

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**EXPRESSÃO DO GENE E DA PROTEÍNA p63 EM CÉLULAS DA GRANULOSA
LUTEINIZADAS DE PACIENTES INFÉRTEIS SUBMETIDAS A FERTILIZAÇÃO IN
VITRO**

JOELMIR JOSÉ CHIESA

Porto Alegre

2014

CIP - Catalogação na Publicação

Chiesa, Joelmir José
"EXPRESSÃO DO GENE E DA PROTEÍNA p63 EM CÉLULAS DA
GRANULOSA LUTEINIZADAS DE PACIENTES INFÉRTEIS
SUBMETIDAS A FERTILIZAÇÃO IN VITRO / Joelmir José
Chiesa. -- 2014.
65 f.

Orientador: João Sabino Lahorgue da Cunha Filho.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2014.

1. Proteína p63. 2. Gene p63. 3. Endometriose. 4.
Fertilização in vitro. 5. Infertilidade. I. Lahorgue
da Cunha Filho, João Sabino, orient. II. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**EXPRESSÃO DO GENE E DA PROTEÍNA p63 EM CÉLULAS DA GRANULOSA
LUTEINIZADAS DE PACIENTES INFÉRTEIS SUBMETIDAS A FERTILIZAÇÃO IN
VITRO**

JOELMIR JOSÉ CHIESA

Orientado por: Dr. João Sabino Lahorgue da
Cunha-Filho

Dissertação apresentada como requisito
parcial para obtenção do título de Mestre em
Medicina: Ciências Médicas, da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, Programa de
Pós-Graduação em Medicina: Ciências
Médicas.

Porto Alegre

2014

BANCA EXAMINADORA

- 1. Dra. Marcia Silveira Graudenz*
- 2. Dra. Ida Vanessa Doederlein Schwartz*
- 3. Dr. João Paolo Bilibio*
- 4. Dr. Ricardo Françalacci Savaris*
- 5. Dra. Maria Celeste Osório Wender*

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, à minha namorada, aos meus amigos, aos colegas de trabalho e ao orientador pelo apoio, força, incentivo, companheirismo e amizade.

Sem eles nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

As grandes conquistas são fruto do trabalho em equipe. Com esta dissertação de mestrado não foi diferente. Muitas pessoas colaboraram, de uma forma ou de outra, para o sucesso do nosso trabalho.

Agradecimento especial para:

- Professor Orientador João Sabino L. da Cunha-Filho. Seus conselhos e orientações sempre me nortearam na vida profissional e pessoal.
- Grupo de Pesquisa em Endometriose e Ginecologia Minimamente Invasiva, pelo companheirismo no dia-a-dia.
- As colegas Rita de Cássia Borges Chapon e Glícia Pinheiro Bezerra, pela caminhada juntos, nesses dois anos.
- Liliana Cossio, pela ajuda, essencial, nas análises laboratoriais.
- Daniela Scherer da Silva, pela ajuda na coleta das amostras.
- Insemine, por abrir as portas para este e outros projetos, contribuindo para a evolução da pesquisa no Brasil.
- Centro de Terapia Gênica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
- Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
- A minha família, meus pais, Décio e Mercedes, meu irmão, Cedenir, sempre foram um exemplo de vida, dignidade e trabalho.
- A minha namorada, Vívian, pelo amor, companheirismo e incentivo.

RESUMO

Introdução: O gene p63 é o mais ancestral membro dos integrantes da família p53 e é descrito como o responsável pela manutenção da integridade gênica e regulação do ciclo celular em células germinativas imaturas. Porém, ainda não há relatos na literatura que avaliem sua expressão em células da granulosa luteinizadas. A endometriose é uma doença crônica que está associada à infertilidade. Vários mecanismos foram propostos para explicar esta associação, mas, até o momento, nenhum deles é considerado definitivo.

Objetivos: O objetivo desse estudo é avaliar a expressão do gene e da proteína p63 em células da granulosa luteinizadas de pacientes inférteis submetidas à fertilização in vitro (IVF). Além disso, verificar se pacientes com endometriose apresentam função anormal da p63.

Métodos: Realizamos um estudo transversal e prospectivo. Nós coletamos células da granulosa de 28 pacientes submetidas a IVF para avaliar a expressão de p63. Depois, para estudar o efeito na endometriose dividimos em dois grupos: (1) grupo estudo (n=9): pacientes com diagnóstico videolaparoscópico de endometriose e (2) grupo controle (n=19): pacientes inférteis por outros motivos, sem endometriose. As células coletadas foram preparadas e analisadas para expressão gênica (PCR em tempo real) e expressão proteica (imunofluorescência). Os resultados foram comparados entre os grupos.

Resultados: Não observamos diferença significativa de expressão do gene p63 entre os grupos estudados. A mediana do $2^{-\Delta\Delta CT}$ no grupo controle foi 0,93 (IC 95%, 0,55-2,83) e 0,88 no grupo em estudo (IC 95%, 0,24-2,84). O resultado também mostrou que o gene p63 não é expresso nos dois grupos. Quanto à expressão da proteína p63, a imunofluorescência não demonstrou expressão em nenhum dos dois grupos.

Conclusão: O gene e a proteína p63 podem ser muito importantes na manutenção da integridade gênica de folículos imaturos de reserva, não dependentes de FSH. Porém, após o recrutamento e crescimento folicular, não se observa mais sua expressão, ou seja, ele não faz parte da maturação e desenvolvimento oocitário.

Palavras chave: "p63 gene", "p63 protein", "p53 family", "Infertility", "Endometriosis".

ABSTRACT

Introduction: The p63 gene is the most ancient member of the components of p53 family and is described as the responsible for maintaining of genic integrity and cell cycle regulation in immature germ cells. However, there are no reports in the literature evaluating its expression in granulosa cells luteinized. Endometriosis is a chronic disease that is associated with infertility. Several mechanisms have been proposed to explain this association, but so far, none of them is considered definitive.

Objectives: The purpose of this study is to evaluate the expression of the p63 gene and protein in granulosa luteinized cells of infertile patients undergoing in vitro fertilization (IVF). Also, we checked whether patients with endometriosis have abnormal function of p63.

Methods: We performed a prospective cross-sectional study. We collected granulosa cells of 28 patients undergoing IVF to evaluate p63 expression. Then, to study the effect on endometriosis, they were divided into two groups: (1) study group (n = 9): patients with laparoscopic diagnosis of endometriosis and (2) control group (n = 19): infertile patients for other reasons, without endometriosis. The collected cells were prepared and analyzed for gene expression (real time PCR) and protein expression (immunofluorescence). The results were compared between the groups.

Results: There was no significant difference in expression of the p63 gene between the groups. The median of $2^{-\Delta\Delta CT}$ in the the control group was 0.93 (95% CI, 0.55 to 2.83) and 0.88 in the study group (95% CI, 0.24 to 2.84). The results also showed that the p63 gene is not expressed in granulosa cells in both groups. About to the p63 protein expression, immunofluorescence showed no expression in either group.

Conclusion: The p63 gene and protein can be very important in maintaining the genic integrity of immature reserve follicles, not dependent of FSH. However, after the recruitment and follicular growth is not more observed its expression, suggesting that p63 is not part of control of oocyte maturation and development.

Keywords: "p63 gene", "p63 protein", "p53 family", "Infertility", "Endomeriosis".

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

Tabela 1: Descriptive analysis of patients (pág 45)

Tabela 2: Patients divided according to the cause of infertility (pág 46)

Gráfico 1: p63 gene expression. (pág 47)

Figura 1: Immunofluorescence showing a single cell stained positive for p63 protein (pág 48)

Figura 2: Immunofluorescence showing granulosa cells stained with DAPI (pág 49)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMH – *anti-Müllerian hormone* (hormônio anti-Mülleriano)

ASRM – *American Society of Reproductive Medicine*

cDNA – DNA complementar

COX-2 – enzima ciclo-oxigenase 2

DNA – ácido desoxirribonucleico

E2 - estradiol

FSH – *follicle-stimulating hormone* (hormônio folículo estimulante)

hCH – *human chorionic gonadotropin* (gonadotropina coriônica humana)

IL – interleucina

IVF – *in vitro fertilization* (fertilização in vitro)

LIF – leukemia inhibitory factor

PBS – *phosphate buffered saline* (tampão fosfato salino)

PG – prostaglandina

qPCR – *real time polymerase chain reaction* (reação em cadeia polimerase em tempo real)

RNA – ácido ribonucleico

ROS – espécies reativas ao oxigênio

TE – tecido endometriótico

TNF – *tumor necrosis factor* (fator de necrose tumoral)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1. ESTRATÉGIA PARA LOCALIZAR E SELECIONAR INFORMAÇÕES	13
2.2. REFERENCIAL TEÓRICO	13
3. JUSTIFICATIVA	26
4. HIPÓTESE NULA	27
5. OBJETIVOS.....	28
5.1. OBJETIVO PRINCIPAL	28
5.2. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS.....	28
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
7. ARTIGO:.....	34
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
9. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	51
10. ANEXOS.....	52

1. INTRODUÇÃO

A família do gene p53 (composta pelos fatores de transcrição p53, p63 e p73) tem sido objeto de estudo nos últimos anos, com interesse crescente. Já foi estabelecido o papel deste grupo de genes no controle de dano ao genoma celular tanto de células somáticas quanto de células germinativas [1, 2]. Por esta razão, são conhecidos como os “guardiões do genoma” [3, 4].

A proteína p53, mais conhecida e celebrada do grupo, está associada à estabilidade gênica de células somáticas atuando como um supressor tumoral. Seu mecanismo de ação se dá através de várias formas: apoptose, reparo de DNA, parada do ciclo celular ou senescência. Ao garantir a estabilidade gênica, a proteína p53 assegura a manutenção da integridade celular [5].

Além da função de supressão tumoral, as proteínas p63 e p73 também desempenham funções ímpares. Está bem determinado que a p63 é altamente expressa no desenvolvimento embrionário e é fundamental para a formação dos membros e diferenciação de tecidos epiteliais [6], além de ser um marcador de células basais e de reserva do trato genital feminino [7]. Já à proteína p73 cabe a função de assegurar o desenvolvimento do sistema nervoso central e sistema imune [2].

Existem relatos de série de casos que demonstraram que algumas doenças, que cursam com falência ovariana precoce em humanos, estão associadas a anormalidades de expressão da proteína p63 [8].

Recentemente, Gonfloni e colaboradores demonstraram, em estudos experimentais em cobaias, que a isoforma TAp63 α é ativada em resposta ao estresse genotóxico agudo à células germinativas, secundário a agentes citotóxicos (quimioterápicos e radiação ionizante), resultando em apoptose celular [1].

É interessante observar que este e outros estudos prévios foram realizados com células ovarianas imaturas (folículos primordiais). Não existem dados na literatura médica que avaliam a expressão do gene e da proteína p63 em células ovarianas maduras, tais como, células da granulosa luteinizadas.

A endometriose é uma doença crônica muito prevalente em nosso meio que está presente em cerca de 10 % da população feminina em idade fértil [9]. Clinicamente, está associada a dor pélvica crônica e a infertilidade. É no período mais

produtivo da vida da mulher que a doença encontra-se mais ativa gerando custos diretos no tratamento de saúde e indiretos pela perda de produtividade [10].

O sistema mais aceito atualmente para classificação da endometriose é o da ASRM (*American Society of Reproductive Medicine*) que divide a endometriose em quatro estágios: (I) mínima, (II) leve, (III) moderada e (IV) severa [11]. Esse sistema foi utilizado como base para o nosso estudo.

Embora exista uma grande quantidade de trabalhos demonstrando associação entre endometriose e infertilidade, até o momento nenhuma relação causal foi estabelecida. Em algumas situações é fácil perceber que danos à anatomia pélvica, como a obstrução tubária bilateral, possa causar infertilidade nos casos de endometriose severa. Entretanto, esse conceito não se aplica à infertilidade nos casos de doença mínimo ou leve.

Em vista disso, diversos mecanismos foram propostos para explicar a dificuldade em gestar nesse grupo de pacientes. Diversas linhas de pesquisa estão em andamento apresentando resultados diversos. O mais provável é que fatores hormonais, inflamatórios e imunológicos, atuem de forma conjunta promovendo infertilidade nesse grupo de pacientes [12].

Alguns autores já demonstraram associação entre anormalidade de expressão das proteínas da família p53 (especialmente a proteína p53) em pacientes inférteis, assim como em pacientes com endometriose [13, 14]. Também já está relatada diferença de expressão da proteína p63 nos diferentes subtipos de endometriose, porém sem investigar sua associação com infertilidade [15].

O nosso grupo de pesquisa pertence ao diretório de pesquisa em Reprodução Humana da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e vem trabalhando nessa linha de pesquisa. Já demonstramos que este grupo de mulheres apresenta diversas alterações hormonais, tais como a secreção e o controle da prolactina alterados [16, 17], disfunção na secreção de esteroides ovarianos durante a fase lútea [18] e concentração folicular de fatores de crescimento modulada de forma anômala [19]. Além disso, demonstramos que mulheres com endometriose mínima e leve apresentam uma alteração da coorte folicular com uma diminuição da reserva ovariana medida pelos níveis séricos do hormônio anti-Mülleriano (AMH) no 3º dia do ciclo menstrual [20].

Estas evidências sugerem que anormalidades de expressão da proteína p63 podem corresponder a um ponto em comum entre pacientes inférteis e aquelas

portadoras de endometriose, pois essas últimas já mostraram ter uma diminuição da reserva ovariana e uma menor capacidade de gestar, mesmo com uso de técnicas de reprodução assistida.

