

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CLÍNICA MÉDICA

**AVALIAÇÃO DE IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1), IGFBP-1 e IGFBP-3
(Insulin-like Growth Factor Binding Protein-1 e 3) NO FLUÍDO FOLICULAR
DE PACIENTES INFÉRTEIS COM ENDOMETRIOSE**

Nadiane Albuquerque Lemos

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Pandolfi Passos

Co-Orientador: Dr. João Sabino L. da Cunha-Filho

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

2002

F178i Lemos, Nadiane Albuquerque

Avaliação de IGF-1 (insulin-like growth factor-1), IGFBP-1 E
IGFBP-3 (insulin-like growth factor binding protein-1 e 3) no fluido
folicular de pacientes inférteis com endometriose / Nadiane
Albuquerque Lemos ; orient. Eduardo Paldolfi Passos, João
Sabino Lahorgue Cunha Filho. – Porto Alegre, 2002.

70 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina:
Clínica Médica.

1. Líquido folicular 2. Endometriose 3. Infertilidade feminina 4. Fator
de crescimento insulin-like-1 5. Proteína 1 de ligação a fator de
crescimento insulin-like 6. Proteína 3 de ligação a fator de crescimento
insulin-like I. Passos, Eduardo Paldolfi II. Cunha Filho, João Sabino
Lahorgue II. Título.

NLM: WP 390

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CLÍNICA MÉDICA

**AVALIAÇÃO DE IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1), IGFBP-1 e IGFBP-3
(Insulin- like Growth Factor Binding Protein-1 e 3) NO FLUÍDO FOLICULAR DE
PACIENTES INFÉRTEIS COM ENDOMETRIOSE.**

Nadiane Albuquerque Lemos

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Pandolfi Passos

Co-Orientador: Dr. João Sabino L. da Cunha-Filho

Coordenador do Curso: Prof. Dr. Flávio Danni Fuchs

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

2002

Dedico este trabalho aos meus pais, Elza e Antonio Carlos, e ao Cristiano por existirem, por serem parte da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Desejo agradecer a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a execução deste trabalho e, em especial:

- Ao professor e amigo Eduardo P. Passos, pelas oportunidades pelo estímulo e responsabilidade na minha formação;
- Ao amigo Dr. João Sabino, pela confiança e credibilidade na execução deste trabalho, pelo exemplo, correção e apoio irrestrito;
- Ao Prof. Fernando Freitas, pelas oportunidades e apoio;
- Ao Prof. José Antonio Magalhães, pelas oportunidades e exemplo profissional.
- Ao Prof. Paulo Naud;
- A Dra. Andrea Facin pelo trabalho e contribuição;
- A Bióloga Mariana Faller;
- A Dra. Karin Kiefer pela eficiente ajuda e cooperação;
- As colegas de estudo.
- Ao laboratório do HCPA, em especial ao Bioquímico Francisco
- A estatística Vânia

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	07
1. INTRODUÇÃO.....	08
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	10
2.1 Aspectos gerais da endometriose	10
2.2 Aspectos hormonais da endometriose	11
2.3 Fatores de crescimento.....	14
2.3.1 Atividade dos <i>IGFs</i> em ciclos induzidos.....	17
2.3.2 <i>IGFs</i> e Endometriose.....	18
3. OBJETIVOS	20
4. REFERÊNCIAS.....	21
5. ARTIGO ORIGINAL - INGLÊS	29
6. ARTIGO - VERSÃO EM PORTUGUÊS.....	48
7. ANEXOS.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS

FSH	hormônio folículo estimulante
GH	hormônio do crescimento
HCG	gonadotrofina coriônica humana
IGF	fator de crescimento semelhante à insulina
IGFBP	proteína carreadora de IGF
IMC	índice de massa corporal
LH	hormônio luteinizante
m²	metro-quadrado
ml	mililitro
UI	unidades internacionais
ng	nanograma
pg	picograma
rpm	rotações por minuto
kg	quilograma
sc	subcutâneo

1. INTRODUÇÃO

A endometriose, ocorrência de tecido endometrial ectópico, desde a sua primeira descrição, por Rokitansky em 1860, vem sendo uma das patologias mais estudadas em ginecologia. É estimada que 10 a 15% da população feminina apresenta endometriose em algum período de sua vida, esta paciente podem ser assintomáticas, ou com um quadro clínico variado que pode ser caracterizado por dor pélvica, infertilidade, dismenorréia e, ou dispareunia.

A associação entre endometriose e infertilidade já é bem estabelecida, a prevalência de endometriose chega a 60% se considerarmos apenas pacientes inférteis. Diversos estudos vêm tentando explicar esta relação, porém as justificativas encontradas não atingem todas as apresentações desta patologia, principalmente quando não existe um comprometimento anatômico identificado. A hipótese de associação de vários fatores; anatômicos, imunológicos endometriais e hormonais vêm sendo estudada na tentativa de esclarecer esta associação.

Pacientes inférteis com endometriose quando submetidas a programas de fertilização assistida tem prognóstico reprodutivo discutível, enquanto alguns autores atribuem os resultados ao grau da patologia outros atribuem a próprias características de apresentação e influências do ambiente e ação hormonal. Alterações do micro-ambiente, como o meio folicular, podem estar relacionadas à infertilidade e endometriose.

Os fatores de crescimento, denominados "insulin-like growth factors" (IGFs), presentes no fluído folicular, podem estar associados com a qualidade do desenvolvimento oocitário/folicular e vem ganhando importância na medicina reprodutiva. Os IGFs constituem uma família de polipeptídicos de estrutura similar a insulina. O ovário

seria um dos sítios de produção, recepção e ação dos IGFs. Os IGFs-1 são encontradas em folículos pré-antrais e dominantes, os receptores destes IGFs estão presentes nas células da teca e granulosa. As IGFbps (Insulin-like Growth Factors Binding Protein) são descritas como reguladoras do efeito dos IGFs na função ovariana, pela ação dos peptídeos ou efeito direto na esteroidogênese ovariana.

O estudo dos IGFs no micro ambiente folicular em mulheres inférteis com endometriose tem como objetivo avaliar uma possível alteração ovulatória sutil como causa de infertilidade neste grupo de pacientes.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Aspectos gerais da endometriose

A endometriose é definida como presença de tecido glandular e estroma endometriais fora da cavidade uterina (OLIVE & SCHWARTZ, 1993; KONINCKX, 1994; NISOLLE & DONNEZ, 1997). Em 1927, SAMPSON foi o primeiro a caracterizar a endometriose como uma patologia responsável por alterações na pelve feminina, embora a primeira descrição da patologia seja de Rockitansky em 1860. Em 1998, LEYENDECKER descreve a endometriose como uma alteração de extremo pleiomorfismo. Este autor, em revisão, discute a endometriose como doença da unidade endometrial-subendometrial. A etiopatogenia da endometriose, ocorrência de tecido endometrial ectópico, está baseada em diversas teorias, as mais conhecidas e aceitas são da metaplasia celômica, dos implantes ectópicos e da indução de células multipotenciais.

É estimado que 10% a 15% da população feminina apresente endometriose (MUSE & WILSON, 1982; BANCROFT, WILLIAMS, ELSTEIN, 1989; OLIVE & SCHWARTZ, 1993). A endometriose pode ser assintomática ou com variabilidade de apresentação clínica caracterizada por desconforto pélvico, dismenorréia, dispareunia e, ou incapacidade de gestar. É uma patologia de importância clínica ginecológica e na medicina reprodutiva sendo foco constante de pesquisas (LEYENDECKER et al., 1999, HERBERTZ & MALL, 1998). Mulheres com endometriose tem 20 vezes mais chances de serem inférteis (MUSE, 1982, KONINCKX, 1994, BARACAT, 1995). Trinta a 60% das pacientes com endometriose apresentam infertilidade associada (KISTNER, 1975; BANCROFT, WILLIAMS, ELSTEIN, 1989; OLIVE & SCHWARTZ, 1993; KONINCKX, 1994).

No Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, a endometriose foi o principal achado laparoscópico em pacientes com dor pélvica e o segundo diagnóstico entre as com infertilidade (PALMA DIAS et al., 1995). Pacientes inférteis com endometriose moderada ou severa, classificadas segundo a Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (ASRM), apresentam um substrato anatômico para sua incapacidade de gestar. Porém, para a etiologia da infertilidade em pacientes com endometriose mínima ou leve vários são os mecanismos propostos, sem, até o momento, uma definição clara (MUSE & WILSON, 1982; OLIVE & HANEY, 1986; CANDIANI et al., 1991; INOUE et al., 1992; OLIVE & SCHWARTZ, 1993; SHAW et al., 1995).

2.2. Aspectos hormonais na endometriose

Alterações hormonais foram descritas por vários autores, em diferentes estudos, tentando relacionar as alterações existentes e a incapacidade de gestar das pacientes com endometriose. Foram encontradas anormalidades na secreção de progesterona, estradiol, prolactina e na função lútea das pacientes inférteis com endometriose, porém os achados são conflitantes. Comparando pacientes com e sem endometriose, a prevalência de folículo não roto foi superior entre as pacientes com endometriose (MIO et al., 1992). Entretanto o estigma ovulatório foi observado em 33% das pacientes inférteis com endometriose, associando esta patologia à alteração hormonal, provavelmente, não associada à síndrome de folículo não roto (DMOWSKI, RAO, SCOMMEGNA, 1980). Em estudo experimental, com ratas, a endometriose e infertilidade foi associada com foliculogênese alterada (MOON et al., 1993). Estudos destacaram associação de endometriose e anovulação, galactorréia, síndrome de folículo não roto, secreção anômala de prolactina e insuficiência lútea (MUSE & SCHARTZ, 1982 e HANEY, 1993). As pacientes com endometriose teriam secreção anômala de hormônio

luteinizante (LH) (CHEENSMAN et al., 1982). A insuficiência lútea seria mais prevalente em pacientes inférteis com endometriose que com causa desconhecida (CHEENSMAN et al., 1983). Embora, outros estudos não tenham verificado diferença significativa na prevalência de insuficiência lútea e endometriose (MATORRAS et al., 1995). A disfunção da fase lútea foi descrita por vários autores (PITTAWAY et al., 1983; RÖMBERG, KAUPPILA, RAJANIEMI, 1984 e AYERS, BIRENBAUM, MENON, 1987). Enquanto outros encontraram diminuição de progesterona, em pacientes com endometriose, na secreção sérica e no líquido peritoneal (BARRY-KINSELLA et al., 1993). A alteração na secreção de estradiol e progesterona pode ser alguma das alterações hormonais de pacientes com endometriose mínima (TUMMON et al., 1988). A luteinização e folículo não roto nos ciclos observados e a baixa concentração de progesterona na fase lútea em pacientes com endometriose sugere uma diversidade em anormalidades endócrinas relacionadas à etiologia da endometriose e infertilidade (BANCROFT, WILLIAMS, ELSTEIN, 1992).

A endometriose foi associada com anovulação em 17% das pacientes avaliadas mediante um escore obtido de suas anamneses (SOULES et al., 1976). Outros autores relacionaram alguns aspectos hormonais das pacientes com endometriose; a segunda fase de seu ciclo foi menor em relação ao grupo controle e a secreção de progesterona ocorreu apenas dois dias após a secreção máxima do LH. Quando da realização da biópsia de endométrio, nestas pacientes, cerca de 25% das pacientes com endometriose apresentaram endométrio fora de fase e em apenas 21% a identificação característica de ovulação foi feita por ocasião da laparoscopia, contra 94% do grupo controle. Os autores concluíram que as pacientes com endometriose apresentam alterações da secreção de progesterona com provável anormalidade ovulatória. Contudo, as medidas de progesterona total, estradiol e LH não foram diferentes entre os grupos (CORVELEYN, 1978, BROSENS, KONINCKX, 1994).

Analisando estudos de pacientes com endometriose submetidas a técnicas de reprodução assistida não foram encontradas diferenças nas taxas de gestação nos diferentes estágios de endometriose, sem diferença na resposta a ciclos de fertilização in vitro. Vários são os mecanismos envolvidos na etiologia da infertilidade nos diferentes estágios da endometriose (DOKRAS et al., 1999). O prognóstico reprodutivo das pacientes inférteis com endometriose não é relacionado ao grau de endometriose, e sim a características da patologia (CAHILL & OLSON 2000).

