotrófico estimulante (TSH) e prolactina.

	Idade (anos)	Peso (Kg)	IMC (Kg/m ²)	FSH (mUI/mL)	TSH	PRL
Controles						
Mediana	33	62,3	24,03	6	1,97	11,5
Média	32,30	65,5	24,83	5,67	3,54	13,38
DP	4,25	11,13	4,92	2,21	6,88	7,84
SOP						
Mediana	33	67	26	4,59	1,90	13,42
Média	32,54	67,63	23,7	5,39	2,13	17,09
DP	3,31	10,20	7,42	5,37	0,85	14,83

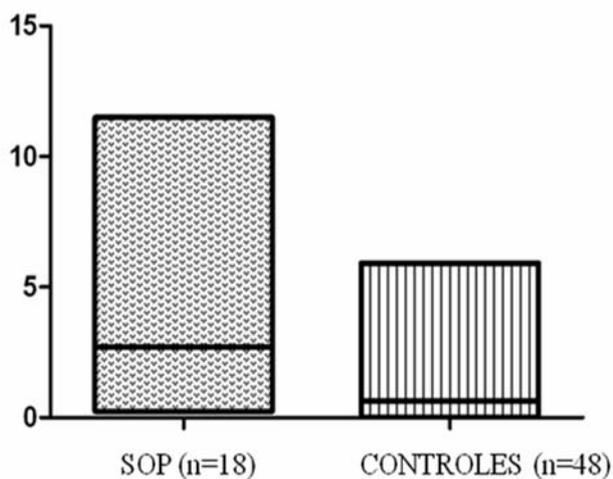
Expressão do BMP15 nos oócitos individuais



Mann Whitney test (p=0,006)

Figura 1: Gráfico representativo da expressão do gene BMP15 em oócitos individuais de mulheres com SOP e controles. A linha que cruza as colunas representa a mediana (5,95 e 0,59, respectivamente).

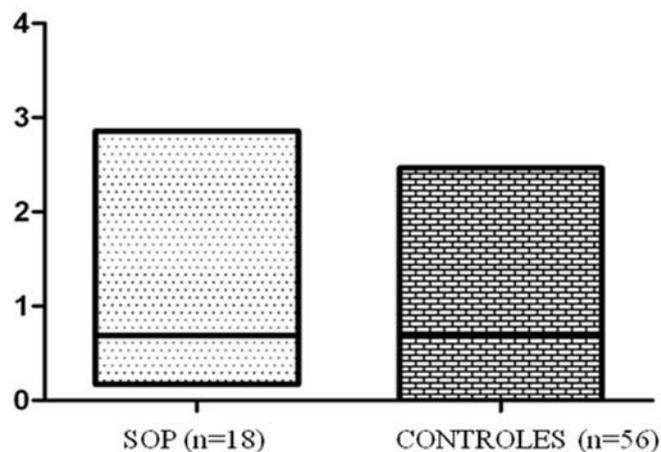
Expressão do GDF9 nos oócitos individuais



Mann Whitney test (p=0,0006)

Figura 2: Gráfico representativo da expressão do gene GDF9 em oócitos individuais de mulheres com SOP e controles. A linha que cruza as colunas representa a mediana (2,70 e 0,63, respectivamente).

Expressão do BMPR2 nas células da granulosa



Mann-Whitney test ($p=0,7588$)

Figura 3: Gráfico representativo da expressão do gene BMPR2 em células da granulosa de mulheres com SOP e controles. A linha que cruza as colunas representa a mediana (0,74 e 0,70, respectivamente).