Portanto, resolvemos avaliar a expressão gênica e proteica da p63 em células da granulosa maduras de pacientes submetidas a IVF. Além disso, decidimos verificar a associação entre endometriose, alterações da função da proteína p63 e infertilidade, a fim de buscar uma resposta para gênese da infertilidade neste grupo de pacientes visando propor tratamentos mais racionais e individualizados, melhorando os desfechos clínicos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. ESTRATÉGIA PARA LOCALIZAR E SELECIONAR INFORMAÇÕES

Esta revisão da literatura está focada na expressão gênica e proteica da p63 em células da granulosa de pacientes inférteis e, posteriormente, portadora de endometriose. Esta verificação parte do pressuposto da associação entre infertilidade com a endometriose e com alterações de expressão dos genes da família p53 em células germinativas. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: LILACS, SciELO, PubMed e banco de dados da CAPES, no período de 1927 a 2014. Foram realizadas buscas através dos termos: "Endometriosis", "Infertility", "p63 gene", "p63 protein", "p53 family" e suas combinações.

2.2. REFERENCIAL TEÓRICO

A família p53

A família do gene p53 é composta por três proteínas: p53, p63 e p73. Seus genes codificantes são muito semelhantes e se ligam a sequências de DNA similares ou idênticas para regular a transcrição de um subconjunto de proteínas em comum ou únicas para cada gene resultando funções celulares únicas ou em conjunto [2, 21].

A proteína p53 é o mais celebrado e reconhecido fator de transcrição desta família. Desempenha papel crucial no controle de dano celular prevenindo a formação de tumores através da estabilização gênica das células somáticas [4, 5]. Em humanos é codificada pelo gene TP53, localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13.1). O p53 atua como fator de transcrição específico de DNA e regula respostas celulares apropriadas secundárias a vários sinais de estresse celular, tais como: apoptose, reparo de DNA, senescência ou parada do ciclo celular. Estes métodos de controle celular eliminam células com DNA danificado ou mutado antes de se tornarem células tumorais garantindo a manutenção do genoma [5, 22]. Por este motivo, o gene p53 é reconhecido como "o guardião do genoma" [3, 4]. Os genes p63 e p73 também têm papel na supressão tumoral e controle de dano de DNA [23].

A proteína p63 é codificada pelo gene TP63 e localiza-se no cromossomo 3 (3q28). É altamente expressa durante o desenvolvimento embrionário e sua expressão é essencial para a formação dos membros e morfogênese da epiderme, de modo que sua ausência está associada com anormalidades de tecidos epiteliais [2,

6]. A expressão do p63 no trato genital também desempenha papel fundamental em seu desenvolvimento e é um marcador para a diferenciação do epitélio dos ductos de Muller em tecido cérvico-vaginal ou uterino [24].

Já a proteína p73 é codificada pelo gene TP73 e localiza-se no cromossomo 1 (1p36.3). Além da função de supressão tumoral, também podemos identificar seu papel no desenvolvimento do sistema nervoso central e do sistema imune [2].

Estudos recentes em cobaias têm sugerido a associação entre a linhagem da família p53 e a função reprodutiva. A perda ou redução da função das proteínas p53, p63 ou p73 em fêmeas de camundongos esteve associada com redução de fertilidade [5].

Experimentos demonstraram que quando embriões de camundongos selecionados, com atividade da p53 normal (p53+/+) ou ausente (p53-/-), foram expostos a radiação ionizante em níveis danosos ao DNA, verificou-se que a apoptose resultante pode ser considerada p53-dependente. No grupo de embriões com p53 +/+, verificou-se alta taxa de apoptose e morte celular (para eliminar a prole com DNA danificado). Em contrapartida, no grupo com embriões p53-/-, ocorreu menos apoptose, resultando em baixa taxa de morte de embriões e altas taxas de anormalidades de desenvolvimento [25].

A proteína p53 e o estrogênio regulam a reprodução materna durante a fase de implantação do embrião no endométrio através da expressão proteína multifuncional LIF (leukemia inhibitory factor). A LIF é produzida e secretada pelas células glandulares endometriais e está altamente expressa no início da fase de implantação do blastocisto [26], desempenhando papel crucial neste período, preparando a superfície do endométrio para receber o blastocisto [27]. Camundongos sem expressão de LIF apresentam defeitos de implantação que podem ser revertidos pela aplicação de LIF exógeno neste estágio, aumentando significativamente as taxas de gestação devido à melhora das condições de implantação do blastocisto [28].

Em camundongos machos, foi demonstrado que os níveis de proteína p53 estão elevados durante a espermatogênese. A ausência ou redução de sua concentração esteve associada com degeneração de células germinativas durante algumas fases da divisão celular resultando em células defeituosas nos túbulos seminíferos [29].

A proteína p63 possui ΔN isoformas que contribuem para a execução de suas várias atribuições. Analisando camundongos deficientes para a isoforma TAp63,

verificou-se que é ela a responsável pela manutenção da integridade gênica dos oócitos [30]. A isoforma TAp63 α garante a integridade gênica das células germinativas femininas durante a parada da meiose. Sua expressão é iniciada na prófase I tardia, correspondente 18,5 dias da fase embrionária e atinge o pico no estágio diplóteno curto, logo após o nascimento [24, 30].

O TAp63 α é ativado em resposta ao dano ao DNA de células germinativas, induzidos por agentes citotóxicos, como a radiação ionizante e os quimioterápicos (ex: cisplatina) promovendo apoptose celular. O estresse genotóxico crônico ou intenso pode levar depleção dos folículos ovarianos de reserva e a infertilidade [1]. Oócitos que não possuem expressão do TAp63 α ou p63 são completamente resistentes à apoptose induzida por lesões ao DNA levando a continuidade do DNA danificado na prole resultante [30, 31].

Camundongos com deficiências para as isoformas ΔN e TA da proteína p73 são inférteis, secundário a vários mecanismos: (1) redução do tamanho do pool folicular – leva a rápido esgotamento dos folículos e menopausa precoce; (2) redução da habilidade ovulatória – baixas taxas de ovulação em cada ciclo; (3) baixa qualidade de oócitos – anormalidades de fusão e importante aumento das taxas de aneuploidias na prole [32, 33].

Portanto, a função específica do p63 na fisiologia ovariana estaria associada com a manutenção da reserva ovariana e o correto desenvolvimento oocitário.

O gene p63 e reprodução em humanos

O papel desempenhado pelo TAp63 na manutenção da fidelidade gênica das células germinativas em camundongos também é observada, de forma similar, em humanos [2].

Alguns estudos já relataram presença de infertilidade em pacientes com mutações do gene codificador da proteína p63. Um relato de caso de quatro mulheres de uma mesma família, com Síndrome de Rapp-Hodgkin (RHS), doença autossômica dominante, clinicamente associada com displasia ectodérmica anidrótica e fenda labial e/ou palatina, portadoras de mutação germinativa do p63 exibiram menopausa prematura (todas ao redor dos 30 anos) e infertilidade [8].

Também está relatado que alelos selecionados para p63 e p73 estão associados com diminuição da fertilidade em pacientes submetidas à fertilização in vitro. Curiosamente, os alelos de risco dos genes p63 e p73 para infertilidade humana

são mais frequentes em pacientes com idade materna avançada. Estes dados são consistentes com a ideia de que o p63 e p73 podem desempenhar papéis importantes na manutenção da qualidade dos oócitos e da função do ovário em seres humanos [34].

Aspectos gerais da endometriose

A endometriose é uma desordem ginecológica definida como a presença de tecido endometrial em topografia extrauterina. Estes implantes ectópicos estão usualmente localizados na pelve, mas podem ocorrer em qualquer parte do corpo. É uma doença de curso crônico e benigno que tem grande prevalência em nosso meio e gera custos diversos aos sistemas de saúde e ao bem estar das pacientes [35, 36].

O primeiro relato sobre endometriose foi feito pelo alemão Carl Freiherr von Rokitsky no ano de 1860. Ele descreveu a visualização de tecido endometrial fora do útero em peças de necropsia [37]. Porém, foi John Albert Sampson que, em 1927, descreveu as alterações anatômicas ocasionadas pela doença e a teoria da menstruação retrógrada como gênese da endometriose. Esta teoria foi amplamente aceita durante a maior parte do século passado [38].

A endometriose é uma patologia heterogênea que tem uma grande variedade de apresentações clínicas e muitas vezes apresenta comportamento incerto. As principais características clínicas, secundárias à doença, são a dor pélvica crônica, a dismenorreia e a infertilidade. Porém, muitas vezes, a endometriose é assintomática, sendo que a dificuldade de gestar pode ser a única queixa relevante das pacientes [39].

A real incidência da endometriose é incerta, já que para o diagnóstico definitivo é necessária a videolaparoscopia com amostragem histopatológica e apenas casos selecionados são submetidos a este tipo de procedimento. Porém estima-se que cerca de 10% das pacientes em idade reprodutiva são afetadas pela doença [9]. Quando analisamos dados de pacientes em tratamento para infertilidade podemos observar uma prevalência de 30 a 50% [40, 41]. Levando-se em consideração as pacientes com dor pélvica crônica, a prevalência é de 30 a 80% [42].

O impacto econômico da doença também é relevante. Um estudo prospectivo realizado em 10 países que avaliou os gastos diretos e indiretos da endometriose estimou um valor anual de US\$ 12 419 por mulher afetada. Um terço deste valor compreende custos diretos de cuidados de saúde e dois terços são atribuídos à perda

de produtividade. Este estudo confirmou que as despesas necessárias para o tratamento da endometriose em centros de referência é similar ao de outras doenças crônicas, como o diabetes, a doença de Crohn e a artrite reumatoide [10].

A idade entre o surgimento dos sintomas e o diagnóstico da doença pode sofrer atrasos consideráveis. Em pacientes com infertilidade esse atraso costuma ser de até 3 anos. Já em pacientes com dor pélvica crônica, a demora pode chegar a 10 anos [43]. O intervalo tende a crescer quando os sintomas surgem na adolescência [44]. Esses dados podem ser explicados pelos sintomas inespecíficos e em vários graus de intensidade e pela complexidade necessária para o diagnóstico definitivo. Quanto maior o atraso no diagnóstico, mais impactante pode ser o déficit na qualidade de vida da paciente [45].

Uma das principais preocupações atuais da comunidade científica é desenvolver métodos mais simples e menos invasivos para o diagnóstico da endometriose. Isso se torna especialmente importante devido à complexidade atual para o diagnóstico e às diversas doenças que podem simular os sinais clínicos da doença, tais como a adenomiose, a síndrome do intestino irritável e a cistite intersticial. Uma revisão sistemática atual verificou que mais de 200 biomarcadores tem papel potencial no diagnóstico da endometriose, porém os autores concluíram que mais estudos são necessários para certificar a sua real utilidade. Em vista disso, até o momento nenhum biomarcador tem sensibilidade e especificidade suficientes para ser considerado confiável no diagnóstico [46].

Os focos de endometriose podem ocorrer em qualquer tecido do organismo, sendo a cavidade pélvica o sítio principal. Em ordem decrescente de frequência, encontramos os ovários, o fundo de saco anterior e posterior, os ligamentos largos e uterossacos, o útero, as tubas uterinas, cólon sigmoide e apêndice. Múltiplos implantes em múltiplos órgãos são encontrados na maioria das pacientes. Raramente, visualiza-se focos de endometriose em órgãos distantes da pelve, tais como o pulmão, o pâncreas, o fígado, os intestinos, o sistema nervoso central, entre outros [47].

A nível microscópico, todas as lesões têm um mesmo padrão histológico: estroma e glândulas endometriais ectópicas. Porém, a nível macroscópico, as apresentações clínicas são muito heterogêneas. A classificação de endometriose atualmente utilizada é a da ASRM. Ela classifica a doença em quatro grupos distintos: (I) mínima, (II) leve, (III) moderada e (IV) severa. Para isso, leva em consideração o tamanho, o aspecto e a profundidade dos focos de endometriose, a presença,

extensão e tipo de aderências e o grau de obliteração do fundo de saco vaginal [11]. Esta é uma classificação muito contestada, pois não consegue correlacionar de forma adequada os sinais clínicos com o estadiamento da doença [48]. Outros pesquisadores preferem classificar a endometriose em três entidades distintas: endometriose superficial, endometriose ovariana cística (endometrioma) e endometriose profunda [49].

Os processos fisiopatológicos que desencadeiam a doença permanecem ainda incertos. A teoria inicial de Sampson afirmava que os implantes ectópicos de endometriose surgiriam a partir do refluxo de sangue do útero para a cavidade pélvica, secundário a episódios sucessivos de menstruação retrógrada. Esse dado passou a ser contestado pois, na década de 1980, alguns trabalhos demonstraram que a menstruação retrógrada ocorre em até 80% das mulheres [50]. Como a prevalência da endometriose na população é de apenas 10%, a teoria de Sampson não bastava para explicar, isoladamente, a origem da doença. A partir desses dados surgiram novas teorias tentando explicar a gênese da endometriose, tais como a teoria dos restos embrionários, a teoria da metaplasia celômica, a teoria da metástase linfovascular, entre outras. O mais provável é que mais de um mecanismo esteja envolvido favorecendo a disseminação e sobrevivência dos focos de endometriose [47].