Avaliando ciclos estimulados, em mulheres com endometriose, com a concentração de esteróides e qualidade de embrião, a taxa de implantação de embrião foi menor em pacientes com endometriose, diminuindo a taxa de fertilização, levantando a controvérsia das possíveis causas; a qualidade do embrião ou o seu ambiente. Analisando o embrião de pacientes submetidas à fertilização in vitro com e sem endometriose, ocorreu uma diferença significativa no número de blastômeros, que foi menor nas pacientes com endometriose quando comparadas aos seus controles, o que pode sugerir alterações oocitárias, resultando em embriões com menor habilidade de divisão celular (PELLICER et al., 1998).

Em estudo de caso-controle, a resposta ovariana a repetidos ciclos estimulados para fertilização in vitro em pacientes com endometriose demonstra que a fertilização in vitro é tratamento efetivo para este grupo de mulheres, mas são necessários ciclos repetidos de tratamento para o sucesso de gestação. Estes autores concluíram que o grupo com endometriose exigiu mais ampolas de hormônio folículo estimulante (FSH) por ciclo, com uma diferença ainda maior quando realizados ciclos subseqüentes. Entretanto, a taxa cumulativa de gestação foi de 63.3% e 62.6% por cinco ciclos e a taxa de nascimentos de 46.8 e 50.9% respectivamente entre as pacientes com endometriose ovariana e obstrução tubária, similar em ambos os grupos. Concluindo, portanto, que a

diminuição da resposta ovariana ao FSH não diminui as chances do tratamento com fertilização in vitro (AL-AZEMIR et al., 2000). Alterações oocitárias e embrionárias com conseqüente diminuição na capacidade de implantação e qualidade embrionária em pacientes com endometriose sugere a etiologia da infertilidade neste grupo (GARRIDO et al., 2000). A associação de endometriose com disfunção pituitária-ovariana sugere uma alteração na função folicular com alteração de LH, uma capacidade reduzida do folículo pré-ovulatório, com redução da habilidade de fertilização do oócito e distúrbio da função lútea (CAHILL & HULL, 2000).

A presença da associação entre endometriose, hiperprolactinemia e insuficiência lútea recentemente foi descrita como possível causa de infertilidade no grupo de paciente sem dano tubário, por uma disfunção ovulatória. Estes autores observaram que pacientes com endometriose mínima e leve apresentam alterações na fase folicular precoce caracterizada pela diminuição dos níveis séricos de estradiol bem como pela prevalência de hiperprolactinemia e insuficiência lútea. Os níveis séricos de estradiol foram menores e de prolactina foram maiores em pacientes com endometriose. Para caracterização da fase lútea foram medidas as dosagens de progesterona e realizada biópsia de endométrio, onde ocorreu diminuição da progesterona e, endométrio fora de fase em pacientes inférteis com endometriose (CUNHA-FILHO et al., 2001, 2002).

2.3 Fatores de crescimento

Os fatores de crescimento, semelhantes a insulina, denominados insulin-like growth factors (IGF) foram descritos pela sua capacidade de sulfatar cartilagens mediadas pelo hormônio do crescimento (GH). Seu estudo foi incrementado após a década de 70 e, atualmente, sabe-se da sua importância em medicina reprodutiva pela

caracterização de vários tipos de IGF e diferentes tipos de proteínas “carreadoras” de IGF, as IGFbps presentes no líquido folicular (JONES & CLEMMONS, 1995). Os IGFs constituem família de polipeptídios de estrutura similar a insulina, exercendo uma variedade de ações metabólicas. Os IGF-1 são descritos em folículos pré-antrais e dominantes, e possuem receptores específicos ovarianos. Os receptores de IGF-1 estão presentes nas células da granulosa de folículos dominantes, os receptores de IGF-2 são encontrados nas células da teca e da granulosa; no fluído folicular são identificadas IGF-1 e 2 (YEN et al.,1999). A proteína carreadora do IGF-1 tem uma estrutura heterotetramétrica com duas unidades, alfa e 2 beta. A alfa é inteiramente extracelular e estão, principalmente, envolvidas na ligação com IGF-1; a beta é transmembranosa (NEUBOURG et al.,1998).

Os IGFs tem ação endócrina e em tecidos específicos (regulação autócrina/parácrina), são sintetizadas no fígado e em múltiplos tecidos extra-hepáticos, incluindo células da granulosa (YEN et al.,1999). Os IGFs parecem exercer ação autócrina/parácrina fundamental para o funcionamento correto da atividade ovariana. São produzidos pelas células da granulosa sob estímulo do FSH e sua atividade é controlada por proteínas catalíticas e pelas IGFbp que inibem sua ação (GIORDANO et al., 1992).

Entre as ações mediadas pelos IGF-1 destacam-se as seguintes: ativação da produção de estrógeno e progesterona, maior atividade da aromatase, modulação de ação do FSH e do LH, crescimento e desenvolvimento celular (ERICKSON, GARZO, MAGOFFIN, 1989; GIUDICE, et al., 1990; GIORDANO, BARRECA, MINUTO, 1992; PUSZTAI et al., 1993; MURPHY, 1994; BREUEL et al., 1995; RAJARAM, BAYLINK, MOHAN, 1997). Os IGF-1 tem capacidade de atuar sinergicamente com as gonadotrofinas hipofisárias aumentando o efeito do FSH durante a foliculogênese (NEUBOURG, et al., 1998, YEN et al.,1999).

Os IGF-1 aumentam a síntese de estradiol e progesterona, potencializam a ação do FSH e receptores de LH (CHUN et al.,1994). A utilização de IGF-1 no meio de cultura de células da granulosa é um importante potencializador da ação do FSH na produção de estrógenos, ou seja, o meio de cultura com IGF-1 e FSH produziu uma quantidade significativamente maior de estrógenos do que o meio sem IGF-1 (FOSTER et al., 1995).

A expressão de IGFBPs ocorre através do FSH e dos IGFs. As IGFBPs são descritas como moduladoras do efeito dos IGFs na ação ovariana. A concentração sérica de IGFBP-3 é maior que a IGBP-1. As IGFBP-3 possuem alta afinidade com os IGFs, a circulação de IGFBP-3 é regulada pelo GH e IGF-1. As IGFBP-1 tem menos afinidade com os IGFs. O incremento da circulação de IGFs ocorre através da IGFBP-1, que atuam como modulador “agudo” da bioatividade dos IGFs, enquanto as IGFBP-3 atuariam como reserva de “longo tempo” dos níveis de IGF (YEN et al.,1999).

Com o objetivo de associar os eventos fisiológicos da foliculogênese, formação do folículo dominante, relação com FSH, LH/hCG (gonadotrofina coriônica humana) e moléculas reguladoras foi avaliada a modulação ovulatória e expressão dos fatores de crescimento em oócitos humanos primários. Analisando o fator de diferenciação de crescimento-9 (GDF-9), proteína óssea morfogenética-15 (BMP-15), IGFBP-4 protease e proteína plasmática associada à gestação-A (PAPP-A) os autores encontraram que a expressão das concentrações de GDF-9 e da BMP-15 estão envolvidas na função ovariana e são obrigatórios para a foliculogênese humana. A PAPP-A é um marcador do folículo humano dominante e produto do corpo lúteo, com atividade reguladora de FSH na foliculogênese e na luteogênese. Mas, concluem que a função das novas proteínas conhecidas na fisiologia ovariana ainda necessita de estudos.

2.3.1 Atividade dos IGFs em ciclos induzidos

A concentração de IGF-1 foi associada com o número de folículos em ciclos induzidos para a fertilização in vitro (FIV), folículos com concentrações mais elevadas de IGF-1 tiveram necessidade de menos ampolas de FSH e um tempo de indução menor (OOSTERHUIS et al., 1998). Anteriormente, a relação entre as concentrações de IGF-1 no fluido folicular, fertilização e maturação oocitária foi descartada e associada ao volume folicular (RABINOVICI et al., 1990).

Em estudo analisando os fatores de crescimento no fluido folicular de pacientes submetidas a FIV foi encontrado aumento de IGFBP-1 no fluido folicular e na concentração sérica e, diminuição de IGF-1 e IGFBP-3 no fluido folicular de folículos pré-ovulatório (HAMONI et al., 1991).

Analisando o fluido folicular de pacientes submetidas à fertilização in vitro e a ciclos espontâneos, os autores concluíram que existe uma associação entre a concentração de IGF-2 no fluido folicular e o diâmetro do folículo, assim como esse peptídeo está em maiores concentrações em folículos estrógeno-dependentes (relação androstenediona/estradiol < 4) em relação aos andrógenos-dependentes, a mesma tendência foi observada nas concentrações de IGFBP-3 e, uma maior concentração de IGFBP-1 em folículos induzidos para a fertilização in vitro (VAN DESSEL et al., 1996). Contestando estes achados, outros autores descreveram a associação entre IGFBP-1 no fluido folicular e as concentrações de estrógeno e progesterona, fazendo com que esta proteína possa ser considerada um marcador da maturidade folicular e, ao contrário, os níveis de IGFBP-3 estariam em menor concentração em folículos maduros (KAWANO et al., 1997). A diminuição da concentração das proteínas de peso molecular inferior a 40 Kd em folículos maduros, ou seja, as IGFBP-1,2,4 e 5 foi descrita em outras pesquisas

(CATALDO & GIUDICE, 1992, KUBOTA et al., 1993 e MONGET et al., 1996).

Anteriormente, estudos teriam demonstrado que pacientes com deficiência de IGF-1 poderiam ter o desenvolvimento folicular normal, demonstrando que a regulação ovariana intrínseca não é tão linear como se esperava. Todavia, os autores cometem alguns equívocos, já que a concentração de IGFBP-1 no fluido folicular era muito superior o que compensaria a diminuição dos níveis de IGF-1, além do mais, não se conhece a concentração mínima de IGF-1 ou outros IGFs, como a 2 para um desenvolvimento folicular adequado (DOR et al., 1992).

2.3.2 Endometriose e IGFs

A associação de endometriose e fatores de crescimento não é muito disponível na literatura. A modulação do IGF-1 e 2 foi anômala no endométrio ectópico em relação ao endométrio tópico (ZUPI et al., 1996). O aumento de IGF-1 no fluido peritoneal pode otimizar crescimento de tecido endometrial ectópico na cavidade peritoneal (KOUTSILIERES et al., 2001). Em estudo preliminar, analisando a expressão de IGF-1 e seus receptores no estroma e no epitélio para avaliação da expressão do sistema de IGFs em ovários com endometriose, os autores discutem a importância deste sistema na patogênese da endometriose (LOVERRO et al., 2001). A literatura apenas descreve a associação das IGFs com o crescimento e desenvolvimento do endométrio ectópico e não sua ação co-gonadotrófica.

As alterações de regulação hormonal são evidentes em pacientes inférteis com endometriose, assim como as alterações de fertilização e qualidade oocitária. Porém pouco, ou nada se estuda a respeito do meio folicular e da regulação parácrina/autócrina do processo ovulatório. Esse meio ambiente poderia estar alterado em pacientes inférteis

com endometriose, fazendo com que o crescimento e controle do folículo ovariano seja anômalo, podendo estar relacionado a fatores casuais de infertilidade neste grupo de pacientes. Alterações endócrinas decorrentes do sistema IGF-IGFBP na regulação da ovulação podem ser responsáveis pelo prognóstico da função reprodutiva de pacientes com endometriose. Como na literatura, até o presente momento, não existem estudos analisando a função dos IGFs e IGFBPs no fluido folicular de pacientes inférteis com endometriose propusemos a realização desta pesquisa.

3. OBJETIVOS

- Avaliar as concentrações de IGF-1, IGFBP-1 e IGFBP-3, no fluido folicular de pacientes inférteis com endometriose.

4. REFERÊNCIAS

AL-AZEMI, M.; BERNAL, A.L.; STEELE, J.; GRAMSBERGEN, I.; BARLOW, D.; KENNEDY, S. - Ovarian Response to repeated controlled stimulation in in-vitro fertilization cycles in patients with ovarian endometriosis. **Human Reproduction**, **15 (1)**: 72-75, 2000.

AYERS, J.W.T.; BIRENBAUM, D.L.; MENON, K.M.J. - Luteal phase dysfunction in endometriosis: elevated progesterone levels in peripheral and ovarian veins during the follicular phase. **Fertil. Steril.** **47 (6)**: 925-929, 1987.2.

BANCROFT, K.; WILLIAMS, C.A.V.; ELSTEIN, M. - Minimal/mild endometriosis and infertility. A review. **Brit. J. Obstet. Gynaecol.**, **96**:454-60, 1989.