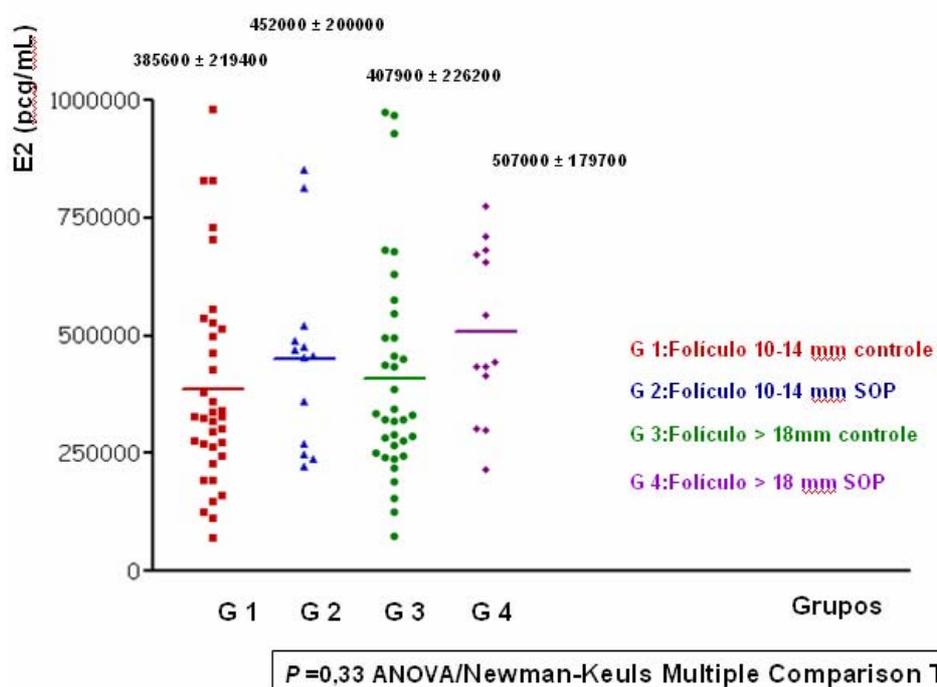


Figura 4- Comparação entre as dosagens de estradiol no FF entre folículos de 10 a 14 mm e folículos maiores que 18 mm do grupo controle e do grupo SOP. A linha que cruza o meio de cada quadro representa a média.

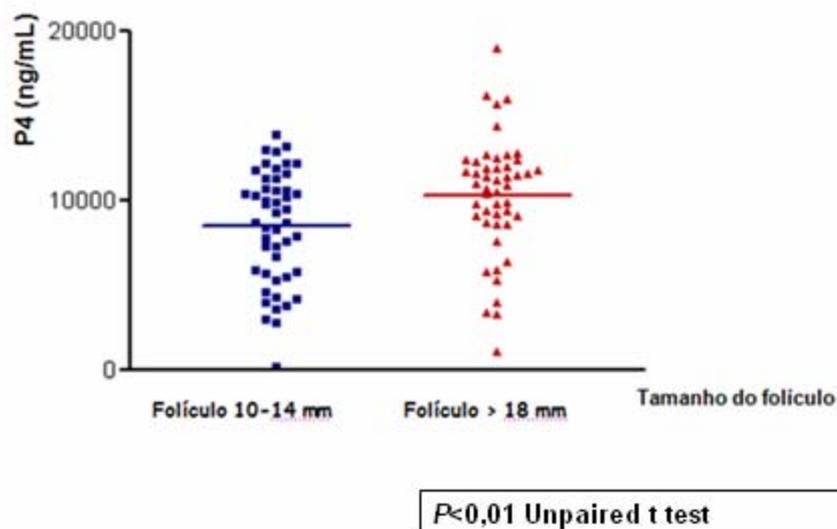


Figura 5 - Comparação entre as dosagens de progesterona em todos os FF pequenos e todos os FF grandes. A linha que cruza o meio de cada quadro representa a média.