Além disso, falhas do sistema imunológico também podem estar envolvidas. A endometriose apresenta a maioria das características de uma doença autoimune: ativação policlonal de células B, anormalidades imunológicas na função de células B e T, apoptose aumentada, dano tecidual e envolvimento de múltiplos órgãos [51]. Essas falhas permitiriam que células endometriais se instalassem na cavidade pélvica sem serem destruídas iniciando assim o processo patológico. Essa suspeita parte do pressuposto que a endometriose tem associação clara com outras doenças autoimunes e/ou alérgicas, tais como o lúpus eritematoso sistêmico, o hipotireoidismo, a artrite reumatoide, a síndrome de Sjögren, a esclerose múltipla e a doença inflamatória intestinal [52]. Pode-se dizer que um dos grandes enigmas ainda obscuros da endometriose é desvendar o motivo pelo qual células endometriais viáveis na pelve podem desenvolver doença em algumas mulheres ou, em outras palavras, porque o organismo dessas mulheres não é capaz de impedir tal processo [53].

Há fortes evidências que fatores genéticos e ambientais influenciam a suscetibilidade individual para o desenvolvimento da endometriose. Existem dados demonstrando que a endometriose pode ser herdada de forma poligênica, uma vez que a incidência é 7 vezes maior em familiares em primeiro grau de uma mulher afetada, se comparadas com mulheres saudáveis [54]. Além disso, uma concordância em gêmeos também já foi descrita [55, 56] e vários polimorfismos gênicos associados com endometriose têm sido identificados, mas seu papel como causa da doença não foi comprovado, muitas vezes porque os resultados não foram replicados em estudos subsequentes [57, 58]. Até o momento, não está descrito o papel clínico de estudos genéticos para o diagnóstico e manejo da endometriose.

Aspectos hormonais da endometriose

A endometriose está associada a um estado inflamatório crônico e dependente de estrogênio [35, 59]. O tecido endometriótico possui características moleculares que o diferenciam claramente do endométrio típico normal. Mulheres com endometriose têm aumento do volume de líquido peritoneal, bem como aumento da concentração peritoneal de fatores pró-inflamatórios, como prostaglandinas (PG), proteases e citocinas, incluindo citocinas inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF α) e citocinas angiogênicas (IL-8 e VEGF) produzidos pelos macrófagos [60, 61]. O estado inflamatório é garantido pela atividade aumentada da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2), responsável pela conversão de precursores em PG (especialmente PGE₂ e PGF_{2 β}). As PG formadas possuem propriedades vasoconstritoras e provocam contração da musculatura uterina induzindo dismenorrea e dor pélvica crônica [62].

O estrogênio desempenha papel chave na gênese e manutenção da endometriose, pois garante a sobrevivência do tecido endometriótico (TE) e assim a persistência da doença [63]. A PG2 coordena estímulos que promovem a superexpressão de genes esteroidogênicos necessários para a produção de estrogênio no TE [64]. Sua ação é mediada pelos receptores de estrogênio intracelulares ER α e ER β que são translocados para o núcleo, onde ativam a transcrição gênica [65]. O principal estrogênio é o estradiol (E₂). Existem três fontes principais de produção de E₂ nas mulheres com endometriose: (1) os ovários, (2) a gordura e a pele e (3) o próprio tecido endometriótico (secundária atividade aumentada da enzima aromatase – enzima chave da fase final do processo de produção de E₂) [64].

Gênes ligados à angiogênese, linfoangiogênese [66, 67] e antiapoptóticos [68, 69] também estão superexpressos, favorecendo a proliferação do tecido endometriótico .

Essas alterações (inflamação e superprodução de estrogênio) também são observadas, de forma sutil, no endométrio tópico de mulheres com endometriose, quando comparado com endométrio de mulheres sadias [70].

O estresse oxidativo peritoneal é também considerado um dos principais constituintes da resposta inflamatória associada à endometriose. A produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS), secundárias a afluência peritoneal de pró-oxidantes como o heme e o ferro, podem provocar danos celulares e aumento da expressão de genes pró-inflamatórias através da ativação do fator nuclear kappa B (NF-kB) [71]. As células endometriais epiteliais e glandulares expressam o NF-kB. Uma vez ativado, o NF-kB promove inflamação, invasão, angiogênese, proliferação celular e inibição da apoptose no tecido endometriótico [72].

Outros estudos demonstram também a elevação da concentração sérica de citocinas inflamatórias nas mulheres com endometriose, sugerindo tratar-se de uma doença inflamatória sistêmica. Ainda não se pode afirmar se a inflamação predispõe ou se é resultado da endometriose [12].

Endometriose e infertilidade

Embora existam evidências clínicas demonstrando a associação entre endometriose e infertilidade, uma relação causal ainda não foi estabelecida. Estima-se que a taxa de fecundidade em casais normais seja de 15 a 20% por mês e diminui com o avanço da idade da mulher [73]. Já nas mulheres com diagnóstico de endometriose não tratada, essa taxa varia de 2 a 10% [74]. Mulheres com endometriose têm até 20 vezes mais chances de serem inférteis [75]. No Hospital de Clínicas de Porto Alegre, a endometriose foi o segundo achado laparoscópico mais frequente em pacientes em tratamento para infertilidade no serviço de Ginecologia e Obstetrícia [76].

Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar a ligação entre endometriose e subfertilidade. Porém é importante salientar que nenhum desses mecanismos comprovou tal associação [12]. A visão atual indica que a dificuldade para gestar secundária à endometriose seja multifatorial:

Distorção da anatomia pélvica

A endometriose está associada à formação de aderências pélvicas que podem prejudicar a liberação do oócito pelo ovário ou inibir a captura do óvulo e seu transporte. Esse substrato anatômico serve para explicar a infertilidade em casos de endometriose moderada a severa (de acordo com a classificação da ASRM), porém, não explica as situações de endometriose mínima ou leve [12, 77].

Alteração na função peritoneal

O fluido peritoneal rico em fatores pró-inflamatórios encontrado nas mulheres com endometriose pode trazer efeitos adversos aos oócitos, espermatozóides, embrião e função da tuba uterina [78]. Dados da literatura sugerem que a liberação de fatores pró-inflamatórios, tais como a interleucina (IL) 1 e 6 e o fator de necrose tumoral alfa (α -TNF) causam danos diretos à mobilidade dos espermatozóides e ao seu DNA (tempo e concentração dependentes) [79]. Além disso, outros fatores inibitórios e o estresse oxidativo podem dificultar ou impedir a capacitação espermática [80]. A superprodução de citocinas e de PG também afeta diretamente os oócitos e posteriormente os embriões, dificultando a implantação [81]. Todas essas interações podem impedir a reação acrossômica de fusão espermatozóide-oócito e o posterior desenvolvimento embrionário [82].

Alteração da função imune

Auto-anticorpos contra diversos antígenos do endométrio, bem como anticorpos do tipo IGA e IGG e linfócitos podem estar aumentados no endométrio de mulheres com endometriose. Esta alteração pode dificultar a receptividade do endométrio e a implantação do embrião [78].

Alterações endometriais

Após a fecundação, é necessário um endométrio adequado para que ocorra a implantação do embrião na cavidade uterina e manutenção da gestação. Algumas evidências sugerem que desordens na função endometrial podem causar defeitos na implantação do embrião e assim reduzir a fecundidade em mulheres com endometriose.

Mulheres com endometriose podem apresentar expressão aberrante do gene HOXA/10. Este gene está diretamente ligado a embriogênese do útero e na regeneração endometrial em cada ciclo menstrual. Sua expressão é necessária para receptividade endometrial. O pico de expressão de HOXA 10 ocorre durante a janela de implantação, logo, mulheres com expressão reduzida de HOXA 10 têm menores

taxas de nidação. Mulheres com endometriose apresentam déficit de expressão de HOXA10, o que pode explicar, em parte, a sua infertilidade [83].

A enzima aromatase não costuma estar presente no endométrio de mulheres saudáveis. Porém, ela está superexpressa no tecido endometriótico e no endométrio típico de mulheres com endometriose, explicando o excesso de estrogênio nesses sítios. Uma superprodução de estradiol pode afetar o desenvolvimento e receptividade do endométrio [84].

Há evidência que outros genes e proteínas também têm sua expressão e função alterados em pacientes com endometriose. A proteína avb3 integrina é uma molécula com função de adesão celular e é muito importante durante a fase de implantação do embrião. Dados sugerem que o gene responsável por sua transcrição é pouco expressado nesse grupo de pacientes [85]. Recentemente, níveis muito baixos de uma enzima envolvida na síntese de um ligante endometrial para L-selectina (a proteína que cobre o trofoblasto na superfície do blastocisto) tem sido observados em mulheres inférteis portadoras de endometriose [86, 87].

Além disso, o endométrio de mulheres com endometriose é resistente aos efeitos da progesterona. A progesterona induz a decidualização endometrial durante a fase lútea e sua presença é crucial para uma gestação normal. Os receptores de progesterona estão expressos de forma anormal no endométrio típico e no tecido endometriótico. Sem seus receptores a progesterona não contrapõe os efeitos do estrogênio no endométrio, tornando o ambiente hostil e não suscetível a implantação [88, 89].

Anormalidades endócrinas e ovulatórias

Tem sido proposto que mulheres com endometriose podem apresentar distúrbios ovulatórios e endócrinos, tais como a síndrome do folículo luteinizado não roto, disfunção de fase lútea, anormalidades do crescimento folicular e anormalidades na secreção de LH [77].

Estudos recentes também mostraram que mulheres inférteis e com endometriose apresentam redução da concentração sérica do hormônio anti-mülleriano (AMH), quando comparada com mulheres sem endometriose. O AMH é produzido pelos folículos ovarianos em crescimento (pré-antrais) e é considerado um bom marcador da reserva ovariana, pois não é afetado pela fase ciclo menstrual nem pelo uso de contraceptivos hormonais [90].

Qualidade dos óocitos e embriões

Mulheres com endometriose podem apresentar qualidade oocitária pobre resultando em embriões com menor capacidade de implantação [91]. Embriões resultantes de mulheres com endometriose parecem ter desenvolvimento mais lento quando comparados com embriões derivados de mulheres com doença tubária [92]. Além disso, dados sugerem que, em doação de oócitos, mulheres com endometriose moderada a severa, que recebem oócitos de mulheres sem endometriose apresentam receptividade endometrial e taxas de gestação dentro do esperado. Porém, quando os oócitos doados provém de mulheres com endometriose e são transferidos para mulheres sem a doença, a taxa de implantação é menor e a qualidade embrionária reduzida [93].

Anormalidade do transporte tubário

A inflamação pélvica promove piora na função e redução da motilidade da tuba uterina. Um estudo que utilizou a histerossalpingocintigrafia para avaliar a motilidade tubária, demonstrou que mulheres com endometriose e tuba uterina patente apresentaram uma taxa de anormalidade de condução superior ao grupo controle (composto de casais inférteis por causa masculina) [94]. Contrações miométriais desordenadas associadas à endometriose podem piorar o transporte dos gametas e implantação do embrião [95].

Destruição física do ovário

Uma apresentação clínica comum na endometriose é a produção de cistos e endometriomas. Esses cistos ocupam área física do ovário e causam destruição parcial ou total de sua estrutura. Uma redução da área funcional do ovário pode levar diretamente a diminuição da reserva ovariana com redução da população de folículos antrais e conseqüente redução da fertilidade [59].

A família p53 e endometriose

A Endometriose é uma doença relativamente benigna que mostra diferença de prevalência entre os diversos grupos étnicos. A doença tem origem multifatorial, possui componente poligênico e é influenciada por fatores ambientais [96]. Investigações moleculares têm relatado a origem monoclonal da endometriose, ou seja, a lesão é derivada de uma expansão clonal de uma única célula geneticamente alterada [97]. Esta característica demonstra o potencial proliferativo e, até mesmo, neoplásico (incluindo invasão local e disseminação para órgãos à distância) da endometriose [98].

Na prática, o potencial de transformação maligna do tecido endometriótico é baixo. Porém, quando ocorre, o sítio principal é o ovário (75% dos casos) [99, 100].

A partir desses dados, sugere-se que alterações gênicas podem representar evento importante na gênese da endometriose. A proteína de supressão tumoral p53 é o principal determinante da proliferação celular. Sua ativação induz estabilidade de crescimento e apoptose [101]. Alterações nos genes de supressão (incluindo o TP53) podem estar associados a desenvolvimento da doença [102].

A expressão do p53, por meio de análise imunohistoquímica, já foi demonstrada em diversos tumores. Inclusive há relatos de alterações na sua expressão em adenocarcinomas que se desenvolveram a partir de lesões de endometriose [103, 104]. Revisando a literatura, são escassos os estudos que avaliaram associação entre endometriose e polimorfismo da proteína p53. Nos relatos encontrados, demonstra-se alta frequência de deleções do locus p53 em espécimes de tecido endometriótico [13]. Um estudo demonstrou associação entre endometriose e polimorfismo do p53 através de experimentos que demonstraram que homozigotos para o primer Arg72 (forma arginina do códon 72 da proteína p53 – Arg/Arg) têm baixa susceptibilidade de desenvolvimento de doença, enquanto homozigotos ou heterozigotos para o primer Pro72 (forma prolina do códon 72 da proteína p53 – Arg/Pro ou Pro/Pro) estão associados a alta susceptibilidade de desenvolvimento de endometriose. Inclusive, sugerindo que o Pro72 da proteína p53 pode se tornar um marcador útil de predição de endometriose no futuro [14]. Outros autores encontraram expressão indetectável da proteína p53 em amostras de tecido endometriótico [105, 106].