BANCROFT, K.; WILLIAMS, C.A. V.; ELSTEIN, M. - Pituitary-ovarian function in women with minimal or mild endometriosis and otherwise unexplained infertility. **Clin. Endocrinol.**, **36**: 177-181, 1992.

BARACAT,E.C.; LIMA, G.R.- Ginecologia Endócrina. Cap. 23 (209-220). Aspectos Endócrinos da Endometriose. LIMA, G.R.; FREITAS, V.; ZAMITH, R. **Editora Atheneu**, São Paulo, 1995.

BARRECA, A; ARTINI, P.G.; CESARONE,A.; ARVIGO, M.; D'AMBROGIO, G.; GENAZZANI, A .R.; GIORDANO.; MINUTO, F. - Interrelationships between follicle stimulating hormone and the growth hormone - insulin-like growth factor - IGF-binding proteins axes in human granulosa cells in culture. **J. Endocrinol. Invest.**, **19**: 35-42, 1996.

BARRY-KINSELLA, C. ; SHARMA, S.C.; COTTELL, E.; HARRISON, R.F. - Mid to late luteal phase steroids in minimal stage endometriosis and unexplained infertility. - **Eur. J. Obst. Gynecol. Reprod. Biol.**, **54**: 113-118, 1994.

BREUEL, K.F.; HUBBARD, T.E.; UNDERHILL, D.C.; FU-KUDA, A . - Effect of Co-Administration of Follicle Stimulating Hormone and Insulin-Like Growth Factor I on Steroidogenesis of Rat Follicles Cultured In Vitro. **ASRM Meeting**, 1995.

BROSENS, I.A.; KONINCKX, P.R.; CORVELEYN, P.A. - A study of plasma progesterone, oestradiol-17B, prolactin and LH levels, and of the luteal phase appearance of the ovaries in patients with endometriosis and infertility. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, **85**: 246-250, 1978.6.

CAHILL, D.J.; WARDLE, P.G.; MAILE, L.A.; HARLOW, C.R.; HULL, M.G.R. - Pituitary- ovarian dysfunction as a cause for endometriosis-associated and unexplained infertility. **Hum. Reprod.** **10**: 3142-3146, 1995.

CAHILL, D.J. & HULL, M.G.R. - Pituitary-ovarian dysfunction and endometriosis. **Human Reproduction Update**, **6 (1)**: 56-66, 2000.15.

CANDIANI, G.B.; VERCELLINI, P.; FEDELE, L.; COLOMBO, CANDIANI, and M. - Mild endometriosis and infertility: a critical review of epidemiologic data, diagnostic pitfalls, and classification limits. **Obstet. Gynecol. Surv.**, **46 (6)**: 374-382, 1991.

CATALDO, N.A.; GIUDICE, L.C. - Insulin-Like Growth Factor Binding Protein Profiles in Human Ovarian Follicular Fluid Correlate with Follicular Functional Status. **J Clin Endocrinol Metab**, **74 (4)**: 821-29, 1992.

CHEESMAN, K.L.; BEM-NUN, I.; CHATTERTON, R.T.; COHEN, M.R. - Relationship of luteinizing hormone, pregnanediol-3-glucuronide, and estriol-16-glucuronide in urine of infertile women with endometriosis. **Fertil. Steril.**, **38 (5)**: 542-548, 1982.

CHEESMAN, K.L.; CHEESMAN, S.D.; CHATTERTON, R.T.; COHEN, M.R. - Alterations in progesterone metabolism and luteal function in infertile women with endometriosis. **Fertil. Steril.**, **40 (5)**: 590-595, 1983.

CHUN, S.; BILLIG, H.; TILLY, J.L.; FURUTA, I.; TSAFRIRI, A.; HSUEH, A. J. W. - Gonadotropin Suppression of Apoptosis in Cultured Preovulatory Follicles : Mediator Role of Endogenous Insulin-Like Growth Factor I. **Endocrinology**, **135 (5)**: 1845-53, 1994.

CUNHA-FILHO, J.S.L.; GROSS, J.L.; LEMOS, N.A.; BRANDELLI, A.;

CASTILLOS, M.; PASSOS, E.P. - Hyperprolactinemia and Luteal Insufficiency in Infertile Patients with Mild and Minimal Endometriosis. **Horm. Metab. Res.** **33**: 216-220, 2001.

CUNHA-FILHO J.S.L.; GROSS J.L.; LEMOS, N.A.; DIAS E.C.; VETTORI D.; SOUZA AC, et al. Prolactin and growth hormone secretion after thyrotropin - releasing hormone infusion and dopaminergic (DA2) blockade in infertile patients with minimal/mild endometriosis. **Human Reprod** ; **17(4)**: 960-5, 2002.

DMOWISKI et al. – The luteinized unrupture follicle syndrome and endometriosis. **Fertil. Steril**; **33(1)**: 30-4, 1980.

DOKRAS, A; OLIVE, D.L. - Endometriosis and Assisted Reproductive Technologies. **Clin. Obstet Gynecol.**, **42(3)**: 687-93, 1999.

DOR, J.; BEM-SHLOMO, I.; LUNENFELD,B.; PARIENTE, C.; LEVRAN, D.; KARASIK, A.; SEPPÄLA, M.; MASHIACH, S. - Insulin-Like Growth Factor-I (IGF-I) May not Be Essential for Ovarian Follicular Development: Evidence from IGF-I Deficiency. **J Clin Endocrinol Metab**, **74 (3)**: 539-42, 1992.

ERICKSON, G.F.; GARZO, G.; MAGOFFIN, D.A . - Insulin-Like Growth Factor-I Regulates Aromatase Activity in Human Granulosa and Granulosa Luteal Cells. **J Clin Endocrinol Metab**, **69 (4)**: 716-24, 1989.

ERICKSON, G.F.; SHIMASAKI, S. - The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. **Fertil. Steril.**, **76(5)**: 943-9, 2001.

FOSTER, C.M.; HASHIMOTO, N.; RANDOLPH Jr., J.F.; BEITINS, I.Z. – Comparison of Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor-I Regulation of Estradiol and Progesterone Production in Human Luteinized Granulosa Cells. **Pediatric Research**, **38 (5)**: 763-67, 1995.

GARRIDO, N.; NAVARRO, J.; REMOHÍ, J.; SIMÓN, C.; PELLICER,A. - Follicular Hormonal environment and embryo quality in women with endometriosis. **Human Reproduction Update**, **6 (1)**: 67-74, 2000.

GIORDANO, G.; BARRECA, A.; MINUTO, F. - Growth factors in the ovary. **J.**

Endocrinol. Invest, **15**, 689-707, 1992.

GIUDICE, L.C.; FARRELL, E.M.; PHAM, H.; ROSENFELD, R.G. - Identification of Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-3 (IGFBP-3) and IGFBP-2 in Human Follicular Fluid. **J Clin Endocrinol Metab**, **71 (5)**: 1330-38, 1990.

HAMONI, M.; BLUM, W.F.; TORAK, A.; STELLE, R.; WAIBLE, E.; CLEODON, P.; RANKE, M.B. - Insulin-like growth factors and their binding proteins in human follicular fluid. **Hum. Reprod.** **6(3)**: 313-8, 1991.

HANEY, A.F. - Endometriosis-associated infertility - **Ballière's Clinical Obstetrics Gynaecology**, **7 (40)**: 792-812, 1993.

INOUE, M.; YOSHIMUNE, K.; HONDA, I.; AWAJI, H.; AKIZAKU, F. - The impact of endometriosis on the reproductive outcome of infertile patients. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **167**:278-82, 1992.16.

JONES, J.I. ; CLEMMONS, D.R. - Insulin-Like Growth Factors and Their Binding Proteins: Biological Actions. **Endocrine Reviews**, **16 (1)**: 3-34, 1995.

KAWANO, Y.; NARAHARA, H.; MATSUI, N.; NASU, K.; MIYAMURA, K.;

MIYAKAWA, I. - Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-I in Human Follicular Fluid: A Marker for yet Maturation. **Gynecol. Obstet. Invest.** , **44**: 145-48, 1997.

KISTNER, R. W. – Management of endometriosis in infertile patients. **Fertil. Steril.** **26(12)**: 1151-66, 1975.

KONINCKX, P.R.; IDE, P.; VANDENBROUCKE, W.; BROSENS, I.A. - News aspects of the pathophysiology of endometriosis and associated infertility. **J. Reprod. Med.**, **24 (6)**: 257-260, 1980.

KONINCKX, P.R. - Is mild endometriosis a disease? **Hum. Reprod.**, **9**:2202-11, 1994.

KOUTSILIERIS et al.,- Increased Insulin like growth factor 1 activity can rescue KLE endometrial-like cells from apoptosis. **Mol. Med.** **7(1)**: 20-6, 2001

KUBOTA, T.; KAMADA, S.; OHARA, M.; TAGUCHI, M.; SAKAMOTO, S.;

SHIMIZU, Y.; ASO, T. - Insulin-Like Growth Factor-II in Follicular Fluid of the Patients with In Vitro Fertilization and Embryo Transfer. **Fertil. Steril.**, **59 (4)**: 844-49, 1993.

LOVERRO G., MAIORANDE E., NAPOLI A., SELVAGGI L., MARRE E., PERLINE E.,- Transforming growth factor-beta 1 and insulin growth factor-1 expression in ovarian endometriotic cysts: a preliminary study. **Int. J. Mol. Med.** **7(4)**: 423-9, 2001.

LEYENDECKER, G.; KUNZ,G.; NOE.M.; HERBERTZ, M.; MALL, G.;- Endometriosis: a dysfunction and disease of the archimetra. **Human Reprod. Up date**, **4 (5)**: 752-762.1998.

MATORRAS, R.; RODRÍGUEZ, F.; PÉREZ, C.; PIJOAN, J.L.; NEYRO, J.L.; RODRÍGUEZ-ESCUADERO, F.J. - Infertile woman with and without endometriosis: a case control study of luteal phase and other infertility conditions. **Acta Obst. Gynec. Scand.**, **75**: 826-831, 1996.

MIO, Y.; TODA, T.; HARADA, T.; TERAOKAWA, N.- Luteinized unruptured follicle in the early stages of endometriosis as a cause of unexplained infertility. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **167**:271-3, 1992.

MONGET, P.; BESNARD, N.; HUET, C.; PISSELET, C.; MONNIAUX, D. - Insulin-Like Growth Factor-Binding Proteins and Ovarian Folliculogenesis. **Horm. Res.**, **45**: 211-17, 1996.

MOON, C.E.; BERTERO, M.C.; CURRY, T.E.; LONDON, S.N.; MUSE, K.N.; SHARPE, K.L.; VERNON, M. W. - The presence of luteinized unruptured follicle syndrome and altered folliculogenesis in rats with surgically induced endometriosis. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **169**:676-82,1993.

MURPHY, L.J. - Growth Factors and Steroid Hormone Action in Endometrial Cancer. **J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.**, **48**: 419-23, 1994.

MUSE, K.N.; WILSON, E.A. - How does mild endometriosis cause infertility?. **Fertil. Steril.**, **38**: 145-152, 1982.

MUSE, K.N.; WILSON, E.A.; JAWAD, M.J. - Prolactin hyperstimulation in

response to thyrotropin-releasing hormone in patients with endometriosis. **Fertil. Steril.**, **38**: 419-422, 1982.

NEUBOURG, D.; ROBINS, A.; FISHEL, E.; DELBENKE, L.- Quantification of insulin-like growth factor I receptors on granulosa cells with flow cytometry after follicular stimulation. **Hum. Reprod.** **13(1)**: 161-164, 1998.

NISOLLE, M. & DONNEZ, J.- Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. **Fertil. Steril.**, **68**:585-596, 1997.

OLIVE, D.L.; SCHWARTZ, L.B. - Endometriosis. **N. Engl. J. Med.** **328**:1759-1767, 1993.

OLIVE, D.L.; HANEY, A .F. - Endometriosis- Associated infertility: A critical review of therapeutic approaches. **Obstet. Gynecol. Surv.**, **41**:538-55, 1986.*26.

OOSTERHUIS, G.J.E.; VERMES,I.; LAMBALK, C.B.; MICHGELSEN, H.W.B.; SCHOEMAKER, J. - Insulin-Like Growth Factor (IGF)-I and IGF binding protein-3 concentrations in fluid from human stimulated follicles. **Hum. Reprod**, **13 (2)**: 285-289, 1998.