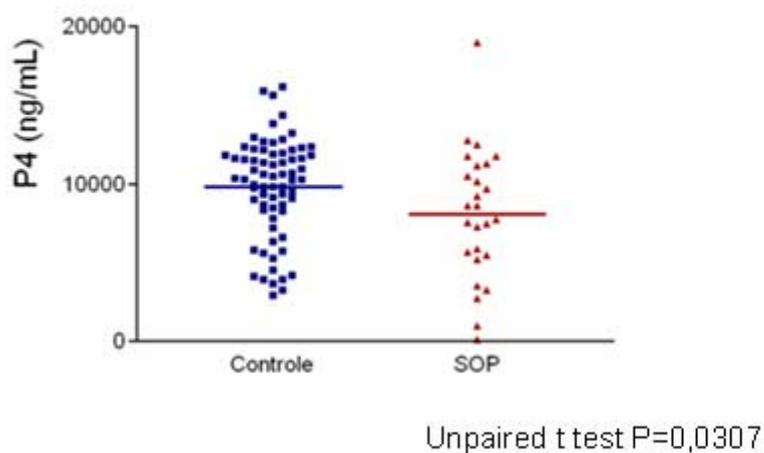
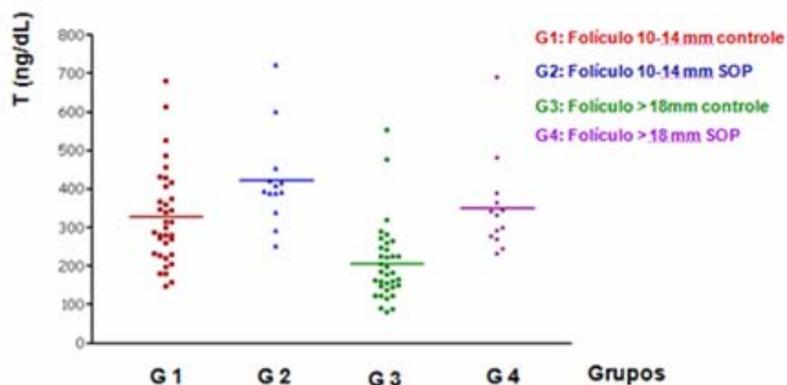
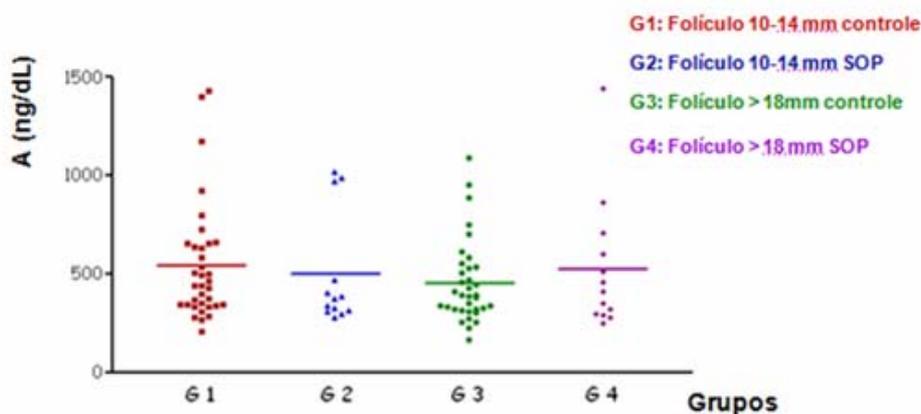


Figura 6 - Comparação entre as dosagens de progesterona em todos os FF do grupo controle e todos os FF do grupo SOP. A linha que cruza o meio de cada quadro representa a média.



$P < 0.0001$ ANOVA/Newman-Keuls Multiple Comparison Test

Figura 7- Comparação entre as dosagens de testosterona no FF de folículos pequenos e folículos grandes do grupo controle e do grupo SOP. A linha que cruza o meio de cada quadro representa a média.



$P = 0,59$ ANOVA/Newman-Keuls Multiple Comparison Test

Figura 8 – Comparação entre as dosagens de androstenediona no FF de folículos de 10 a 14 mm e folículos maiores que 18 mm do grupo controle e do grupo SOP. A linha que cruza o meio de cada quadro representa a média.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)