Os demais componentes da família p53 (proteínas p63 e p73) também desempenham papel na supressão tumoral, de forma semelhante, porém menos evidente que a proteína p53. São escassos os estudos que avaliaram associação entre p63 ou p73 e endometriose [23]. A partir de evidências que sugerem que a endometriose resulta da deslocação do endométrio basal e que a proteína p63 tem papel na proliferação de tecido epitelial e é um marcador de células de reserva e basais do trato genital feminino, sugere-se a presença de alterações na expressão da proteína p63 em pacientes com endometriose [15].

Um estudo brasileiro avaliou a expressão da proteína p63 em diferentes subtipos de endometriose através de análise imunohistoquímica dos implantes (sem levar em consideração a presença ou ausência de infertilidade). Os resultados mostraram que a expressão da p63 foi elevada nos casos de endometriose peritoneal

e endometriomas, baixa nos casos de adenomiose e ausente nos casos de doença em septo retovaginal e parede pélvica. Não foi demonstrada diferenças de expressão nos diferentes estágios da doença peritoneal. Os autores concluíram que a endometriose apresenta formas de lesões com origens e evolução distintas [15] reforçando dados da literatura que sugerem que a endometriose profunda possui mecanismo patogênico distinto da endometriose peritoneal, assim como dos endometriomas, devendo estas três formas ser consideradas entidades separadas, com modelos patogênicos distintos, de uma mesma doença [107, 108].

Essas novas descobertas têm mostrado que a família p53, em especial a proteína p63, desempenha papel fundamental na reprodução humana, sendo a responsável pela manutenção da integridade gênica das células reprodutivas. Seu completo entendimento nos permite a possibilidade da criação novos tipos de tratamento para casais inférteis

Além disso, existe vários estudos demonstrando disfunções nos genes da família p53 em pacientes com endometriose endometriose. Porém, até o momento, não há relatos que comprovem, de forma definitiva, esta associação.

3. JUSTIFICATIVA

A família do gene p53 (proteínas p53, p63 e p73) desempenha papel fundamental na função reprodutiva. São responsáveis pela manutenção da integridade gênica das células somáticas e germinativas por meio de métodos de controle de dano celular e assim, são considerados “os guardiões do genoma”. A proteína p63 está sendo considerada a responsável pela manutenção da integridade gênica das células germinativas. Foi descrito que pacientes com alterações variáveis de expressão desta proteína podem ser inférteis.

Estudos mostram que pacientes com endometriose têm reduzida reserva ovariana, demonstrado pela redução dos níveis de Hormônio Anti-Mulleriano. Os ovários destas pacientes estão localizados num ambiente muito instável, o fluido peritoneal, ricos agentes inflamatórios. A ativação do gene p63 no ovário, pode resultar em morte celular e fertilidade reduzida.

Portanto, verificamos que não existem estudos na literatura médica sobre o papel desta proteína nas células da granulosa maduras de mulheres inférteis e levantamos a hipótese que as pacientes com endometriose podem ter expressão anormal da proteína p63, especialmente superexpressão, justificando a redução de sua reserva ovariana. Isto pode ser uma característica clínica comum em pacientes inférteis com endometriose e infertilidade.

A questão a ser respondida neste trabalho é se pacientes inférteis, com atenção especial às portadoras de endometriose, apresentam expressão do gene e/ou da proteína p63 alterada, podendo ser esse mais um fator que contribui para a gênese da infertilidade neste grupo de pacientes.

Este é um estudo inédito. Não há dados na literatura que avaliem expressão do gene e proteína p63 em células da granulosa luteinizadas de pacientes inférteis.

4. HIPÓTESE NULA

A expressão da proteína p63 em células da granulosa luteinizadas não está associada com o desenvolvimento folicular tardio em mulheres submetidas a IVF .

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO PRINCIPAL

- Pesquisar a expressão do gene 63 e de sua proteína em células da granulosa luteinizadas de pacientes inférteis submetidas a fertilização *in vitro*.

5.2. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Pesquisar se há diferença de expressão do gene 63 e de sua proteína em células da granulosa luteinizadas, comparando um grupo composto por pacientes com endometriose com um grupo controle.

- Avaliar se a diferença de expressão do gene e/ou proteína p63 está associada com a idade das pacientes.

- Avaliar se a diferença de expressão do gene e/ou proteína p63 está associada com os níveis hormonais séricos das pacientes.

- Avaliar se diferença de expressão do gene e/ou proteína p63 está associada com outros desfechos clínicos relacionados ao procedimento de fertilização *in vitro*, tais como resposta ovariana à indução da ovulação, quantidade e qualidade de embriões gerados.

- Estabelecer mais um mecanismo que pode explicar a origem da infertilidade em pacientes portadoras de endometriose.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gonfloni, S., et al., *Inhibition of the c-Abl-TAp63 pathway protects mouse oocytes from chemotherapy-induced death*. Nat Med, 2009. **15**(10): p. 1179-85.
2. Hu, W., T. Zheng, and J. Wang, *Regulation of Fertility by the p53 Family Members*. Genes Cancer, 2011. **2**(4): p. 420-30.
3. Harris, S.L. and A.J. Levine, *The p53 pathway: positive and negative feedback loops*. Oncogene, 2005. **24**(17): p. 2899-908.
4. Levine, A.J., W. Hu, and Z. Feng, *The P53 pathway: what questions remain to be explored?* Cell Death Differ, 2006. **13**(6): p. 1027-36.
5. Hu, W., *The role of p53 gene family in reproduction*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009. **1**(6): p. a001073.
6. Mills, A.A., et al., *p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis*. Nature, 1999. **398**(6729): p. 708-13.
7. Quade, B.J., et al., *Expression of the p53 homologue p63 in early cervical neoplasia*. Gynecol Oncol, 2001. **80**(1): p. 24-9.
8. Holder-Espinasse, M., et al., *A new mutation in TP63 is associated with age-related pathology*. Eur J Hum Genet, 2007. **15**(11): p. 1115-20.
9. Eskenazi, B. and M.L. Warner, *Epidemiology of endometriosis*. Obstet Gynecol Clin North Am, 1997. **24**(2): p. 235-58.
10. Simoens, S., et al., *The burden of endometriosis: costs and quality of life of women with endometriosis and treated in referral centres*. Hum Reprod, 2012. **27**(5): p. 1292-9.
11. *Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996*. Fertil Steril, 1997. **67**(5): p. 817-21.
12. *Endometriosis and infertility: a committee opinion*. Fertil Steril, 2012. **98**(3): p. 591-8.
13. Bischoff, F.Z., M. Heard, and J.L. Simpson, *Somatic DNA alterations in endometriosis: high frequency of chromosome 17 and p53 loss in late-stage endometriosis*. J Reprod Immunol, 2002. **55**(1-2): p. 49-64.
14. Chang, C.C., et al., *The proline form of p53 codon 72 polymorphism is associated with endometriosis*. Fertil Steril, 2002. **77**(1): p. 43-5.
15. Poli Neto, O.B., et al., *Expression of p63 differs in peritoneal endometriosis, endometriomas, adenomyosis, rectovaginal septum endometriosis, and abdominal wall endometriosis*. Arch Pathol Lab Med, 2007. **131**(7): p. 1099-102.
16. Cunha-Filho, J.S., et al., *Hyperprolactinemia and luteal insufficiency in infertile patients with mild and minimal endometriosis*. Horm Metab Res, 2001. **33**(4): p. 216-20.
17. Cunha-Filho, J.S., et al., *Prolactin and growth hormone secretion after thyrotrophin-releasing hormone infusion and dopaminergic (DA2) blockade in infertile patients with minimal/mild endometriosis*. Hum Reprod, 2002. **17**(4): p. 960-5.
18. Cunha-Filho, J.S., et al., *Physiopathological aspects of corpus luteum defect in infertile patients with mild/minimal endometriosis*. J Assist Reprod Genet, 2003. **20**(3): p. 117-21.
19. Cunha-Filho, J.S., et al., *Insulin-like growth factor (IGF)-1 and IGF binding protein-1 and -3 in the follicular fluid of infertile patients with endometriosis*. Hum Reprod, 2003. **18**(2): p. 423-8.
20. Lemos, N.A., et al., *Decreased anti-Mullerian hormone and altered ovarian follicular cohort in infertile patients with mild/minimal endometriosis*. Fertil Steril, 2008. **89**(5): p. 1064-8.
21. Melino, G., et al., *Functional regulation of p73 and p63: development and cancer*. Trends Biochem Sci, 2003. **28**(12): p. 663-70.
22. Kastan, M.B. and J. Bartek, *Cell-cycle checkpoints and cancer*. Nature, 2004. **432**(7015): p. 316-23.

23. Pflaum, J., S. Schlosser, and M. Muller, *p53 Family and Cellular Stress Responses in Cancer*. Front Oncol, 2014. **4**: p. 285.
24. Kurita, T., A.A. Mills, and G.R. Cunha, *Roles of p63 in the diethylstilbestrol-induced cervicovaginal adenosis*. Development, 2004. **131**(7): p. 1639-49.
25. Norimura, T., et al., *p53-dependent apoptosis suppresses radiation-induced teratogenesis*. Nat Med, 1996. **2**(5): p. 577-80.
26. Cullinan, E.B., et al., *Leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor expression in human endometrium suggests a potential autocrine/paracrine function in regulating embryo implantation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(7): p. 3115-20.
27. Vogiagis, D. and L.A. Salamonsen, *Review: The role of leukaemia inhibitory factor in the establishment of pregnancy*. J Endocrinol, 1999. **160**(2): p. 181-90.
28. Hu, W., et al., *p53 regulates maternal reproduction through LIF*. Nature, 2007. **450**(7170): p. 721-4.
29. Rotter, V., et al., *Mice with reduced levels of p53 protein exhibit the testicular giant-cell degenerative syndrome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(19): p. 9075-9.
30. Suh, E.K., et al., *p63 protects the female germ line during meiotic arrest*. Nature, 2006. **444**(7119): p. 624-8.
31. Livera, G., et al., *p63 null mutation protects mouse oocytes from radio-induced apoptosis*. Reproduction, 2008. **135**(1): p. 3-12.
32. Tomasini, R., et al., *TAp73 knockout shows genomic instability with infertility and tumor suppressor functions*. Genes Dev, 2008. **22**(19): p. 2677-91.
33. Yang, A., et al., *p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours*. Nature, 2000. **404**(6773): p. 99-103.
34. Feng, Z., et al., *Regulation of female reproduction by p53 and its family members*. FASEB J, 2011. **25**(7): p. 2245-55.
35. Bulun, S.E., *Endometriosis*. N Engl J Med, 2009. **360**(3): p. 268-79.
36. Moradi, M., et al., *Impact of endometriosis on women's lives: a qualitative study*. BMC Womens Health, 2014. **14**: p. 123.
37. Benagiano, G. and I. Brosens, *History of adenomyosis*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2006. **20**(4): p. 449-63.
38. Sampson, J.A., *Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation*. Am J Pathol, 1927. **3**(2): p. 93-110 43.
39. Becker, C.M., et al., *World Endometriosis Research Foundation Endometriosis Phenome and Biobanking Harmonisation Project: I. Surgical phenotype data collection in endometriosis research*. Fertil Steril, 2014.
40. Meuleman, C., et al., *High prevalence of endometriosis in infertile women with normal ovulation and normospermic partners*. Fertil Steril, 2009. **92**(1): p. 68-74.
41. D'Hooghe, T.M., et al., *Endometriosis and subfertility: is the relationship resolved?* Semin Reprod Med, 2003. **21**(2): p. 243-54.
42. Missmer, S.A., et al., *Incidence of laparoscopically confirmed endometriosis by demographic, anthropometric, and lifestyle factors*. Am J Epidemiol, 2004. **160**(8): p. 784-96.
43. Hadfield, R., et al., *Delay in the diagnosis of endometriosis: a survey of women from the USA and the UK*. Hum Reprod, 1996. **11**(4): p. 878-80.
44. Arruda, M.S., et al., *Time elapsed from onset of symptoms to diagnosis of endometriosis in a cohort study of Brazilian women*. Hum Reprod, 2003. **18**(4): p. 756-9.
45. Nnoaham, K.E., et al., *Impact of endometriosis on quality of life and work productivity: a multicenter study across ten countries*. Fertil Steril, 2011. **96**(2): p. 366-373 e8.
46. May, K.E., et al., *Endometrial alterations in endometriosis: a systematic review of putative biomarkers*. Hum Reprod Update, 2011. **17**(5): p. 637-53.
47. Macer, M.L. and H.S. Taylor, *Endometriosis and infertility: a review of the pathogenesis and treatment of endometriosis-associated infertility*. Obstet Gynecol Clin North Am, 2012. **39**(4): p. 535-49.