PALMA DIAS, R.; BRUGNARA, L.; BRUGNARA, L.; CAVAGNOLI, G.; CÉSAR, C.P.; FRONZA, R.; GUGEL, F.; FREITAS, F.; RAMOS, J.G.; PASSOS, E.P.- Indicações e achados diagnósticos em laparoscopias ginecológicas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. **Rev. ATM** **95/1**, **1**:11-16, 1995.

PELLICER, A.; ALBERT, C.; GARRIDO, N.; NAVARRO, J.; REMOHÍ, J.; SIMÓN, C.- The pathophysiology of endometriosis associated infertility: Follicular environment and embryo quality. **J. Reproduction and Fertility Supplement** **55**: 109-119, 1998.

PITTAWAY, D.E.; MAXSON, W.; DANIELL, J.; HERBERT, C.; WENTZ, A.C. - Luteal phase defects in infertility patients with endometriosis. **Fertil. Steril.**, **39**: 712-713, 1983.30.

PUSZTAI, L.; LEWIS, C.E.; LORENZEN, J.; MCGEE, O'D. - Growth Factors: Regulation of Normal and Neoplastic Growth. **Journal of Pathology** **169**: 191-201,1993.

RAJARAM, S.; BAYLYNK, D. J.; MOHAN, S. - Insulin-Like Growth Factor-Binding Proteins in Serum and Other Biological Fluids: Regulation and Functions. **Endocrine Reviews** **18 (6)**: 801-831, 1997.

RABINOVICI, J.; DANDEKAR, P.; ANGLE, M. J.; ROSENTHAL, S., MARTIN, M.C. - Insulin-like-growth factor I (IGF-I) levels in follicular fluid from human preovulatory follicles: correlation with serum IGF-I levels. **Fertil. Steril.** **54 (3)**:428-433,1990.

RÖNNBERG, L.; KAUPPILA, A.; RAJANIEMI, H. - Luteinizing hormone receptor disorder in endometriosis. **Fertil. Steril.**, **42 (1)**: 64-68, 1984.

SAMPSON, J.A. - Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into peritoneal cavity. **Am. J. Obstet. Gynecol.** **14**:422-35, 1927.

SHAW, R.W. - Endometriosis, current understanding and management. 2 ed. Glasgow, **Blackwell Science Ltda.**, 1995. 302p.

SOULES, M.R.; MALINAK, L.R.; BURY, R.; POINDEXTER, A. - Endometriosis and ovulation: A coexisting problem in the infertile female. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **125 (3)**: 412-417, 1976.

The American Fertility Society. **Revised American Fertility Society classification of endometriosis. Fertil. Steril.**, **43**:351-2, 1985.

TUMMON, I.S.; MACLIN, V.M.; RADWANSKA, E.; BINOR, Z.; DMOWSKI, W.P. - Occult ovulatory dysfunction in women with minimal endometriosis or unexplained infertility. **Fertil. Steril.**, **50 (5)**: 716-720, 1988.

VAN DESSEL, H.J.H.M.; CHANDDRASEKHER, Y.; YAP, O.W.S.; LEE, D.K.P.; et. al. - Serum and Follicular Fluid Levels of Insulin-like Growth Factor I (IGF-I), IGF-II, and IGF-Binding Protein-1 and-3 during the Normal Menstrual Cycle. **J. End. And Metab.** **81(3)** : 1224-1231,1996.

YEN, S.S.C.; JAFFE, R.B.; BARBIERI, R.L.- *Reproductive Endocrinology*. 4th

Edition.W.B.SAUNDERS COMPANY,1999.

ZUPI, E.; SBRACIA, M.; ALO, P.; MANNA, C.; MARCONI, D.; ROMANI,C.-
Differential Expression of IGF-I and IGF-II in Eutopic Endometrium of Women with
Endometriosis with Respect to Control Women Endometrium. **ASRM Meeting**, 1996.

5. ARTIGO: VERSÃO INGLÊS

Analysis of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and insulin-like growth factor binding protein-1 and 3 (IGFBP-1 and IGFBP-3) in follicular fluid of infertile patients with endometriosis

Nadiane Albuquerque Lemos, MD; João Sabino L. Cunha-Filho, MD,PhD; Fernando Monteiro Freitas, MD, PhD; Karin Kiefer, MD; Mariana Faller ; Eduardo Pandolfi Passos, MD, PhD

¹ Obstetrics and Gynecology Department, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

Financial support: Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE), Hospital de Clínicas de Porto Alegre; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Correspondence:

Dr.Eduardo Pandolfi Passos

End.: Ramiro Barcelos, 2350 sala 1124

CEP: 90035-003 Porto Alegre-RS-Brazil

Fone: 51.33168117

e-mail: epp@via-rs.net

ABSTRACT

Objective: To assess the follicular fluid of infertile patients with endometriosis through dosages of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and insulin-like growth factor binding protein-1 and 3 (IGFBP-1 and IGFBP-3).

Design: Cross-sectional prospective study.

Setting: Assisted Reproduction Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

Patients: Forty-one infertile patients submitted to IVF between January 1999 and January 2000.

Interventions: Patients were divided into three groups: group I, minimal/mild endometriosis (n=12); group II, moderate/severe endometriosis (n=10); and group III, tubal obstruction (n=19). The ultra-short protocol was used in association with recombinant FSH for ovulation induction. Kruskal-Wallis' test and Dunn's multiple comparison were used for the statistical analysis; categorical data were analyzed using Fisher's exact test.

Main Outcome Measure: Follicular fluid IGF-1, IGFBP-1, and IGFBP-3 levels.

Results: Follicular fluid IGF-1 and IGFBP-3 levels were not significantly different among the groups; IGFBP-1 levels were different. Comparison of ovulation induction time, number of recombinant FSH units, number of follicles, oocytes and embryos, and fertilization and gestation/cycle rates resulted no significant.

Conclusion: Infertile patients with moderate/severe endometriosis submitted to IVF presented lower levels of IGFBP-1 in the follicular fluid, which is associated with ovulatory dysfunction.

Keywords: follicular fluid, endometriosis, infertility, insulin-like growth factor, and insulin-like growth factor binding protein.

INTRODUCTION

Endometriosis is associated with alterations in the hypothalamic-pituitary-ovarian axis. This association suggests a disorder in the hormonal function, with altered LH and prolactin secretion, reduced ability of the pre-ovulatory follicle and of the oocyte to be fertilized, and altered luteal function (Cahill and Hull, 2000; Cunha-Filho *et al.*,2002). Alterations in the follicular fluid of patients with endometriosis suggest a cause for infertility in this group of patients, since oocyte alterations result in low-quality embryos, with reduced implantation rates (Garrido *et al.*, 2000). Moreover, we demonstrated that patients with minimal/mild endometriosis present altered prolactin secretion after thyrotropin-releasing hormone administration, with a higher prevalence of defects in the luteal phase (Cunha-Filho *et al.*,2002, Cunha-Filho *et al.*,2001).

The assessment of follicular fluid is very important to the study and understanding of ovulation. Increased concentrations of estradiol/androstenedione have been observed when mature oocytes are present. In addition, the regulatory and amplificatory effect of follicular fluid growth factors was evaluated in different groups of patients and showed to be fundamentally important for an adequate ovarian function (Erickson *et al.*, 1998).

The study of the follicular fluid in patients with endometriosis is important to elucidate the physiopathology of this disease. Some investigators demonstrated a decreased concentration of vascular endothelial growth factor (VEGF) and a higher level of progesterone in the follicular fluid of endometriotic patients (Pellicer *et al.*, 1998a; 1998b). In a recent study, the same authors published different results regarding follicular fluid VEGF concentration in patients with endometriosis (Garrido *et al.*, 2001); however, a different methodology was used in this study (flow cytometry), and the small number of

subjects (n=6) did not allow a definite conclusion.

The most convincing data regarding oocyte quality in patients with endometriosis come from a study about oocyte donation carried out by Pellicer *et al.* (1994). The authors showed that the implantation rate was significantly lower in recipients of oocytes from patients with endometriosis. Other investigators (Akande *et al.*, 2000) studied inhibin A and B and activin A concentrations in the follicular fluid of endometriotic patients: inhibins were not significantly altered, but the concentration of activin A was higher in patients with the disorder, which may result in a compensatory mechanism.

In the ovaries, insulin-like growth factor-1 (IGF-1) seems to have an autocrine/paracrine action. It is produced by granulosa cells after stimulation with FSH, and its activity is controlled by catalytic proteins and by insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP), which act as inhibitors (Giordano *et al.*, 1992). IGF-1 activates the production of estrogen and progesterone and the activity of aromatase, and also modulates the effect of FSH and LH (Erickson *et al.*, 1989; Giudice *et al.*, 1990).

IGF-1 acts as a local amplifier of the action of FSH in the follicular fluid. In addition, the ovulation control exerted by IGF-1 is evidenced by the fact that in induced assisted reproduction technology (ART) cycles, follicles with higher IGF-1 concentrations require a lower number of FSH ampoules and a shorter induction time (Oosterhuis *et al.*, 1998).

On the other hand, IGFBP-1 exerts an inhibitory effect on IGF-1, acting as an antigonadotrophic agent (Adashi *et al.*, 1995; Yoshimura *et al.*, 1998) and modulating IGF-1 activity. Recently, Erickson & Shimasaki (2001) also showed the importance of IGFBP-4 and pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) in the control of ovarian function.

Several associations between response to ovarian stimulus and abnormalities in IGF-1 concentrations have been discussed, but none has been confirmed. In a study carried out by Neubourg et al. (Neubourg *et al.*, 1998), no differences were found in follicular fluid IGF-1, IGFBP-1, and IGFBP-3 concentrations when the response to ovarian stimulus was poor or inadequate.

With the aim of elucidating the role of some important growth factors in the pathogenesis of endometriosis-associated ovulatory dysfunction, we decided to assess the follicular fluid of infertile patients with endometriosis through the analysis of IGF-1, IGFBP-1, and IGFBP-3 concentrations.

MATERIALS AND METHODS

Design

A cross-sectional prospective study was performed in order to analyze the follicular fluid of infertile patients with endometriosis submitted to ART.

Patients

IGF-1, IGFBP-1, and IGFBP-3 concentrations were assessed in the follicular fluid of 41 infertile patients with endometriosis (cases) or tubal obstruction (controls) submitted to IVF as the treatment for infertility at the Human Reproduction Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil, between January 1999 and January 2000. Patients were informed about the procedures and spontaneously signed an informed consent form. The research project was approved by the Ethics Committee and registered at the Graduate Research Group of the hospital.

Patients were divided into three groups: group I, patients with minimal or mild endometriosis (n=12); group II, patients with moderate or severe endometriosis (n=10); group III, patients with tubal obstruction (controls) (n=19).

All patients were submitted to laparoscopy for investigation of infertility; the procedure was always performed by the same investigator. Endometriosis staging was performed according to the classification of The American Society for Reproductive Medicine (1985).

The following exclusion criteria were established: 1) patients with previous endocrine disorders; 2) cases in which the cause for infertility was other than endometriosis (except for patients with tubal obstruction, in the control group); 3) patients with serum FSH dosage higher than 10 IU/ml in the early follicular phase (third day of menstrual cycle). The criteria proposed by the World Health Organization (1992) were used for the analysis of sperm.

In vitro fertilization

IVF was performed for the treatment of infertility due to the presence of endometriosis or tubal obstruction. The ultra-short protocol (MacName *et al.*, 1989) was used for ovulation induction, with GnRH analogue.

On the third day of the first menstrual cycle after the beginning of the study protocol, recombinant FSH was administered at the initial dose of 150 IU, with dose adjustment according to patient response. Patients received leuprolide acetate from the second to the fourth day of the menstrual cycle (1 mg/day subcutaneously).

Ovulation induction was monitored by daily ultrasonography (Marrs *et al.*, 1993).

When at least one ovarian follicle had reached an 18-mm diameter, hCG at the dose of 10.000 IU was administered intramuscularly, and oocyte collection occurred from 34 to 36 hours afterwards.

After the identification and separation of the oocyte, the follicular liquid was centrifuged at 2500 rpm and frozen at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for posterior analysis.

Measurements

Follicular fluid analysis was performed at the radioimmunoassay laboratory of Hospital de Clínicas the Porto Alegre, Brazil, with specific kits (DSL, Texas, USA). The result was obtained through the two-site immunoradiometric assay (IRMA) (Milles *et al.*, 1974). IRMA is not a competitive analysis of measurements, but a two-antibody sandwich (the first antibody is immobilized to the inside wall of the tubes, and the other is radio-labeled for detection). The free material (sample) is removed, and the tubes are washed for the measurement of IGF-1, IGFBP-1, and IGFBP-3 dosages (in ng/ml).