48. Roberts, C.P. and J.A. Rock, *The current staging system for endometriosis: does it help?* *Obstet Gynecol Clin North Am*, 2003. **30**(1): p. 115-32.
49. Nisolle, M. and J. Donnez, *Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities.* *Fertil Steril*, 1997. **68**(4): p. 585-96.
50. Halme, J., et al., *Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis.* *Obstet Gynecol*, 1984. **64**(2): p. 151-4.
51. Eisenberg, V.H., M. Zolti, and D. Soriano, *Is there an association between autoimmunity and endometriosis?* *Autoimmun Rev*, 2012. **11**(11): p. 806-14.
52. Matalliotakis, I., et al., *High rate of allergies among women with endometriosis.* *J Obstet Gynaecol*, 2012. **32**(3): p. 291-3.
53. Giudice, L.C. and L.C. Kao, *Endometriosis.* *Lancet*, 2004. **364**(9447): p. 1789-99.
54. Simpson, J.L., et al., *Heritable aspects of endometriosis. I. Genetic studies.* *Am J Obstet Gynecol*, 1980. **137**(3): p. 327-31.
55. Treloar, S.A., et al., *Genetic influences on endometriosis in an Australian twin sample.* *sueT@qimr.edu.au. Fertil Steril*, 1999. **71**(4): p. 701-10.
56. Hadfield, R.M., et al., *Endometriosis in monozygotic twins.* *Fertil Steril*, 1997. **68**(5): p. 941-2.
57. Bischoff, F. and J.L. Simpson, *Genetics of endometriosis: heritability and candidate genes.* *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2004. **18**(2): p. 219-32.
58. Guo, S.W., *Glutathione S-transferases M1/T1 gene polymorphisms and endometriosis: a meta-analysis of genetic association studies.* *Mol Hum Reprod*, 2005. **11**(10): p. 729-43.
59. de Ziegler, D., B. Borghese, and C. Chapron, *Endometriosis and infertility: pathophysiology and management.* *Lancet*, 2010. **376**(9742): p. 730-8.
60. Bedaiwy, M.A., et al., *Prediction of endometriosis with serum and peritoneal fluid markers: a prospective controlled trial.* *Hum Reprod*, 2002. **17**(2): p. 426-31.
61. Pizzo, A., et al., *Behaviour of cytokine levels in serum and peritoneal fluid of women with endometriosis.* *Gynecol Obstet Invest*, 2002. **54**(2): p. 82-7.
62. Jabbour, H.N., et al., *Prostaglandin receptors are mediators of vascular function in endometrial pathologies.* *Mol Cell Endocrinol*, 2006. **252**(1-2): p. 191-200.
63. Ryan, I.P. and R.N. Taylor, *Endometriosis and infertility: new concepts.* *Obstet Gynecol Surv*, 1997. **52**(6): p. 365-71.
64. Bulun, S.E., et al., *Regulation of aromatase expression in estrogen-responsive breast and uterine disease: from bench to treatment.* *Pharmacol Rev*, 2005. **57**(3): p. 359-83.
65. Silva, R.C., et al., *RsaI polymorphism of the ERbeta gene in women with endometriosis.* *Genet Mol Res*, 2011. **10**(1): p. 465-70.
66. Laschke, M.W., C. Giebels, and M.D. Menger, *Vasculogenesis: a new piece of the endometriosis puzzle.* *Hum Reprod Update*, 2011. **17**(5): p. 628-36.
67. Becker, C.M., et al., *Circulating endothelial progenitor cells are up-regulated in a mouse model of endometriosis.* *Am J Pathol*, 2011. **178**(4): p. 1782-91.
68. Taniguchi, F., et al., *Apoptosis and endometriosis.* *Front Biosci (Elite Ed)*, 2011. **3**: p. 648-62.
69. Nasu, K., et al., *Aberrant expression of apoptosis-related molecules in endometriosis: a possible mechanism underlying the pathogenesis of endometriosis.* *Reprod Sci*, 2011. **18**(3): p. 206-18.
70. Maybin, J.A., H.O. Critchley, and H.N. Jabbour, *Inflammatory pathways in endometrial disorders.* *Mol Cell Endocrinol*, 2011. **335**(1): p. 42-51.
71. Lousse, J.C., et al., *Peritoneal endometriosis is an inflammatory disease.* *Front Biosci (Elite Ed)*, 2012. **4**: p. 23-40.
72. Gonzalez-Ramos, R., et al., *Involvement of the nuclear factor-kappaB pathway in the pathogenesis of endometriosis.* *Fertil Steril*, 2010. **94**(6): p. 1985-94.
73. Schwartz, D. and M.J. Mayaux, *Female fecundity as a function of age: results of artificial insemination in 2193 nulliparous women with azoospermic husbands.* *Federation CECOS. N Engl J Med*, 1982. **306**(7): p. 404-6.

74. Hughes, E.G., D.M. Fedorkow, and J.A. Collins, *A quantitative overview of controlled trials in endometriosis-associated infertility*. Fertil Steril, 1993. **59**(5): p. 963-70.
75. Muse, K.N. and E.A. Wilson, *How does mild endometriosis cause infertility?* Fertil Steril, 1982. **38**(2): p. 145-52.
76. PalmaDias, R., *Indicações e achados diagnósticos em laparoscopias ginecológicas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre*. Rev. Atm 95/1,, 1995. **1**: p. 11-16.
77. Schenken, R.S., et al., *Etiology of infertility in monkeys with endometriosis: luteinized unruptured follicles, luteal phase defects, pelvic adhesions, and spontaneous abortions*. Fertil Steril, 1984. **41**(1): p. 122-30.
78. Lebovic, D.I., M.D. Mueller, and R.N. Taylor, *Immunobiology of endometriosis*. Fertil Steril, 2001. **75**(1): p. 1-10.
79. Mansour, G., et al., *The impact of peritoneal fluid from healthy women and from women with endometriosis on sperm DNA and its relationship to the sperm deformity index*. Fertil Steril, 2009. **92**(1): p. 61-7.
80. Carli, C., et al., *Up-regulation of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human endometriotic cells by macrophage migration inhibitory factor: involvement of novel kinase signaling pathways*. Endocrinology, 2009. **150**(7): p. 3128-37.
81. Akoum, A., et al., *Imbalance in the peritoneal levels of interleukin 1 and its decoy inhibitory receptor type II in endometriosis women with infertility and pelvic pain*. Fertil Steril, 2008. **89**(6): p. 1618-24.
82. Baker, M.A. and R.J. Aitken, *The importance of redox regulated pathways in sperm cell biology*. Mol Cell Endocrinol, 2004. **216**(1-2): p. 47-54.
83. Zanatta, A., et al., *The role of the Hoxa10/HOXA10 gene in the etiology of endometriosis and its related infertility: a review*. J Assist Reprod Genet, 2010. **27**(12): p. 701-10.
84. Zeitoun, K.M. and S.E. Bulun, *Aromatase: a key molecule in the pathophysiology of endometriosis and a therapeutic target*. Fertil Steril, 1999. **72**(6): p. 961-9.
85. Lessey, B.A., et al., *Aberrant integrin expression in the endometrium of women with endometriosis*. J Clin Endocrinol Metab, 1994. **79**(2): p. 643-9.
86. Genbacev, O.D., et al., *Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal interface*. Science, 2003. **299**(5605): p. 405-8.
87. Cakmak, H. and H.S. Taylor, *Molecular mechanisms of treatment resistance in endometriosis: the role of progesterone-hox gene interactions*. Semin Reprod Med, 2010. **28**(1): p. 69-74.
88. Lessey, B.A., et al., *Characterization of the functional progesterone receptor in an endometrial adenocarcinoma cell line (Ishikawa): progesterone-induced expression of the alpha1 integrin*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1996. **59**(1): p. 31-9.
89. Lessey, B.A., et al., *Endometrial progesterone receptors and markers of uterine receptivity in the window of implantation*. Fertil Steril, 1996. **65**(3): p. 477-83.
90. Shebl, O., et al., *Anti muellerian hormone serum levels in women with endometriosis: a case-control study*. Gynecol Endocrinol, 2009. **25**(11): p. 713-6.
91. Garrido, N., et al., *Follicular hormonal environment and embryo quality in women with endometriosis*. Hum Reprod Update, 2000. **6**(1): p. 67-74.
92. Pellicer, A., et al., *Exploring the mechanism(s) of endometriosis-related infertility: an analysis of embryo development and implantation in assisted reproduction*. Hum Reprod, 1995. **10 Suppl 2**: p. 91-7.
93. Garrido, N., et al., *The endometrium versus embryonic quality in endometriosis-related infertility*. Hum Reprod Update, 2002. **8**(1): p. 95-103.
94. Kissler, S., et al., *Diminished pregnancy rates in endometriosis due to impaired uterotubal transport assessed by hysterosalpingoscintigraphy*. BJOG, 2005. **112**(10): p. 1391-6.
95. Holoch, K.J. and B.A. Lessey, *Endometriosis and infertility*. Clin Obstet Gynecol, 2010. **53**(2): p. 429-38.
96. Ammendola, M., et al., *Association of p53 codon 72 polymorphism with endometriosis*. Fertil Steril, 2008. **90**(2): p. 406-8.

97. Jimbo, H., et al., *Evidence for monoclonal expansion of epithelial cells in ovarian endometrial cysts*. Am J Pathol, 1997. **150**(4): p. 1173-8.
98. Nakayama, K., et al., *Demonstration of focal p53 expression without genetic alterations in endometriotic lesions*. Int J Gynecol Pathol, 2001. **20**(3): p. 227-31.
99. Bayramoglu, H. and E. Duzcan, *Atypical epithelial changes and mutant p53 gene expression in ovarian endometriosis*. Pathol Oncol Res, 2001. **7**(1): p. 33-8.
100. Sainz de la Cuesta, R., et al., *Histologic transformation of benign endometriosis to early epithelial ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 1996. **60**(2): p. 238-44.
101. Polyak, K., et al., *A model for p53-induced apoptosis*. Nature, 1997. **389**(6648): p. 300-5.
102. Jiang, X., et al., *Microsatellite analysis of endometriosis reveals loss of heterozygosity at candidate ovarian tumor suppressor gene loci*. Cancer Res, 1996. **56**(15): p. 3534-9.
103. Han, A.C., et al., *Adenocarcinoma arising in extragonadal endometriosis: an immunohistochemical study*. Cancer, 1998. **83**(6): p. 1163-9.
104. Horiuchi, A., et al., *Ovarian yolk sac tumor with endometrioid carcinoma arising from endometriosis in a postmenopausal woman, with special reference to expression of alpha-fetoprotein, sex steroid receptors, and p53*. Gynecol Oncol, 1998. **70**(2): p. 295-9.
105. Schneider, J., et al., *c-myc, c-erb-B2, nm23 and p53 expression in human endometriosis*. Oncol Rep, 1998. **5**(1): p. 49-52.
106. Vercellini, P., et al., *Analysis of p53 and ras gene mutations in endometriosis*. Gynecol Obstet Invest, 1994. **38**(1): p. 70-1.
107. Somigliana, E., et al., *Association rate between deep peritoneal endometriosis and other forms of the disease: pathogenetic implications*. Hum Reprod, 2004. **19**(1): p. 168-71.
108. Kunz, G., et al., *Structural abnormalities of the uterine wall in women with endometriosis and infertility visualized by vaginal sonography and magnetic resonance imaging*. Hum Reprod, 2000. **15**(1): p. 76-82.

7. ARTIGO:

**“p63 gene and protein expression in granulosa luteinized cells of infertile
womens submitted to in vitro fertilization”**

Este artigo será submetido à revista Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism

**p63 GENE AND PROTEIN EXPRESSION IN GRANULOSA LUTEINIZED CELLS
OF INFERTILE PATIENTS SUBMITTED TO IN VITRO FERTILIZATION**

Chiesa, JJ; Cossio L; da Silva, DS; de Conto, E; Chapon, R; Cunha-Filho JS

Abstract

Introduction: The p63 gene is the most ancient member of the components of p53 family and is described as the gene for maintaining of genic integrity and cell cycle regulation in immature germ cells. However, there are no reports in the literature evaluating its expression in granulosa cells luteinized. Endometriosis is a chronic disease that is associated with infertility. Several mechanisms have been proposed to explain this association, but so far, none of them is considered definitive.

Objectives: The purpose of this study is to evaluate the expression of the p63 gene and protein in granulosa luteinized cells of infertile patients undergoing in vitro fertilization (IVF). Also, we checked whether patients with endometriosis have abnormal function of p63.

Methods: We performed a prospective cross-sectional study. We collected granulosa cells of 28 patients undergoing IVF to evaluate p63 expression. Then, to study the effect on endometriosis, they were divided into two groups: (1) study group (n = 9): patients with laparoscopic diagnosis of endometriosis and (2) control group (n = 19): infertile patients for other reasons, without endometriosis. The collected cells were prepared and analyzed for gene expression (real time PCR) and protein expression (immunofluorescence). The results were compared between the groups.

Results: There was no significant difference in expression of the p63 gene between the groups. The median of $2^{-\Delta\Delta CT}$ in the the control group was 0.93 (95% CI, 0.55 to 2.83) and 0.88 in the study group (95% CI, 0.24 to 2.84). The results also showed that the p63 gene is not expressed in granulosa cells in both groups. About to the p63 protein expression, immunofluorescence showed no expression in either group.

Conclusion: The p63 gene and protein can be very important in maintaining the genic integrity of immature reserve follicles, not dependent of FSH. However, after the recruitment and follicular growth is not more observed its expression, suggesting that p63 is not part of control of oocyte maturation and development.

Keywords: "p63 gene", "p63 protein", "p53 family", "Infertility", "Endomeriosis".

Introduction

Human cells are continuously exposed to external and internal stressors agents, which can cause damage to its integrity and its genome. To ensure the survival of organisms, cells have developed numerous defense strategies and damage control mediated by genes [1]. The p53 family is the most important representative of these group of genes [2].

The p53 family is composed by transcription factors p53, p63 and p73. Their encoding genes are very similar and regulate the transcription of a subset of proteins in common or unique for each gene. Thus they have similar functions and mechanism of action [3, 4].

Human tumor protein p53, often described as the “guardian of the genome,” is the best known and celebrated transcription factor of this group. Together with its target genes they play key roles in cell damage control of somatic cell and promotes genetic stability preventing the formation of tumors [5]. The regulation of the cellular response to the DNA (deoxyribonucleic acid) damage aggression occurs through apoptosis, DNA repair, senescence or cell cycle arrest [6]. These mechanisms are older than the human species and can already be found 1 billion years ago [7]. The cell control methods eliminate cells with DNA damaged before becoming tumor cells ensuring the maintenance of the genome.