The minimal detection limit of IRMA was 0.8 ng/ml (corrected to 1:30 dilution) or 27 pg/ml (1.4 pg/tube) for IGF-1, 0.33 ng/ml for IGFBP-1, and approximately 0.5 ng/ml for IGFBP-3. The coefficients of variation were 1.5% for IGF-1, 2.7% for IGFBP-1, and 0.5% for IGFBP-3.

Statistics analysis

Since the variables showed a nongaussian distribution, we used Kruskal-Wallis' test and Dunn's multiple comparison for the analysis of continuous data. Otherwise, categorical data were analyzed using Fisher's exact test. Data analysis was considered significant when $P < 0.05$.

The sample size was calculated (power of 80%) to compare differences regarding IGF-1, IGFBP-1 and IGFBP-3 levels in the follicular fluid.

RESULTS

The clinical characteristics of patients from the three groups are presented in Table I. Patients from group I were older than the others, with a median of 34 years; in group II, the median was 26 years, and in group III, 30.5 years ($P=0.001$; Kruskal-Wallis' test). Body mass index was similar in the three groups ($P=0.143$).

Table II shows data related to the analysis of ovulation induction in the three groups. No differences were found regarding length of induction in days ($P=0.225$), number of follicles ($P=0.968$), number of oocytes ($P=0.773$), fertilization rate ($P=0.592$), and number of embryos ($P=0.210$). In addition, the number of FSH units required for ovarian induction and the pregnancy rate were similar among the groups.

Follicular fluid growth factor levels are shown in Table III. IGF-1 and IGFBP-3 were not significantly different among the three groups. However, group II patients (moderate/severe endometriosis) presented lower follicular fluid concentrations of IGFBP-1 than patients from the other groups (post-hoc Dunn's procedure) (figure I).

DISCUSSION

The clinical characteristics of patients (age and body mass index) were assessed in the three groups. Patients with minimal and mild endometriosis (group I) were older than the others, and this result was probably associated with a delay in diagnosis in this group of patients. The difference regarding age among the groups reinforce our

findings, because IGF-1 and consequently IGFBP-1 levels have been shown to decrease with age (Hammerman, 1987); and, in this study, older group (group 1) did not present different IGFBP-1 levels when compared to controls. Body mass index, which may influence the levels of growth factors and their binding proteins, and also the patient's response to IVF, was not different among the groups.

Fertilization and gestation rates, which have been shown by some authors to be lower in patients with endometriosis submitted to IVF (Pellicer *et al.*, 1998b; Wardle *et al.*, 1985; Jansen; 1986), presented similar results in patients with and without endometriosis in our study. Although the group of patients with severe endometriosis (group II) presented a lower pregnancy rate (10%), this difference was not significant, probably because our sample size was too small for the evaluation of this specific outcome.

The differences found in IGFBP-1 levels reinforce the idea that these markers are associated with reproductive function (Adashi, 1995; Giudice *et al.*, 1990; Jones and Clemmons, 1995; Kawano *et al.*, 1997, Yoshimura, 1998). Patients with moderate or severe endometriosis (group II) presented lower follicular fluid levels of IGFBP-1 when compared to the other groups; this decrease may be associated with the paracrine function of this marker in this group of patients.

Several studies describe the role of the IGF-IGFBP system in ovarian physiology: IGF-1 stimulates the *in vitro* meiotic maturation of follicle-enclosed oocytes via receptors; IGFBP-1 inhibits gonadotropin-induced ovulation and oocyte maturation by neutralizing IGF-1 (Adashi, 1995; Yoshimura, 1998).

Some authors also suggest an association between IGFBP-1 levels and follicular maturity (Kawano *et al.*, 1997). In this study, the number of mature follicles

among the three groups was not different (Veeck's criterion) (Veeck *et al.*, 1983). Our findings confirm the hypothesis of other studies (Cahill and Hull, 2000), and our previous studies (Cunha-Filho *et al.*, 2001; Cunha-Filho *et al.*, 2002) showed alterations in the hypothalamic-pituitary-ovarian axis of women with endometriosis. The decreased levels of follicular fluid IGFBP-1 showed in the present study probably constitute a compensatory mechanism to the intrinsic ovulatory dysfunction observed in infertile patients with endometriosis, increasing the active form of IGF-1.

Other authors demonstrated that peritoneal IGF-1 levels are higher in patients with endometriosis who present low peritoneal IGFBP-2 and IGFBP-3 concentrations (Kim *et al.*, 2000). Moreover, serum IGF-1 levels are higher in these patients when compared with those submitted to tubal sterilization (Gourgon *et al.*, 1999); these findings may suggest the development of ectopic endometrium and infertility in patients with endometriosis.

Our finding is in accordance with other studies that show increased progesterone and activin A levels in the follicular fluid of endometriotic patients (Akande *et al.*, 1992 ; Pellicer *et al.*, 1998b), abnormalities in the granulosa cell cycle – affecting IVF results (Toya *et al.*, 2000), and reduced embryo implantation rates associated with oocyte donation (Pellicer *et al.*, 1994). These investigators agree with Harlow *et al.* (1996), who identified altered steroidogenesis as an important finding associated with endometriosis.

The main difficulty in the study of a specific clinical outcome in human reproduction is that a large number of patients is necessary to reach a conclusion. The minimum sample size required to demonstrate a 5% difference between two groups, with an outcome presenting 20-25% of prevalence, is about 1,100 participants in each study arm. So, conclusions about implantation, fertilization and pregnancy rates are

contradictory and very difficult to obtain.

The study of oocyte dysfunction in endometriosis can benefit from a better understanding of follicular regulation and oocyte maturation. Several peptides and substances are currently under investigation (IGFBP-4, PAPP-A), and their importance in endometriosis-associated infertility is unknown. Moreover, the assessment of some FSH-independent growth factors (growth differentiation factor-9 and bone morphogenetic protein-15) in the follicular pre-antral stage could elucidate the ovulatory dysfunction observed in endometriotic patients (Erickson *et al.*, 2001).

In conclusion, patients with severe endometriosis presented a decreased level of IGFBP-1 in the follicular fluid, which may be associated with a compensatory mechanism provoked by a subtle disorder in the ovulatory paracrine/autocrine action. Endometriosis should be seen as a syndrome that may result in anatomical, peritoneal, immunological, and endocrine dysfunction, with effects on folliculogenesis, oocyte quality, embryo development and, consequently, on fertility.

Acknowledgments

We are grateful for the financial support provided by Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE), Hospital de Clínicas de Porto Alegre; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), as well as for the editorial support provided by the Graduate Research Group at Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

REFERENCES

- Adashi, E.Y. (1995) Insulin-like growth factors as determinants of follicular fate. *J Soc Gynecol Invest*, **2**, 721–6.
- Akande, A.V., Aselin, J., Keay, S.D., Cahil, D.J., Muttukrishna, S., Groome, N.P. and Wardle, P.G. (2000) Inhibin A, inhibin B and activin A in follicular fluid of infertile women with tubal damage, unexplained infertility and endometriosis. *Am J Reprod Immunol*, **43**, 61–9
- Cahill, D. J. and Hull, M.G.R. (2000) Pituitary-ovarian dysfunction and endometriosis. *Hum Reprod Update*, **6**, 56–66.
- Cunha-Filho, J.S.L., Gross, J.L., Lemos, N.A., Brandelli, A., Castillos, M. and Passos, E.P. (2001) Hyperprolactinemia and luteal insufficiency in infertile patients with mild and minimal endometriosis. *Horm Metab Res*, **33**, 216–20.
- Cunha-Filho, J.S.L., Gross, J.L., Lemos, N.A., Dias, E.C., Vettori, D., Souza, C. A. and Passos, E.P. (2002) Prolactin and growth hormone secretion after thyrotropin - releasing hormone infusion and dopaminergic (DA2) blockade in infertile patients with minimal/mild endometriosis. *Human Reprod* , **17**(4), 960–5.
- Erickson, G.F., Garzo, G. and Magoffin, D.A. (1989) Insulin-like growth factor-I regulates aromatase activity in human granulosa and granulosa luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab*, **69**, 716–24.
- Erickson, G.F., Kubo, T., Li, D. and Shimasaki, S. 1998. The IGF system in the ovary. Molecular mechanisms to regulate the activities of insulin-like growth factors. *In: Takano K, Hizuda N, Takahashi S-I, editors*. Elsevier.
- Erickson, G.F. and Shimasaki, S.(2001) The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. *Fertil Steril* ,**76**, 943–9.
- Garrido, N., Albert, C., Krussel, J., O'Connor, J.E., Remoni, J., Simon, C. and Pellicer, A. (2001) Expression, production, and secretion of vascular endothelial growth

factor and interleukin-6 by granulosa cells is comparable in women with and without endometriosis. *Fertil Steril*, **76**,568–75.

Garrido, N., Navarro, J., Remohi, J., Simón, C. and Pellicer, A. (2000) Follicular hormonal environment and embryo quality in women with endometriosis. *Hum Reprod Update*, **6**, 67–74.

Giordano, G., Barreca, A. and Minuto, F. (1992) Growth factors in the ovary. *J Endocrinol Invest*, **15**, 689–707.

Giudice, L.C., Farrell, E.M. , Pham, H. and Rosenfeld, R.G. (1990) Identification of insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFB-3) and IGFB-2 in human follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab*, **71**, 1330–8.

Gourgon, T., Buckulmez, O., Yarali, H., Tanir, M. and Akyldiz, S. (1999) Serum and peritoneal fluid levels of IGF I and II and insulin-like growth binding protein-3 in endometriosis. *J Reprod Med*, **44**, 450–4.

Harlow, C.R., Cahill, D.J., Maile, L.A., Talbet, W.M., Mearns, J., Wardle, P.G. and Hull, M.G. (1996) Reproduced preovulatory granulosa cells steroidogenesis in woman with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*, **81**, 426–9.

Hammerman, M.R. (1987) Insulin-like growth factors and aging. *Endocrinol Metab Clin North Am*, **16**(4), 995–1011

Jansen, R.P.S. (1986) Minimal endometriosis and reduced fecundability: prospective evidence from an artificial insemination by donor program. *Fertil Steril*, **46**,141–3.

Jones, J.I. and Clemmons, D. R. (1995) Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev*,**16**, 3–34.

Kawano, Y., Narahara, H., Matsui, N, Nasu, K, Miyamura, K. and Miyakawa, I. (1997) Insulin-like growth factor-binding protein-I in human follicular fluid: a marker for oocyte maturation. *Gynecol Obstet Invest*, **44**, 145–8.

Kim, J.G., Suh, C.S., Kim, S.H., Choi, Y.M., Moon, S.Y. and Lee, J.Y. (2000)

Insulin-like growth factors (IGFs), IGF-binding proteins (IGFBPs), and IGFBP-3 protease activity in the peritoneal fluid of patients with and without endometriosis. *Fertil Steril* , **73**, 996–1000.

MacName, M.C., Howles, C.M., Edwards, R.G., Taylor, P.J. and Elder, K.T. (1989) Short-term luteinizing hormone-releasing hormone agonist treatment: prospective trial of a novel ovarian stimulation regimen for in vitro fertilization. *Fertil Steril* , **52**, 264–9.

Marrs, R.P., Vargys, J.M., Saito, H., Gibbons, W.E., Berger, T. and Mishell, D.R. (1993) Clinical application of techniques used in human in vitro fertilization research. *Am J Obstet Gynecol*, **146**, 477–81.

Milles, L.E.M., Lipschitz, D.A., Bieber, C.P. and Cook, J.D. (1974) Measurement of serum ferritin by a 2-site immunoradiometric assay. *Analyt Biochem*, **61**, 209–24.

Neubourg, D., Robins, A., Fishel, E. and Delbenke, L. (1998) Quantification of insulin-like growth factor I receptors on granulosa cells with flow cytometry after follicular stimulation. *Hum Reprod*, **13**, 161–4.

Oosterhuis, G.J.E., Vermes, I., Lambalk, C.B., Michgelsen, H.W.B. and Schoemaker, J. (1998) Insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF binding protein-3 concentrations in fluid from human stimulated follicles. *Hum Reprod* , **13**, 285–9.

Pellicer, A., Albert, C., Garrido, N., Navarro, J., Remohi, J. and Simón, C. (1998) The pathophysiology of endometriosis-associated infertility: follicular environment and embryo quality. *J Reprod Fertil Suppl*, **55**, 109–19.

Pellicer, A., Albert, C., Mercader, A., Bonila-Musoles, F., Remohi, J. and Simón, C. (1998) The follicular and endocrine environment in women with endometriosis: local and systemic cytokine production. *Fertil Steril*, **70**, 425–31.

Pellicer, A., Oliveira, N., Ruiz, A., Remohi, J. and Simón, C. (1994) The implantation in endometriosis lessons learned from IVF and oocytes donation. *In: Spindola P, Coutinho E.M., Moura L.H., editors. Progress in endometriosis*. Carnfourth,

UK: Parthenon Publishing Group, Casternon-Hill,177–83.

Pellicer, A., Valbuena, D., Bauset, C., Albert, C., Bonila-Musoles, F., Remohi, J. and Simón, C. (1998) The follicular endocrine environment in stimulated cycles of women with endometriosis: steroid levels and embryo quality. *Fertil Steril*, **69**, 1135–41.

The American Fertility Society (1985) Revised American Fertility Society classification of endometriosis. *Fertil Steril*, **43**, 351–2.

Toya, M., Saito, H., Ohta, N., Takakazu, S., Kaneko, T. and Hiroi, M. (2000) Moderate and severe endometriosis is associated with alterations in the cell cycle of granulosa cells in patients undergoing in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril*, **73**, 344–9.

Veeck, L.L., Wortham, J.W.E., Witmyer, J., Acosta, A.A, Garcia, J.E., Jones, G.S. *et al.* (1983) Maturation and fertilization of morphologically immature human oocytes in a program of in vitro fertilization. *Fertil Steril*, **39**, 594–602.

Wardle, P.G., Mitchell, J.D., McLaughlin, E.A., Ray, B.D., McDermott, A. and Hull, M.G.R. (1985) Endometriosis and ovulatory disorder: reduced fertilization in vitro compared with tubal and unexplained infertility. *Lancet*, **2**, 236–9.

World Health Organization (1992) *WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction*, 3rd edn. Cambridge University Press, Cambridge.

Yoshimura, Y. (1998) Insulin-like growth factors and ovarian physiology. *J Obstet Gynaecol Res*, **24**, 305–23.

Table I. Clinical characteristics (values are expressed as medians and 95% confidence intervals)

	Group I	Group II	Group III	Statistics
	(n=12)	(n=10)	(n=19)	P
Age (years)	34*	26	30.5	0.001
	(29.8-36.2)	(21.5-29.7)	(28.2-33.2)	
BMI (kg/m ²)	23.5	23	24.5	0.143
	(20-27)	(22-30)	(22-28)	

BMI: body mass index

*post-hoc Dunn's procedure

Table II. IVF outcomes (values are expressed as medians and 95% confidence intervals)

	Group I	Group II	Group III	Statistics
	(n=12)	(n=10)	(n=19)	P
RecFSH (IU) administered	550 (370.78-629.22)	750 (505.88-824.11)	750 (569.23-830.77)	0.064
Induction length (days)	8.5 (5.76-9.74)	9 (7.71-10.86)	9.5 (8.13-10.37)	0.225
Number of follicles >16 mm	3 (1.69-4.91)	3 (1.32-5.83)	3 (2.39-6.78)	0.968
Number of oocytes	3 (1.69-4.91)	5 (1.82-7.04)	4 (3.16-7.84)	0.773
Fertilization rate (%)	75	85	88	0.592
Number of embryos	1 (1.39-3.11)	2 (1.44-3.96)	2 (1.13-3.19)	0.210
Clinical pregnancy rate/cycle (%)	25	10	21	0.575

IVF: in vitro fertilization; RecFSH: Recombinant follicle-stimulating hormone

Table III. Follicular fluid levels of IGF-1, IGFBP-1 and IGFBP-3 (values are expressed as medians and 95% confidence intervals)

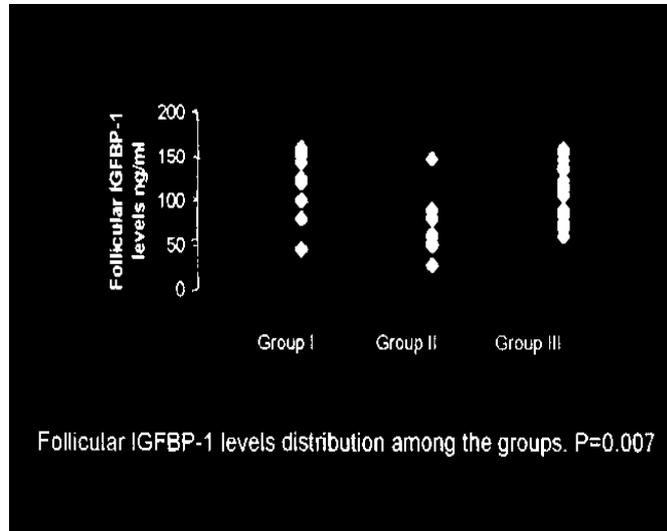
	Group I	Group II	Group III	Statistics
	(n=12)	(n=10)	(n=19)	P
IGF-1	125	144	134	0.185
(ng/ml)	(61.32-161.43)	(66.87-176.27)	(94.73-161.77)	
IGFBP-1	121.5	77*	99.5	0.007
(ng/ml)	(88.99-151.75)	(46.26-108.31)	(84.5-124.34)	
IGFBP-3	2352.5	2852	2621	0.079
(ng/ml x100)	(1495.70-2930.54)	(2715.20-3045.38)	(2212.91-2958.76)	

IGF-1: insulin-like growth factor-1; IGFBP-1: insulin-like growth factor binding protein-1;

IGFBP-3: insulin-like growth factor binding protein-3

* post-hoc Dunn's procedure.

Figure I



6. ARTIGO: VERSÃO EM PORTUGUÊS

Análise de IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1), IGFBP-1 e IGFBP-3 (Insulin-like Growth Factor Binding Protein-1 e 3) no fluido folicular de pacientes inférteis com endometriose

Nadiane Albuquerque Lemos; João Sabino L. Cunha-Filho; Fernando Monteiro Freitas; Karin Kiefer; Mariana Faller; Eduardo Pandolfi Passos¹

¹ Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

Apoio: Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE), Hospital de Clínicas de Porto Alegre; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); e Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Correspondência:

Dr. Eduardo Pandolfi Passos

End.: Ramiro Barcelos, 2350 sala 1124

CEP: 90035-003 Porto Alegre-RS-Brazil

Fone: 51.33168117

e-mail: epp@via-rs.net

RESUMO

Objetivo: Avaliar o fluído folicular de pacientes inférteis com endometriose, através das dosagens de IGF-1 (insulin-like growth factor), IGFBP-1 e IGFBP-3 (insulin-like growth factor binding protein-1 e 3).

Material e métodos: Foi realizado um estudo transversal prospectivo onde foram avaliados o fluído folicular de 41 pacientes inférteis submetidas à fertilização in vitro entre janeiro de 1999 e janeiro de 2000 no setor de Reprodução Assistida do HCPA (Hospital de Clínicas de Porto Alegre). As pacientes foram divididas em 3 grupos; grupo I, pacientes com endometriose mínima e leve (n=12), grupo II, pacientes com endometriose moderada e severa (n=10) e grupo III pacientes com obstrução tubária (n=19). O protocolo de indução utilizado foi o ultracurto e FSH (hormônio folículo estimulante) recombinante com ajuste de dose. O teste de Kruskal-Wallis (KW) e a análise de comparações múltiplas de Dunn foram utilizados para variáveis não categóricas com distribuição não-gausiana, para análise de variáveis categóricas foi utilizado teste de Fisher.

Resultados: As dosagens de IGF-1 e IGFBP-3 não apresentaram diferença entre os grupos ($P > 0.05$). Enquanto que, as dosagens de IGFBP-1 foram diferentes entre os grupos ($P = 0,007$). Comparando os dias de indução da ovulação, número de unidades de FSH recombinante, número de folículos, oócitos e embriões, e taxas de fertilização e gestação não houve diferença significativa entre os grupos.

Conclusão: Pacientes inférteis com endometriose moderada e severa submetidas a FIV apresentam níveis de IGFBP-1 mais baixos quando comparadas às demais, podendo esta redução estar associada a alterações na função folicular e oocitária neste grupo de pacientes.

Palavras-chave: fluído folicular, endometriose, infertilidade, FIV, Insulin-like Growth Factor, Insulin-like Growth Factor Binding Protein

INTRODUÇÃO

A endometriose está relacionada com distúrbios do eixo hipotálamo-hipófise-ovário. Esta associação com disfunção pituitária-ovariana sugere alteração na função folicular com LH (hormônio luteinizante) e prolactina alterados, uma capacidade reduzida do folículo pré-ovulatório, com redução da habilidade de fertilização do oócito e distúrbio da função lútea (Cahill & Hull, 2000; Cunha-Filho et al, 2002). Alterações no fluido folicular de pacientes com endometriose pode ser associada causa de infertilidade neste grupo, modificações em oócitos resultam em embriões de baixa qualidade com redução na capacidade de implantação (Garrido et al. 2000). Recentemente, confirmamos a presença da associação entre endometriose-hiperprolactinemia-insuficiência lútea (Cunha-Filho et al., 2001), podendo estar associada à causa de infertilidade no grupo de paciente, sem dano tubário, com disfunção ovulatória.

O estudo do fluido folicular é importante para compreensão de alterações na dinâmica do processo ovulatório. Está bem estabelecido que oócitos maduros estão aumentados no fluido folicular, proporcionalmente ao estradiol/androstenediona (Erickson et al. 1998). A regulação dos efeitos dos fatores de crescimento na reprodução humana vem sendo avaliados em diferentes grupos de pacientes sendo de fundamental importância para o correto desenvolvimento da função ovariana.

Em pacientes inférteis com endometriose, o estudo do fluido folicular, é importante para esclarecer e compreender melhor a fisiopatologia da infertilidade nestas pacientes. Investigadores demonstraram a diminuição da concentração de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e aumento nos níveis de progesterona no fluido folicular de pacientes com endometriose (Pellicer et al.,2000, Pellicer et al.,1998 and Pellicer et al.,1998). O mesmo grupo de autores publicou diferentes resultados da

avaliação de concentração de VEGF no fluído folicular de pacientes inférteis com endometriose (Garrido et al.,2001), entretanto, nesta última publicação foi utilizada diferente metodologia (citometria de fluxo) e com um limitado número de pacientes com endometriose (n=6) para as conclusões. O estudo de Pellicer et al, 1994 é convincente em relacionar a qualidade oocitária em pacientes com endometriose através do estudo modelo de doação de oócito. Os autores encontraram que a taxa de implantação foi, significativamente, menor em pacientes com endometriose com oócitos doados. Outros (Akande et al.,2000), estudando inibina A e B e ativina A em fluído folicular de pacientes com endometriose encontraram que inibinas não tem alterações significativas em pacientes com endometriose, entretanto, a concentração de ativina A foi maior em pacientes com endometriose, provavelmente por algum mecanismo compensatório.

Os IGF-1 estão envolvidos na correta expressão da função ovariana, através da regulação autócrina/parácrina da ovulação. São produzidas pelas células da granulosa sob o estímulo do FSH, e têm sua atividade controlada por proteínas catalíticas, as IGFBP, com ação inibitória (Giordano et al., 1992). Também, possuem ação de ativação de estrógenos e produção de progesterona, atividade sobre a aromatase, modulação dos efeitos estimulatórios de FSH e LH (Erickson et al.,1989; Giudice et al.,1990).

Em ciclos induzidos para FIV, folículos com concentrações mais elevadas de IGF-1 tiveram necessidade de menos ampolas de FSH e um tempo de indução menor (Oosterhuis et al., 1998).

As IGFBP-1 tem efeito inibitório sobre ação de IGF-1, propriedade antagonotrófica (Adashi,1995; Yoshimura,1998). Recentemente, Erickson, 2001 descreveu a importância das IGFBP-4 e PAPP-A no controle da função ovariana.

Muitas associações entre a resposta ovariana e anormalidades na concentração de IGF-1 vem sendo discutidas, mas não confirmadas. Não foi encontrado diferença nas concentrações de IGF-1, IGFBP-1 e IGFBP-3 no fluido folicular, quando a resposta ao estímulo ovariano foi pobre ou adequada (Neubourg et al., 1998).