The p63 protein is encoded by the TP63 gene. It is a more ancestral member of the p53 family during evolution. Its presence is essential for the correct craniofacial, limbs, and skin development [8]. It also ensure the differentiation of the epithelium of Mullerian ducts [9].

In addition, p63 protein is being considered responsible for the maintenance of genetic integrity of germ cells. The TAp63 α isoform is constitutively expressed in female germ cells during meiotic arrest and is essential in a process of DNA damage-induced oocyte death, caused by cytotoxic agents, not involving p53 [10].

In humans, there are reports of infertile patients with changes of p63 expression [11, 12]. Moreover, there are reports showing the p63 gene expression in germinative cells of mice, but none of these did the investigation in mature ovarian cells, as luteinized granulosa cells.

Furthermore, we also hypothesized that patients with endometriosis may have abnormal expression of p63 protein. His excessive activation could cause loss of ovarian cells and infertility.

Materials and methods

Design

We performed a prospective cross-sectional study.

Selection of patients

The patients were selected from a group of women undergoing the first treatment for infertility with clinical indication of in vitro fertilization (IVF) in a clinic for human reproduction. All patients were informed about the procedures and signed an informed consent form. Our research project was approved by the bioethics committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

A total of 28 patients were analyzed and included in the study. After, they were divided into two groups, according to the cause of infertility. In the study group were included patients with minimal or mild endometriosis. And in the control group were included patients with infertility by male factor or tubal factor, without endometriosis.

The presence or absence of endometriosis was verified by laparoscopy. When present, was staged as endometriosis criteria of American Society of Reproductive Medicine (1997) [25]. Infertility was diagnosed as the absence of pregnancy after one year of regular sexual intercourse without contraception [25].

Inclusion criteria were age equal to or less than 40 years, normal ovarian reserve and regular menstrual cycles (range 21-35 days). We excluded patients older than 40 years old, with ovarian cysts (including endometriomas) and the carriers of endocrine disorders such as polycystic ovary syndrome, hyperprolactinemia, hypothyroidism, among others.

Ovulation induction was performed with antagonist protocol with luteal estradiol and recombinant FSH in appropriate doses for each patient. The hCG administration criterion was the presence of at least 3 follicles of 17 mm.

Obtaining granulosa cells

After the follicular aspiration and separation of oocytes, granulosa cells from each patient were prepared for analysis of gene and protein expression proposed in the study. The pool of granulosa cell was placed on plates with G-MOPS™ buffered medium, supplemented with human serum albumin and antibiotic (gentamicin). The granulosa cells were washed 6 times in 100uL droplets G-MOPS™ medium with

elimination of any impurities such as blood clots. After washing, the cells were centrifuged at 200xg for 10 minutes and resuspended in fresh medium G-MOPS™. All procedures were performed on heating stage at 37 ° C and the G-MOPS medium was prepared at least 12 hours before the procedure.

The cells were divided into two portions. One part of cells was placed in cryotubes and frozen at -80°C for subsequent RNA (ribonucleic acid) extraction. The other part (20uL) was resuspended and fixed with 200uL of formaldehyde (dilution 100x), after was done the citospin (1000rpm by 5 minutes) with 100uL (in duplicates).

Assessment of Gene expression

Extraction of total RNA from aspirated granulosa cells was performed using the RNeasy™ extraction kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. After extraction, the material was treated with DNase I (Invitrogen). The conversion to cDNA was performed using Superscript II™ enzyme (Invitrogen), from 1 microgram of total RNA.

The RNA extracted was stored at -80°C and the cDNA was stored at -20°C.

The assessment of the gene expression levels of p63 gene was performed by real-time PCR (qPCR) using TaqMan assay, following the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [26]. The equipment used for assessment of qPCR was StepOne™ System (Life Technologies).

Assessment of Protein Expression

The immunofluorescence technique was performed following the protocol: (1) Permeabilization of the sample using PBS solution - Triton100X 0.25% for 15 minutes. (2) Wash with PBS solution, three times for 5 minutes. (3) Blocking reaction using PBST solution - BSA 1% for 30 minutes. (4) Wash with PBS three times for 5 minutes. (5) Incubation with primary antibody Monoclonal Mouse Antibody to Human p63 (DBS Pleasanton-CA, cat # Mob 306) in a dilution of 1:50 over-night at 4 °C. (6) Wash with PBS three times for 5 minutes. (7) Incubation with secondary antibody Donkey Anti-Mouse IgG H & L (Alexa Fluor 647, Abcam, cat # ab150107) in a dilution of 2UG/ml at room temperature protected from light during 1 hour. (8) Wash with PBS three times for 5 minutes. (9) Incubation with Fluoroshield™ with DAPI - F6057 (Sigma) for 1 minute. (10) Mounting with cover slip and seal with enamel. (11) After sealing, the samples were stored at -20 ° C protected from light.

For analysis of the slides we used the Olympus BX51 micrscópio, with 40x magnification.

Statistical analysis

Categorical variables were compared using chi-square test. For continuous variables we used the t student test for those with normal distribution and Mann Whitney test for those with non-parametric distribution. We also evaluate the correlation between the variables using Pearson correlation coefficient. The significance level was 5% and the power of this study was 80%.

The analysis of gene expression data was done with $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [26]. This method is very convenient for analyzing changes in expression of a particular gene for quantitative data from qPCR when we compare a specific genic expression between two groups.

Results

A total of 28 patients were included in this study and were divided in two groups. In the study group (n = 9) were included infertile patients with confirmed diagnosis of endometriosis. In the control group (n = 19) were included infertile patients by others reasons, like tubal factor, male factor and one case of unknown cause (table 1).

The overall mean age of patients was 32.9 years (32.2 years in the control group and 32.1 years in study group) (table 2).

Regarding the kind of infertility, only one patient of control group had become pregnant before. All other had primary infertility.

The descriptive analysis of data of all patients are shown in Table 2.

Gene expression (qPCR)

We used the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method to analyze data produced by qPCR.

Applying the formula, we found values that demonstrated no significant difference in p63 gene expression between the groups. The median was 0,93 in the control group (IC 95%, 0,55-2,83) and 0,88 in study group (IC 95%, 0,24-2,84) (Graph 1). The results also shown that p63 gene is not expressed in the granulosa cells in the two studied groups.

We performed the correlation between the values obtained of gene expression by qPCR with age ($r=-0.271$), qPCR with serum levels of AMH ($r=-0.073$) and qPCR

with number of oocytes aspirated ($r=-0.028$). In all these cases we found a poor correlation.

Protein expression (immunofluorescence)

Immunofluorescence was applied on a smaller patient sample. We conducted the test in 16 patients (6 in the study group and 10 in the control group). There was no expression of p63 protein in any of the samples (Figure 1).

Discussion

Several studies have shown that the transcription factor p63 may be the main regulator of the cell cycle in germ cells by controlling cell division and can induce apoptosis when there is damage to the genetic material. Our work found no expression of p63 gene and protein in granulosa luteinized cells of infertile patients submitted to IVF. Moreover, we did not observe any difference between the endometriosis group and the control group.

Our results are unpublished in medical literature. This is the first time that p63 gene and protein expression were investigated in granulosa luteinized cells. There are some reports showing the overexpression of p63 gene in germinative cells of mice. In these works the cells were submitted to an acute stimulation with cytotoxic agents (cisplatin and ionizing radiation), as described by Gonfloni et al [27]. The result was an acute damage to the genetic material of cells promoting p63 gene overexpression and cell death by apoptosis. In our study, we did not use external stressors to genetic material. The granulosa cells were obtained from patients after ovulation induction. Stressor agents, if present, were endogenous and specific to each patient, such as the inflammatory peritoneal fluid in patients with endometriosis.

We have not shown abnormal expression of p63 in ovarian cells of patients with endometriosis. There are few reports in the literature aimed at this evaluation. Poli Neto et al study showed that there were differences in expression of p63 protein between different kinds of endometriosis injuries being overexpressed in peritoneal disease and endometrioma, but without taking into account the presence of infertility in the sample [28]. Our group of patients had only minimal or mild disease. Being endometriosis a very heterogeneous disease, with multiple facets, it is possible that our results will not be replicated if expression of p63 will be investigated in patients with other stages of the disease.

Another hypothesis should be raised is that there was no expression of p63 in granulosa cells because the sample obtained from mature follicles. It is well established that p63 gene, in particular the isoform TAp63 α , is the most important regulator of fidelity genic protection in germinative cells during the meiotic arrest [16]. Therefore, we can expect a hypothetical increase of p63 expression in imatures follicles of ovaries and the p63 could even be a facilitator or promoter of follicular atresia by cellular apoptosis.

Since the p63 was not expressed during follicular growth, we hypothesized that this gene is not associated with follicular development in already dependent stages of stimulation by FSH. The most likely is that it has its main role in the control of the primary follicles that are at rest in the ovary. If any genetic damage will be present in cells of a follicle in early stage, probably the cells would suffer apoptosis and the follicle would enter in atresia process.

We could criticize our paper regarding the homogeneity of our subjects (all caucasians). Would be better if a more heterogeneous group had been used. Furthermore, the fact that all controlled ovarian stimulation used exactly the same protocol. Finally, we only had selected patients with a good prognosis before IVF, with a normal ovarian reserve and without endocrinopathies.

In conclusion, our paper was important because it brought a new concept about p63 gene. Although this gene is essential in protecting genetic material of immature follicles, through apoptosis and cell cycle control, we found that p63 is not expressed at all stages of follicular development. Thus, p63 is not an important element in more advanced stages of follicular growth, dependent of FSH stimulation.

Bibliography

1. Kastan, M.B. and J. Bartek, Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*, 2004. 432(7015): p. 316-23.
2. Yang, A., et al., On the shoulders of giants: p63, p73 and the rise of p53. *Trends Genet*, 2002. 18(2): p. 90-5.
3. Melino, G., et al., Functional regulation of p73 and p63: development and cancer. *Trends Biochem Sci*, 2003. 28(12): p. 663-70.

4. Hu, W., T. Zheng, and J. Wang, Regulation of Fertility by the p53 Family Members. *Genes Cancer*, 2011. 2(4): p. 420-30.
5. Pflaum, J., S. Schlosser, and M. Muller, p53 Family and Cellular Stress Responses in Cancer. *Front Oncol*, 2014. 4: p. 285.
6. Levine, A.J. and M. Oren, The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer*, 2009. 9(10): p. 749-58.
7. Belyi, V.A., et al., The origins and evolution of the p53 family of genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010. 2(6): p. a001198.
8. Yang, A., et al., p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature*, 1999. 398(6729): p. 714-8.
9. Kurita, T., A.A. Mills, and G.R. Cunha, Roles of p63 in the diethylstilbestrol-induced cervicovaginal adenosis. *Development*, 2004. 131(7): p. 1639-49.
10. Suh, E.K., et al., p63 protects the female germ line during meiotic arrest. *Nature*, 2006. 444(7119): p. 624-8.
11. Feng, Z., et al., Regulation of female reproduction by p53 and its family members. *FASEB J*, 2011. 25(7): p. 2245-55.
12. Holder-Espinasse, M., et al., A new mutation in TP63 is associated with age-related pathology. *Eur J Hum Genet*, 2007. 15(11): p. 1115-20.
13. Bulun, S.E., Endometriosis. *N Engl J Med*, 2009. 360(3): p. 268-79.
14. Moradi, M., et al., Impact of endometriosis on women's lives: a qualitative study. *BMC Womens Health*, 2014. 14: p. 123.
15. Eskenazi, B. and M.L. Warner, Epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 1997. 24(2): p. 235-58.
16. Becker, C.M., et al., World Endometriosis Research Foundation Endometriosis Phenome and Biobanking Harmonisation Project: I. Surgical phenotype data collection in endometriosis research. *Fertil Steril*, 2014.
17. de Ziegler, D., B. Borghese, and C. Chapron, Endometriosis and infertility: pathophysiology and management. *Lancet*, 2010. 376(9742): p. 730-8.
18. D'Hooghe, T.M., et al., Endometriosis and subfertility: is the relationship resolved? *Semin Reprod Med*, 2003. 21(2): p. 243-54.
19. Meuleman, C., et al., High prevalence of endometriosis in infertile women with normal ovulation and normospermic partners. *Fertil Steril*, 2009. 92(1): p. 68-74.