O presente estudo busca elucidar a importância dos fatores de crescimento na patogênese da disfunção ovulatória em pacientes inférteis com endometriose. O objetivo deste estudo é avaliar o fluido folicular de pacientes inférteis com endometriose, através das dosagens de IGF-1, IGFBP-1 e IGFBP-3.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento:

Foi realizado estudo transversal prospectivo, com análise do fluido folicular de pacientes inférteis com endometriose submetidas a técnicas de reprodução assistida.

Pacientes:

Foram avaliadas as concentrações de IGF-1, IGFBP-1, IGFBP-3 no fluido folicular de 41 pacientes inférteis com endometriose ou obstrução tubária submetidas a FIV, como tratamento para infertilidade, no período compreendido entre janeiro de 1999 e janeiro de 2000, do setor de Reprodução Assistida do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). As pacientes foram divididas em 3 grupos; grupo I, pacientes com endometriose mínima e leve (n=12), grupo II, pacientes com endometriose moderada e severa (n=10) e grupo III pacientes com obstrução tubária (n=19).

A endometriose foi estadiada segundo a classificação da Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (AFS, 1985).

Todas as pacientes foram informadas dos procedimentos e assinaram termo de consentimento pós-informado de livre e espontânea vontade. O projeto de pesquisa foi previamente aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do HCPA, protocolado junto ao grupo de pesquisa e pós-graduação, registro número 99059.

As pacientes foram submetidas à laparoscopia para a investigação de sua infertilidade, o procedimento endoscópico sendo realizado sempre pelo mesmo examinador.

Foram excluídas 1) as pacientes com distúrbio endócrino prévio, 2) com outra causa para infertilidade que não endometriose, exceto pacientes com obstrução tubária (grupo controle) 3) pacientes com dosagem sérica de FSH superior a 10 UI/ml na fase folicular precoce (terceiro dia do ciclo menstrual). Adotou-se os critérios da Organização Mundial de Saúde para a análise do espermograma (OMS, 1994).

Fertilização in vitro:

A FIV foi realizada para tratamento da infertilidade ou pela presença de endometriose ou pela obstrução tubária, o protocolo de indução da ovulação utilizado pelo setor de reprodução humana, HCPA/UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), foi o ultracurto (Macname et al.,1989) com análogo de GnRH (hormônio liberador de gonadotrofina), e a indução da ovulação foi monitorada por ultra-sonografias diárias (Marrs et al.,1983).

No 3º dia do ciclo menstrual foi administrado FSH recombinante, na dose inicial de 150 UI, com ajuste de dose de acordo com a resposta da paciente. As pacientes receberam do segundo ao quarto dia de seu ciclo menstrual acetato de leuprolide (1mg/dia/sc).

No momento que ao menos 1 folículo ovariano atingiu 18 mm de diâmetro, foi administrada a dose de 10000 UI de HCG (gonadotrofina coriônica humana) intramuscular e a coleta do oócito ocorreu 32 a 36 horas após. Após identificação e separação do oócito, o líquido folicular foi centrifugado a 2500 rpm e congelado à temperatura de -20°C para posterior análise.

Medidas:

A análise do líquido folicular foi realizada mediante respectivos kits (marca DSL, Texas-USA) pelo laboratório de radioimunoensaio do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A técnica empregada entre os kits é semelhante, exceto que a análise de IGF-1 incluiu extração. O resultado é obtido através de IRMA (two-site immunoradiometric assay) (Miles et al. 1974). O IRMA não é uma análise competitiva das medidas, e sim de sanduíche entre dois anticorpos. O primeiro atua como fixador na parede interna do tubo e o outro como indicador de leitura. O material livre, amostra, é removido e os tubos lavados para leitura. As dosagens de IGF-1, IGFBP-1 e IGFBP-3 foram medidas em ng/ml.

O limite mínimo de detecção da concentração absoluta de IGF-1 é calculado pela média e 2 desvio-padrão (DP) de 22 tubos (11 contra-prova) onde "0" "standard" é 0.8 ng/ml (diluição correta de 1:30) ou 27 pg/ml (1.4 pg/tubo), a sensibilidade teórica ou o limite mínimo de detecção de IGFBP-1 é calculado pela média e 2 DP de 20 amostras onde 0 ng/ml IGFBP-1 "standard" é 0.33 ng/ml e o limite mínimo de detecção de IGFBP-3 é calculado em 2 DP da média de 11 amostras (22 tubos) onde 0 ng/ml IGFBP-3 "standard" é aproximadamente 0.5 ng/ml.

Não encontramos reação cruzada entre os níveis medidos.

Estatística:

A análise dos dados foi considerada significativa quando $P < 0,05$. Foram utilizados o teste de Kruskal-Wallis (KW) e a análise de comparações múltiplas de Dunn, pois as variáveis tiveram uma distribuição não gaussiana. Para análise de variáveis categóricas foi utilizado o teste de Fisher. O poder da amostra foi calculado (poder de 80%) para comparação dos fatores de crescimento no fluido folicular.

RESULTADOS

As características clínicas das pacientes dos três grupos estão apresentadas na tabela 1. As pacientes do grupo I apresentaram idade superior as demais, mediana de 34 anos, para uma mediana de 26 anos no grupo II e 30.5 anos no grupo III ($P=0,001$ KW). O índice de massa corporal foi semelhante entre os grupos ($P=0,143$ KW).

Na tabela 2, encontram-se as análises referentes ao seguimento da indução da ovulação entre os grupos, não sendo encontradas diferenças entre o número de dias de indução ($P=0,225$ KW), número de folículos ($P=0,968$ KW), número de oócitos ($P=0,773$ KW), taxa de fertilização ($P=0,592$ KW) e número de embriões ($P=0,210$ KW). A mediana das unidades necessárias de FSH nos grupos foi de 550UI no grupo I, 750UI no grupo II e 750UI no grupo III sem diferença significativa entre os grupos ($P=0,064$ KW). A porcentagem de taxa de gestação/ciclo também não foi significativa ($P=0,575$ Teste de Fisher). As dosagens de IGF-1 ($P=0,185$ KW) e de IGFBP-3 ($P=0,079$ KW) em ng/ml não diferem significativamente entre os grupos.

Enquanto pacientes do grupo II, endometriose severa, apresentaram dosagens inferiores de IGFBP-1 ($P=0.007$) (tabela 3, figura 1).

DISCUSSÃO

As características clínicas das pacientes foram avaliadas quanto idade e IMC entre os grupos. As pacientes com endometriose mínima e leve apresentaram idades superiores aos demais grupos, resultado atribuído ao provável atraso do diagnóstico ou a conduta conservadora quanto a infertilidade neste grupo de pacientes. O IMC, que pode influenciar nos níveis dos fatores de crescimento e das suas proteínas carreadoras, bem como na resposta a FIV não foi diferente entre os grupos.

O número de unidades de FSH por ciclo foi semelhante entre os grupos, embora alguns autores tenham encontrado diferenças em ciclos subsequentes para FIV em pacientes com endometriose (Al-Azemir et al.,2000). Todavia esta necessidade aumentada de FSH não tem alterado o prognóstico reprodutivo destas pacientes .

As taxas de fertilização e gestação por ciclo, discutíveis como diminuídas em pacientes com endometriose submetidas a FIV (Wardle et al.,1995; Jansen, 1986; Pellicer et al.,1998), traz neste estudo resultados semelhantes entre pacientes com ou sem endometriose, o que já havia sido encontrado em estudos prévios (Olivennes et al.,1995).

O grupo de pacientes com endometriose moderada/severa apresentou taxa de gestação menor (10%), sem diferença significativa, todavia, provavelmente, pelo tamanho limitado de nossa amostra, impossibilitando esta avaliação.

As diferenças encontradas nos níveis de IGFBP-1 reforçam a idéia da associação destes marcadores a função reprodutiva (Jones & Clemmos,1995; Giudice et al.1990; Kawano et al., 1997; Adashi,1995; Yoshimura,1998). As pacientes com

endometriose moderada e severa apresentaram níveis de IGFBP-1 menor quando comparados aos demais grupos, podendo esta diminuição estar associada à função parácrina destes marcadores neste grupo de pacientes.

Na literatura, estudos relatam o papel do sistema IGF-IGFBP na fisiologia ovariana, os IGF-1 estimulam a maturidade de folículos/oócitos *in vitro* e as IGFBP-1 inibem a indução da ovulação e maturação de oócitos por neutralizarem as IGF-1 (Adashi,1995; Yoshimura,1998). Este grupo de pacientes com endometriose moderada e severa tem uma disfunção ovulatória demonstrada pela diminuição dos níveis de IGFBP-1 no fluido folicular, provavelmente, por algum mecanismo compensatório da maturação oocitária (Pellicer et al., 1994). As IGFBP-1 teriam um mecanismo contra-regulatório na concentração de IGF-1 no fluido folicular.

Alguns autores sugerem uma associação entre os níveis de IGFBP-1 e maturidade folicular (Kawano et al.,1997). Neste nosso estudo, o número de folículos maduros entre os três grupos de pacientes (Veeck's criterion) (Veeck et al.,1993) não foi diferente. Nossos achados confirmam a hipótese de outros estudos (Cahill et al., 2000), e admitimos que existe uma alteração no eixo hipotálamo-hipófise-ovário em mulheres com endometriose.

Os níveis de IGF-1 no líquido peritoneal são maiores em pacientes com endometriose e a proporção de IGFBP-2 e 3 menor (Kim et al.,2000). Os níveis séricos de IGF-1 são superiores aos de pacientes submetidas a esterilização tubária (Gurgan et al.,1999), estes achados podem ser associados ao desenvolvimento de endométrio ectópico e infertilidade em pacientes com endometriose.

Nosso grupo demonstrou, previamente, que pacientes com endometriose

mínima e leve têm alteração na secreção de prolactina após estímulo com hormônio tireotrófico (TRH), com deficiência da fase lútea (Cunha-Filho et al., 2001, 2002).

Os achados do nosso grupo estão em acordo com o demonstrado por outros pesquisadores, que há aumento de progesterona no fluido folicular e ativina A no endométrio de pacientes com endometriose (Pellicer et al., 1998 and Akande et al., 2000), anormalidades nas células da granulosa alterando os resultados de FIV (Toya et al., 2000), e diminuição na capacidade de implantação embrionária em estudos de doação oocitária (Pellicer et al., 1994). Estes autores acreditam, como (Harlow et al., 1996) na associação de esteroidogênese alterada e endometriose.

O estudo clínico de pacientes em reprodução humana, pela diversidade de características, dificulta um tamanho de amostra para conclusões específicas. Neste estudo, a amostra adequada para conclusões sobre taxas de implantação, fertilização e gestação, estaria em 1100 participantes, o que torna confusa a análise destes fatores.

O estudo da disfunção oocitária em pacientes com endometriose pode proporcionar uma melhor compreensão da regulação folicular e maturidade oocitária. Muitos outros fatores vem sendo investigados (IGFBP-4, PAPP-A), para compreender o crescimento folicular e o estágio pré-antral (Erickson et al. 2001).

Concluindo, pacientes com endometriose severa apresentam uma diminuição nos níveis séricos de IGFBP-1 que poderá acarretar em um distúrbio do controle ovulatório. A endometriose deve ser vista como uma síndrome que pode estar associada a disfunções anatômicas, peritoneais, imunológicas e endócrinas, com repercussão na foliculogênese, as quais podem levar a infertilidade.

Agradecimentos:

Agradecemos o apoio financeiro do Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE), Hospital de Clínicas de Porto Alegre; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); e Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), bem como ao suporte para editoração, proporcionado pelo Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

REFERÊNCIAS

Adashi EY. Insulin-like growth factors as determinants of follicular fate. *J Soc Gynecol Invest* 1995;2:721–6.

Al-Azemi M, Bernal AL, Steele J, Gramsbergen I, Barlow D, Kennedy S. Ovarian response to repeated controlled stimulation in in-vitro fertilization cycles in patients with ovarian endometriosis. *Human Reproduction* 2000;15:72–5.

Akande AV, Aselin J, Keay SD, Cahill DJ, Muttukrishna S, Groome NP, et al. Inhibin A, inhibin B and activin A in follicular fluid of infertile women with tubal damage, unexplained infertility and endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 2000;43:61–9.

Cahill DJ, Hull MGR. Pituitary-ovarian dysfunction and endometriosis. *Hum Reprod Update* 2000;6:56–66.

Cunha-Filho JSL, Gross JL, Lemos NA, Brandelli A, Castillos M, Passos EP. Hyperprolactinemia and luteal insufficiency in infertile patients with mild and minimal endometriosis. *Horm Metab Res* 2001;33:216–20.