20. Lemos, N.A., et al., Decreased anti-Mullerian hormone and altered ovarian follicular cohort in infertile patients with mild/minimal endometriosis. *Fertil Steril*, 2008. 89(5): p. 1064-8.
21. Shebl, O., et al., Anti muellerian hormone serum levels in women with endometriosis: a case-control study. *Gynecol Endocrinol*, 2009. 25(11): p. 713-6.
22. Endometriosis and infertility: a committee opinion. *Fertil Steril*, 2012. 98(3): p. 591-8.
23. Nezhat, F., et al., The relationship of endometriosis and ovarian malignancy: a review. *Fertil Steril*, 2008. 90(5): p. 1559-70.
24. Van Gorp, T., et al., Endometriosis and the development of malignant tumours of the pelvis. A review of literature. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2004. 18(2): p. 349-71.
25. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril*, 1997. 67(5): p. 817-21.
26. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001. 25(4): p. 402-8.
27. Gonfloni, S., et al., Inhibition of the c-Abl-TAp63 pathway protects mouse oocytes from chemotherapy-induced death. *Nat Med*, 2009. 15(10): p. 1179-85.
28. Poli Neto, O.B., et al., Expression of p63 differs in peritoneal endometriosis, endometriomas, adenomyosis, rectovaginal septum endometriosis, and abdominal wall endometriosis. *Arch Pathol Lab Med*, 2007. 131(7): p. 1099-102

Table 1: Descriptive analysis of patients

	n	Minimum	maximum	Mean	σ
<i>Age</i>	28	21	40	32,93	0,83
<i>FSH levels</i>	21	3,1	10,8	6,80	1,97
<i>Estradiol levels</i>	17	27	220	68,82	48,15
<i>AMH levels</i>	26	0,6	8,11	3,52	2,41
<i>Follicules ≥ 17 mm</i>	27	1	15	5,44	3,30
<i>Oocytes recuperated</i>	28	1	15	7,46	3,54
<i>Generated Embryos</i>	28	1	10	4,54	2,64
<i>Embryo escore D3</i>	28	0	100	63,21	25,35

Table 2: Patients divided according to the cause of infertility

<i>Group</i>	<i>Reason of infertility</i>	<i>N</i>	<i>%</i>
Study group	Endometriosis	9	32,1
Control group	Male factor	12	42,9
	Tubal factor	6	21,4
	Unknown	1	3,6
Total		28	100

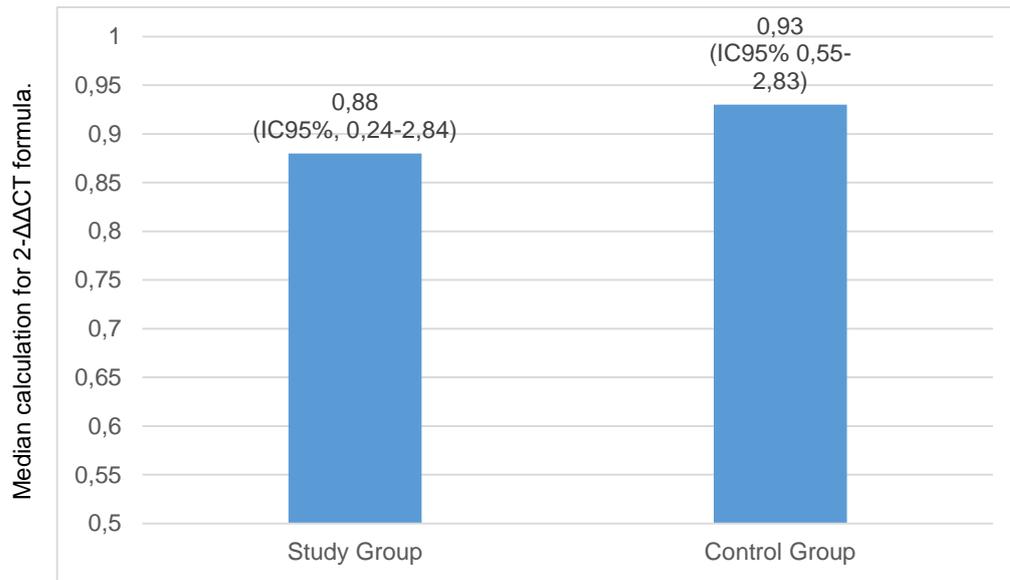
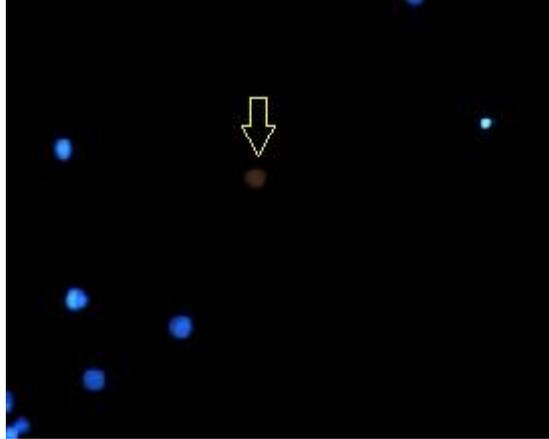
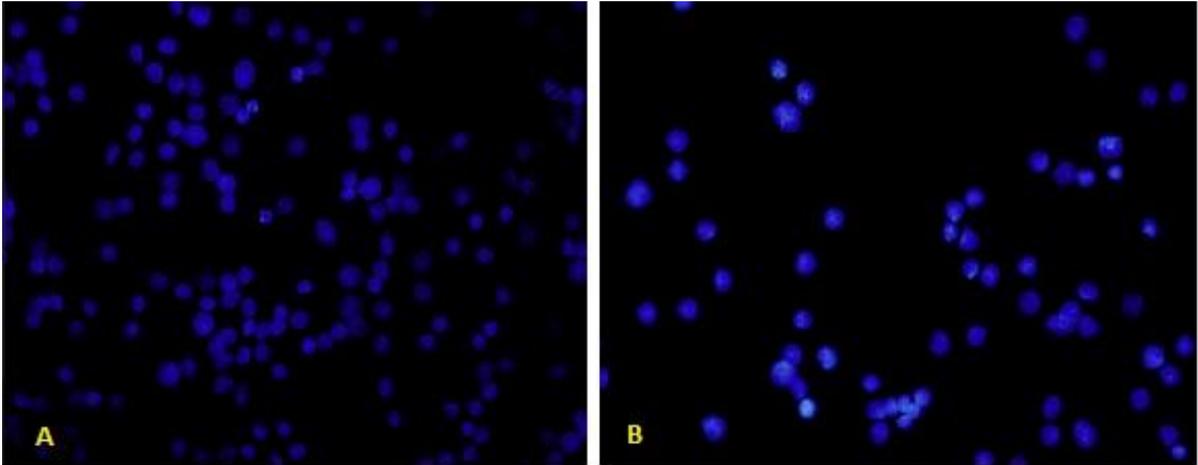
Graph1: p63 gene expression.

Figure 1: Immunofluorescence showing a single cell stained positive for p63 protein



Immunofluorescence showing a single cell stained positive for p63 protein granulosa (red cell). This result demonstrates the positive control necessary to standardize the analysis of the remaining samples.

Figure 2: Immunofluorescence showing granulosa cells stained with DAPI



Immunofluorescence showing granulosa cells stained with DAPI (blue cell). Note that does not occur expression of p63 protein. Sample A is part of control group and the sample B is part of study group.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O gene e a proteína p63 não são expressos em células da granulosa humanas luteinizadas em mulheres submetidas a IVF.

Não existe diferença de expressão gênica em células da granulosa humanas luteinizadas, quando comparamos pacientes com e sem endometriose.

Não existe correlação entre a expressão gênica do p63 com idade, reserva ovariana (correlação com níveis séricos de AMH) e resposta ovariana frente a indução da ovulação (correlação com número de oócitos recuperados após punção folicular).

A proteína p63 não é uma proteína com função importante em células germinativas maduras luteinizadas.

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

Embora a natureza inédita dos resultados obtidos pelo nosso trabalho e o novo conceito que se apresenta, o campo de estudo da família p53, seus mecanismos de ação e funcionalidades, permanece muito amplo e com muito a ser desvendado.

Falando especificamente em reprodução humana, possivelmente o próximo passo a ser dado será a realização de pesquisas envolvendo a expressão gênica e protéica da p63 em células germinativas de pacientes submetidas a outros protocolos de tratamento em reprodução humana. Deve-se buscar também a inclusão de um grupo mais heterogêneo na amostra a fim de tornar os resultados aplicáveis a uma maior parcela da população.

10. ANEXOS

Anexo 1: Protocolo de indução do ovulação

Anexo 2: Protocolo de obtenção de células da granulosa

Anexo 3: Protocolo de aplicação do qPCR

Anexo 4: Protocolo de aplicação da imunofluorescência

Anexo 5: Classificação da endometriose conforme American Society of Reproductive Medicine (1997)

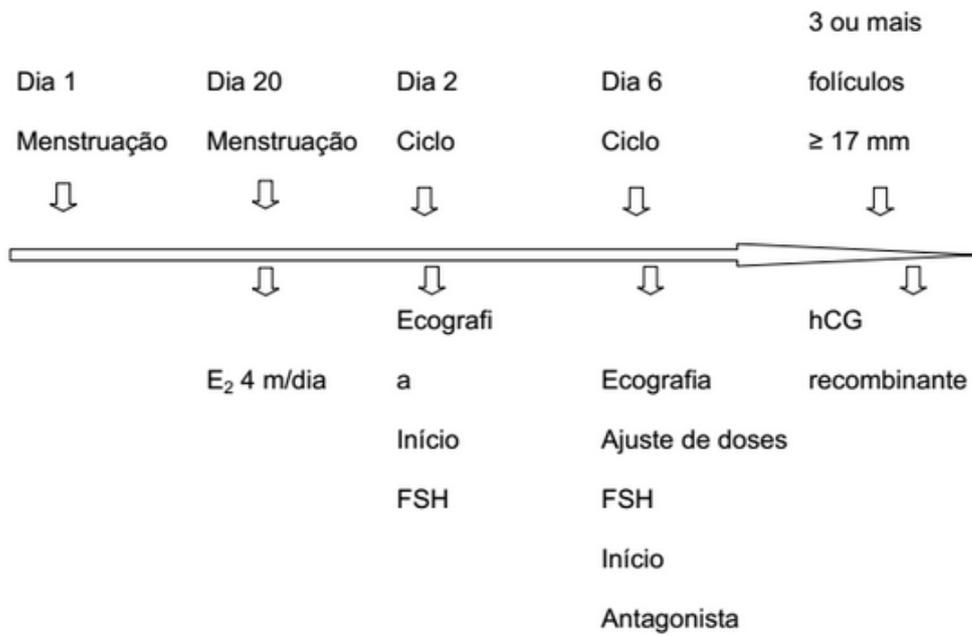
Anexo 6: Ficha de coleta dos dados

Anexo 7: Termo de consentimento informado – grupo controle

Anexo 8: Termo de consentimento informado – grupo estudo

Anexo 9: STROBE Statement—checklist of items that should be included in reports of observational studies

Anexo 1: Protocolo de indução do ovulação



Anexo 2: Protocolo de obtenção de células da granulosa

Após punção folicular o pool de células da granulosa de uma mesma paciente é colocado em placas de cultivo com meio G-MOPS™ suplementado com HSA (Albumina Sérica Humana) e antibiótico (gentamicina). As células da granulosa são lavadas 6 vezes em gotas de 100uL de meio G-MOPS™ e com o auxílio de uma agulha de insulina todo coágulo de sangue é separado das células quando necessário. Após lavagem as células são centrifugadas a 200xg por 10 minutos e re-suspendidas em meio G-MOPS™ fresco. As células são colocadas em criotubos para posterior congelamento ou serem analisadas conforme projeto de pesquisa.

Todo procedimento é realizado sobre mesa térmica a 37°C e o meio G-MOPS™ é preparado com no mínimo 12 horas antes do procedimento.

- G-MOPS™ – Meio de bancada
- HSA – Albumina Sérica Humana (fonte de proteína)
- Gentamicina - Antibiótico

Anexo 3: Protocolo de aplicação do qPCR

Avaliação da expressão do gene

A extração do RNA total das células da granulosa foi realizada utilizando o kit de extracção RNeasy™(Qiagen) seguindo as instruções do fabricante.

Após a extração, o material foi tratado com DNAase I™ (Invitrogen). A conversão para cDNA foi realizada utilizando a enzima Superscript II™ (Invitrogen), a partir de 1 micrograma de RNA total.

O RNA extraído foi armazenado a -80 ° C e o cDNA foi armazenado a -20 ° C.

A avaliação dos níveis de expressão do gene p63 do gene foi realizada por PCR em tempo real (qPCR), utilizando o ensaio TaqMan, seguindo o método 2- $\Delta\Delta$ CT [26].

O equipamento utilizado para avaliação da qPCR foi System™ StepOne (Life Technologies).

Anexo 4: Protocolo de aplicação da imunofluorescência

A técnica de imunofluorescência foi realizada seguindo o protocolo:

- (1) Permeabilização da amostra, utilizando solução PBS - Triton100X 0,25% durante 15 minutos.
- (2) Lavagem com solução de PBS, três vezes, durante 5 minutos.
- (3) Bloqueio da reação usando solução PBST - BSA a 1% durante 30 minutos.
- (4) Lavagem três vezes com PBS durante 5 minutos.
- (5) Incubação com o anticorpo primário monoclonal Monoclonal Mouse Antibody to Human p63 (DBS Pleasanton-CA, cat # Mob 306) numa diluição de 1:50 durante a noite a 4 ° C.
- (6) Lavagem três vezes com PBS durante 5 minutos.
- (7) Incubação com o anticorpo secundário Donkey Anti-Mouse IgG H & L (Alexa Fluor 647, Abcam, cat # ab150107) numa diluição de 2UG/ml à temperatura ambiente ao abrigo da luz durante 1 hora.
- (8) Lavagem três vezes com PBS durante 5 minutos.
- (9) Incubação com Fluoroshield™ com DAPI - F6057 (Sigma) durante 1 minuto.
- (10) Montagem com cobertura de vidro e vedação com esmalte.
- (11) Após a selagem, as amostras foram armazenadas a -20 ° C ao abrigo da luz.

Para a análise das lâminas foi utilizado o microscópio Olympus BX51, com aumento de 40x.

Anexo 5: Classificação da endometriose conforme American Society of Reproductive Medicine (1997)



AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE REVISED CLASSIFICATION OF ENDOMETRIOSIS

Patient's Name _____ Date _____
 Stage I (Minimal) - 1-5 Laparoscopy _____ Laparotomy _____ Photography _____
 Stage II (Mild) - 6-15 Recommended Treatment _____
 Stage III (Moderate) - 16-40
 Stage IV (Severe) - >40
 Total _____ Prognosis _____

PERITONEUM	ENDOMETRIOSIS	< 1cm	1-3cm	> 3cm
	Superficial	1	2	4
Deep	2	4	6	
OVARY	R Superficial	1	2	4
	Deep	4	16	20
	L Superficial	1	2	4
	Deep	4	16	20
POSTERIOR CULDESAC OBLITERATION		Partial	Complete	
		4	40	
OVARY	ADHESIONS	< 1/3 Enclosure	1/3-2/3 Enclosure	> 2/3 Enclosure
	R Filmy	1	2	4
	Dense	4	8	16
	L Filmy	1	2	4
Dense	4	8	16	
TUBE	R Filmy	1	2	4
	Dense	4*	8*	16
	L Filmy	1	2	4
	Dense	4*	8*	16

*If the fimbriated end of the fallopian tube is completely enclosed, change the point assignment to 16.

Anexo 6: Ficha de coleta dos dados

FICHA COLETA DE DADOS - EXPRESSÃO DA PROTEÍNA P63 EM PACIENTES INFÉRTEIS COM DIAGNÓSTICO DE ENDOMETRIOSE

GRUPO: Casos () Controles () NÚMERO: _____

a. Identificação

Nome: _____

Idade: _____ Data da coleta: ___/___/___

Raça: (1) Branca (2) Negra (3) Oriental (4) Parda (5) Outra _____

b. Causa de infertilidade:

- (1) Endometriose
 (2) Fator tubário
 (3) Fator masculino
 (4) Outro _____

c. d. Histórico gestacional

Gestações: _____

Nascidos vivos: _____

Abortos espontâneos: _____

Óbitos fetais: _____

e. Dosagens hormonais basais

<i>FSH 3º dia ciclo</i>	
<i>Estradiol</i>	
<i>Progesterona</i>	
<i>HAM</i>	
<i>TSH</i>	
<i>Prolactina</i>	
<i>CA-125</i>	

f. Dados ecográficos

Contagem de folículos antrais: _____

g. Indução ovulação/coleta de oócitos

Nº de folículos > 17mm: _____

Nº de oócitos recuperados: _____

Nº de embriões gerados: _____

Escore embrionário 3º dia: _____

Nº de embriões transferidos: _____

Escore embrião transferido: _____

g. Técnica de RA

- (0) ICSI
 (1) FIV convencional

h. Tipo de Infertilidade

- (0) Primária
 (1) Secundária

CÉLULAS DA GRANULOSA

Expressão protéica p63 (imuno)

- (0) Negativa
 (1) Positiva

Expressão gênica tap63 (PCR-RT)

- (0) Ausente
 (1) Presente

Expressão gênica B-act (PCR-RT)

- (0) Ausente
 (1) Presente

Cálculo 2- $\Delta\Delta$ CT method

CT p63: _____

CT bactina: _____

2- $\Delta\Delta$ CT: _____

Anexo 7: Termo de consentimento informado – grupo controle

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO CONTROLE

Gostaríamos de convidá-la a participar do estudo **“EXPRESSÃO DO GENE E DA PROTEÍNA p63 EM CÉLULAS DA GRANULOSA LUTEINIZADAS DE PACIENTES INFÉRTEIS SUBMETIDAS A FERTILIZAÇÃO IN VITRO”**. Este estudo tem como objetivo principal a realização de um trabalho científico para um melhor entendimento da associação entre endometriose e infertilidade.

As pacientes participantes serão divididas em dois grupos (grupo estudo e grupo controle). Você está sendo convidada para fazer parte do grupo controle, que é composto de pacientes inférteis, devido a fator masculino ou fator tubário. O grupo de estudo será composto de pacientes inférteis e portadoras de endometriose.

Nosso estudo vai avaliar se existem alterações de função da proteína p63 (uma proteína que está associada à regulação da fertilidade em humanos) em mulheres com endometriose e em mulheres sem endometriose, submetidas a fertilização *in vitro*.

Para você os benefícios serão indiretos, uma vez que os resultados ajudarão a entender melhor as origens desta doença e sua associação com infertilidade e, desta forma, definir tratamentos mais eficazes e individualizados para pacientes portadoras de endometriose no futuro.

Você não terá riscos nem custos financeiros adicionais se decidir participar deste estudo. Não haverá mudança no seu tratamento (momento da punção dos folículos e medicações utilizadas para indução da ovulação), que será realizado rotineiramente pela equipe do Centro de Reprodução Humana Insemine.

A primeira etapa do projeto será realizada no Centro de Reprodução Humana Insemine, onde, após punção dos folículos ovarianos e separação dos oócitos, os pesquisadores utilizarão o fluido folicular e as células da granulosa (material que é descartado e não tem utilidade para o seu tratamento) para investigação. A segunda etapa será realizada no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, onde aquele material isolado inicialmente será avaliado através de diversos testes laboratoriais.

Eu, _____, fui informada dos objetivos do estudo, especificados acima, e da justificativa desta pesquisa de forma clara e detalhada. Recebi informações de que não serei submetida a nenhum procedimento adicional àquele proposto para fertilização *in vitro*. Além disto, sei que novas informações, obtidas durante o estudo,

poderão ser fornecidas para mim e terei a liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, se assim for de minha vontade. O profissional certificou-me de que as informações por mim fornecidas terão caráter confidencial e que não terei nenhum gasto ou custo adicional para participar da pesquisa.

Nome completo da paciente: _____

Assinatura da paciente: _____

Pesquisadores Responsáveis: Prof. João Sabino da Cunha Filho e Dr. Joelmir José Chiesa

Assinatura do Pesquisador Responsável: _____

Endereço dos pesquisadores responsáveis:

- Serviço de Ginecologia e Obstetrícia (CESGO), 11º andar, sala 1117, localizada no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, nº2350, CEP 90035-903, Porto Alegre, RS.

Telefone de contato: (51) 2101 8117.

Em caso de necessidade de esclarecimentos éticos relacionadas à pesquisa, você poderá entrar em contato com o *Comitê de Ética em Pesquisa* do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo telefone (51) 3359 7640.

Este termo de consentimento foi elaborado em duas vias, uma delas será fornecida para a paciente e a outra ficará sob a guarda do pesquisador responsável.

Porto Alegre, _____ de _____ de 2014.

Anexo 8: Termo de consentimento informado – grupo estudo

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO DE ESTUDO

Gostaríamos de convidá-la a participar do estudo estudo **“EXPRESSÃO DO GENE E DA PROTEÍNA p63 EM CÉLULAS DA GRANULOSA LUTEINIZADAS DE PACIENTES INFÉRTEIS SUBMETIDAS A FERTILIZAÇÃO IN VITRO”**. Este estudo tem como objetivo principal a realização de um trabalho científico para um melhor entendimento da associação entre endometriose e infertilidade.

As pacientes participantes serão divididas em dois grupos (grupo estudo e grupo controle). Você está sendo convidada para fazer parte do grupo de estudo, que é composto de pacientes inférteis e portadoras de endometriose. O grupo controle será composto de pacientes inférteis que têm como causa da infertilidade, alterações no fator masculino ou no fator tubário.

Nosso estudo vai avaliar se existem alterações de função da proteína p63 (uma proteína que está associada à regulação da fertilidade em humanos) em mulheres com endometriose e em mulheres sem endometriose, submetidas a fertilização *in vitro*.

Para você os benefícios serão indiretos, uma vez que os resultados ajudarão a entender melhor as origens desta doença e sua associação com infertilidade e, desta forma, definir tratamentos mais eficazes e individualizados para pacientes portadoras de endometriose no futuro.

Você não terá riscos nem custos financeiros adicionais se decidir participar deste estudo. Não haverá mudança no seu tratamento (momento da punção dos folículos e medicações utilizadas para indução da ovulação), que será realizado rotineiramente pela equipe do Centro de Reprodução Humana Insemine.

A primeira etapa do projeto será realizada no Centro de Reprodução Humana Insemine, onde, após punção dos folículos ovarianos e separação dos oócitos, os pesquisadores utilizarão o fluido folicular e as células da granulosa (material que é descartado e não tem utilidade para o seu tratamento) para investigação. A segunda etapa será realizada no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, onde aquele material isolado inicialmente será avaliado através de diversos testes laboratoriais.

Eu, _____, fui informada dos objetivos do estudo, especificados acima, e da justificativa desta pesquisa de forma clara e detalhada. Recebi informações de que não serei submetida a nenhum procedimento adicional àquele proposto

para fertilização *in vitro*. Além disto, sei que novas informações, obtidas durante o estudo, poderão ser fornecidas para mim e terei a liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, se assim for de minha vontade. O profissional certificou-me de que as informações por mim fornecidas terão caráter confidencial e que não terei nenhum gasto ou custo adicional para participar da pesquisa.

Nome completo da paciente: _____

Assinatura da paciente: _____

Pesquisadores responsáveis: Prof. João Sabino da Cunha Filho e Dr. Joelmir José Chiesa

Assinatura do pesquisador responsável: _____

Endereço dos pesquisadores responsáveis:

- Serviço de Ginecologia e Obstetrícia (CESGO), 11º andar, sala 1117, localizada no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, nº2350, CEP 90035-903, Porto Alegre, RS.

Telefone de contato: (51) 2101 8117.

Em caso de necessidade de esclarecimentos éticos relacionadas à pesquisa, você poderá entrar em contato com o *Comitê de Ética em Pesquisa* do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo telefone (51) 3359 7640.

Este termo de consentimento foi elaborado em duas vias, uma delas será fornecida para a paciente e a outra ficará sob a guarda do pesquisador responsável.

Porto Alegre, _____ de _____ de 2014.

Anexo 9: STROBE Statement—checklist of items that should be included in reports of observational studies

	Page	Recommendation
Title and abstract	36	(a) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract (NA) (b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found
Introduction		
Background/rationale	37	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported
Objectives	37	State specific objectives, including any prespecified hypotheses
Methods		
Study design	38	Present key elements of study design early in the paper
Setting	38	Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection
Participants	38	(a) <i>Cohort study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants. Describe methods of follow-up (NA) <i>Case-control study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of case ascertainment and control selection. Give the rationale for the choice of cases and controls (NA) <i>Cross-sectional study</i>—Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants (b) <i>Cohort study</i> —For matched studies, give matching criteria and number of exposed and unexposed (NA) <i>Case-control study</i> —For matched studies, give matching criteria and the number of controls per case (NA)
Variables	38-39	Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable
Data sources/ measurement	38-40	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group
Bias	NA	Describe any efforts to address potential sources of bias
Study size	38-40	Explain how the study size was arrived at
Quantitative variables	38-40	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why
Statistical methods	40	(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding (b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions (c) Explain how missing data were addressed (NA) (d) <i>Cohort study</i> —If applicable, explain how loss to follow-up was addressed (NA) <i>Case-control study</i> —If applicable, explain how matching of cases and controls was addressed (NA) <i>Cross-sectional study</i>—If applicable, describe analytical methods taking account of sampling strategy

(e) Describe any sensitivity analyses		
Results		
Participants	40	(a) Report numbers of individuals at each stage of study—eg numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed (b) Give reasons for non-participation at each stage (NA) (c) Consider use of a flow diagram (NA)
Descriptive data	40, 45	(a) Give characteristics of study participants (eg demographic, clinical, social) and information on exposures and potential confounders (b) Indicate number of participants with missing data for each variable of interest (c) <i>Cohort study</i> —Summarise follow-up time (eg, average and total amount)
Outcome data	40, 41	<i>Cohort study</i> —Report numbers of outcome events or summary measures over time <i>Case-control study</i> —Report numbers in each exposure category, or summary measures of exposure <i>Cross-sectional study</i> —Report numbers of outcome events or summary measures
Main results	42	(a) Give unadjusted estimates and, if applicable, confounder-adjusted estimates and their precision (eg, 95% confidence interval). Make clear which confounders were adjusted for and why they were included (b) Report category boundaries when continuous variables were categorized (c) If relevant, consider translating estimates of relative risk into absolute risk for a meaningful time period
Other analyses	NA	Report other analyses done—eg analyses of subgroups and interactions, and sensitivity analyses
Discussion		
Key results	41	Summarise key results with reference to study objectives
Limitations	42	Discuss limitations of the study, taking into account sources of potential bias or imprecision. Discuss both direction and magnitude of any potential bias
Interpretation	42	Give a cautious overall interpretation of results considering objectives, limitations, multiplicity of analyses, results from similar studies, and other relevant evidence
Generalisability	42	Discuss the generalisability (external validity) of the study results
Other information		
Funding	NA	Give the source of funding and the role of the funders for the present study and, if applicable, for the original study on which the present article is based

NA: Not applicable

*Give information separately for cases and controls in case-control studies and, if applicable, for exposed and unexposed groups in cohort and cross-sectional studies.

Note: An Explanation and Elaboration article discusses each checklist item and gives methodological background and published examples of transparent reporting. The STROBE checklist is best used in conjunction with this article (freely available on the Web sites of PLoS Medicine at <http://www.plosmedicine.org/>, Annals of Internal Medicine at <http://www.annals.org/>, and Epidemiology at <http://www.epidem.com/>). Information on the STROBE Initiative is available at www.strobe-statement.org.