Cunha-Filho JSL, Gross JL, Lemos NA, Dias EC, Vettori D, Souza AC, et al. Prolactin and growth hormone secretion after thyrotropin - releasing hormone infusion and dopaminergic (DA2) blockade in infertile patients with minimal/mild endometriosis. *Human Reprod* 2002., 17(4), 960–5.

Erickson GF, Garzo G, Magoffin DA. Insulin-like growth factor-I regulates aromatase activity in human granulosa and granulosa luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1989;69:716–24.

Erickson GF, Kubo T, Li D, Shimasaki S. The IGF system in the ovary. Molecular mechanisms to regulate the activities of insulin-like growth factors. In: Takano K, Hizuda N, Takahashi S-I, editors. Elsevier, 1998.

Erickson GF, Shimasaki S. The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. *Fertil Steril* 2001;76:943–9.

Garrido N, Navarro J, Remohi J, Simon C, Pellicer A. Follicular hormonal environment and embryo quality in women with endometriosis. *Hum Reprod Update* 2000;6:67–74.

Garrido N, Albert C, Krussel J, O'Connor JE, Remoni J, Simon C, et al. Expression, production, and secretion of vascular endothelial growth factor and interleukin-6 by granulosa cells is comparable in women with and without endometriosis. *Fertil Steril* 2001;76:568–75.

Giordano G, Barreca A, Minuto F. Growth factors in the ovary. *J Endocrinol Invest* 1992;15:689–707.

Giudice LC, Farrell EM, Pham H, Rosenfeld RG. Identification of insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3) and IGFBP-2 in human follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:1330–8.

Gourgon T, Buckulmez O, Yarali H, Tanir M, Akyldiz S. Serum and peritoneal fluid levels of IGF I and II and insulin-like growth binding protein-3 in endometriosis. *J Reprod Med* 1999;44:450–4.

Harlow CR, Cahill DJ, Maile LA, Talbet WM, Maeers J, Wardle PG, et al. Reproduced preovulatory granulosa cells steroidogenesis in woman with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:426–9.

Jansen RPS. Minimal endometriosis and reduced fecundability: prospective evidence from an artificial insemination by donor program. *Fertil Steril* 1986;46:141–3.

Jones JI, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 1995;16:3–34.

Kawano Y, Narahara H, Matsui N, Nasu K, Miyamura K, Miyakawa I. Insulin-like growth factor-binding protein-I in human follicular fluid: a marker for oocyte maturation. *Gynecol Obstet Invest* 1997;44:145–8.

Kim JG, Suh CS, Kim SH, Choi YM, Moon SY, Lee JY. Insulin-like growth factors (IGFs), IGF-binding proteins (IGFBPs), and IGFBP-3 protease activity in the

peritoneal fluid of patients with and without endometriosis. *Fertil Steril* 2000;73:996–1000.

MacName MC, Howles CM, Edwards RG, Taylor, PJ, Elder KT. Short-term luteinizing hormone-releasing hormone agonist treatment: prospective trial of a novel ovarian stimulation regimen for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1989;52:264–9.

Marrs RP, Vargys JM, Saito H, Gibbons WE, Berger T, Mishell DR. Clinical application of techniques used in human in vitro fertilization research. *Am J Obstet Gynecol* 1993;146:477–81.

Milles LEM, Lipschitz DA, Bieber CP, Cook JD. Measurement of serum ferritin by a 2-site immunoradiometric assay. *Analytic Biochem* 1974;61:209–24.

Neubourg D, Robins A, Fishel E, Delbenke L. Quantification of insulin-like growth factor I receptors on granulosa cells with flow cytometry after follicular stimulation. *Hum Reprod* 1998;13:161–4.

Olivennes F, Feldberg D, Liu HC, Cohen J, Moy F, Rosenwaks Z. Endometriosis: a stage by stage analyses - the role of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1995;4:392–8.

Oosterhuis GJE, Vermes I, Lambalk CB, Michgelsen HWB, Schoemaker J. Insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF binding protein-3 concentrations in fluid from human stimulated follicles. *Hum Reprod* 1998;13:285–9.

Organización Mundial de la Salud. Manual de laboratorio de la OMS para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y moco cervical. 3rd ed. Buenos Aires: Panamericana, 1994.

Pellicer A, Oliveira N, Ruiz A, Remohi J, Simon C. The implantation in endometriosis lessons learned from IVF and oocytes donation. In: Spindola P, Coutinho EM, Moura LH, editors. *Progress in endometriosis*. Parthenon Publishing Group, Casternon-Hill, 1994:177–83. Carnfourth, UK.

Pellicer A, Albert C, Garrido N, Navarro J, Remohi J, Simon C. The pathophysiology of endometriosis-associated infertility: follicular environment and

embryo quality. *J Reprod Fertil Suppl* 1998;55:109–19.

Pellicer A, Albert C, Mercader A, Bonila-Musoles F, Remohi J, Simon C. The follicular and endocrine environment in women with endometriosis: local and systemic cytokine production. *Fertil Steril* 1998;70:425–31

Pellicer A, Valbuena D, Bauset C, Albert C, Bonila-Musoles F, Remohi J, Simon C. The follicular endocrine environment in stimulated cycles of women with endometriosis: steroid levels and embryo quality. *Fertil Steril* 1998;69:1135–41.

The American Fertility Society. Revised American Fertility Society classification of endometriosis. *Fertil Steril* 1985;43:351–2.

Toya M, Saito H, Ohta N, Takakazu S, Kaneko T, Hiroi M. Moderate and severe endometriosis is associated with alterations in the cell cycle of granulosa cells in patients undergoing in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 2000;73:344–9.

Veeck LL, Wortham JWE, Witmyer J, Acosta AA, Garcia JE, Jones GS, Jones HW. Maturation and fertilization of morphologically immature human oocytes in a program of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1983;39:594–602.

Yoshimura Y. Insulin-like growth factors and ovarian physiology. *J Obstet Gynaecol Res* 1998;24:305–23.

Wardle PG, Mitchell JD, McLaughlin EA, Ray BD, McDermott A, Hull MGR. Endometriosis anovulatory disorder: reduced fertilization in vitro compared with tubal and unexplained infertility. *Lancet* 1985;2:236–9.

Tabela 1. Características Clínicas (valores expressos em mediana e intervalo de confiança de 95%)

	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Estatística
	(n=12)	(n=10)	(n=19)	<i>P</i>
Idade (anos)	34*	26	30.5	0.001
	(29.8-36.2)	(21.5-29.7)	(28.2-33.2)	
IMC (kg/m ²)	23.5	23	24.5	0.143
	(20-27)	(22-30)	(22-28)	

* Teste de Dunn

Tabela 2. Seguimento da FIV (valores expressos em mediana e intervalo de confiança de 95%)

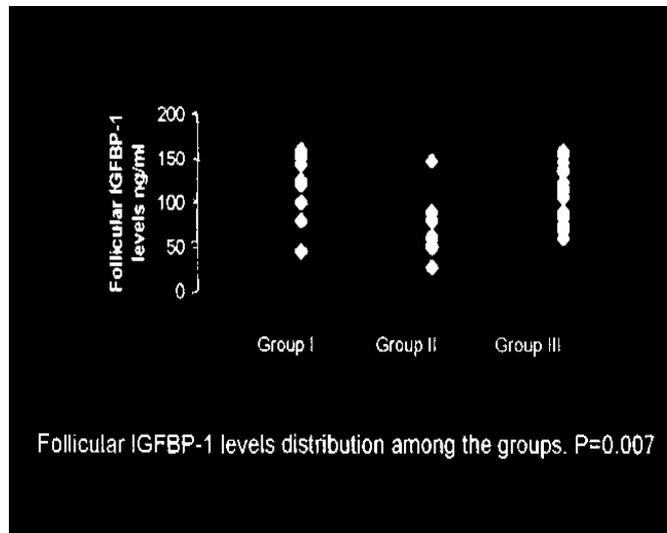
	Grupo I (n=12)	Grupo II (n=10)	Grupo III (n=19)	Estatística <i>P</i>
FSHr (IU)	550 (370.78-629.22)	750 (505.88-824.11)	750 (569.23-830.77)	0.064
Indução (dias)	8.5 (5.76-9.74)	9 (7.71-10.86)	9.5 (8.13-10.37)	0.225
Número de folículos >16 mm	3 (1.69-4.91)	3 (1.32-5.83)	3 (2.39-6.78)	0.968
Número de oócitos	3 (1.69-4.91)	5 (1.82-7.04)	4 (3.16-7.84)	0.773
Taxa de fertilização (%)	75	85	88	0.592
Número de embriões	1 (0.39-3.11)	2 (1.44-3.96)	2 (1.13-3.19)	0.210
Taxa de gestação clínica /ciclo (%)	25	10	21	0.575

Tabela 3. Dosagens de IGF-1, IGFBP-1 e IGFBP-3 no fluído folicular (valores expressos em mediana e intervalo de confiança de 95%)

	Grupo I (n=12)	Grupo II (n=10)	Grupo III (n=19)	Estatística <i>P</i>
IGF-1	125	144	134	0.185
(ng/ml)	(61.32-161.43)	(66.87-176.27)	(94.73-161.77)	
IGFBP-1	121.5	77*	99.5	0.007
(ng/ml)	(88.99-151.75)	(46.26-108.31)	(84.5- 124.34)	
IGFBP-3	2352.5	2852	2621	0.079
(ng/ml x100)	(1495.70-2930.54)	(2715.20-3045.38)	(2212.91-2958.76)	

* Teste de Dunn

Figura 1. Gráfico de dispersão das dosagens de IGFBP-1 entre os grupos



7. ANEXOS

PROTOCOLO DE PESQUISA

NOME: _____ REG. _____ IDADE: _____
PESO: _____ ALTURA: _____ IMC (KG/m²): _____
GRUPO: _____
CAUSA TUBÁRIA () _____
ENDOMETRIOSE: I () II () III () IV ()
OUTRAS: _____
Nº DE UNIDADES DE FSH: _____ Nº FERTILIZADOS: _____
Nº DE DIAS PARA INDUÇÃO: _____
Nº DE OÓCITOS: _____
% de fertilizados: _____
transferidos: _____
gestação: S () N ()
Fatores _____ Dosagem _____
IGF-1 _____
IGFBP-1 _____
IGFBP-3 _____

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Fluido folicular é um líquido que está junto com o seu óvulo e é obtido no momento em que o seu ovário é puncionado para a obtenção do seu óvulo. O fluido folicular não tem validade nenhuma após a coleta do seu óvulo e, normalmente, ele é desprezado.

Gostaríamos de convidá-la para participar do estudo “AVALIAÇÃO DO MEIO FOLICULAR EM PACIENTES INFÉRTEIS COM ENDOMETRIOSE”, tendo como objetivo principal à realização de um trabalho científico para a análise do fluido folicular de um determinado grupo de pacientes que a Senhora pode enquadrar-se.

A realização de laparoscopia faz parte de sua investigação de sua infertilidade e a chance de ocorrer alguma complicação é de 3 para 1033 exames realizados (BATEMAN et al., 1996). A senhora receberá uma avaliação pré-operatória cuidadosa antes de submeter-se à laparoscopia sob anestesia geral.

O procedimento de fertilização in vitro será absolutamente igual à rotina já estabelecida e o fluido folicular por nós estudado seria desprezado se assim não fosse utilizado, portanto a Senhora não corre nenhum risco adicional.

Estes exames e testes fazem parte de sua investigação usual, ou seja, não estaremos acrescentando nenhum exame para a sua investigação.

Eu, _____, fui informada dos objetivos especificados acima e da justificativa desta pesquisa, de forma clara e detalhada. Recebi informações específicas sobre cada procedimento no qual estarei envolvida, dos desconfortos ou riscos previstos, tanto quanto dos benefícios esperados. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Além disto, sei que novas informações, obtidas durante o estudo, me serão fornecidas e terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, em face de estas informações

O profissional, certificou-me de que as informações que eu forneci terão caráter

confidencial.

Fui informada que caso existam danos à minha saúde, causados diretamente pela pesquisa, terei direito a tratamento médico e indenização conforme estabelece a lei. Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

ASSINATURA DA PACIENTE:

ASSINATURA DO INVESTIGADOR:

ASSINATURA DO ORIENTADOR:

NOME DOS PESQUISADORES: NADIANE A LEMOS E EDUARDO P PASSOS

TELEFONE PARA CONTATO E DÚVIDAS: 98074390 OU 33168117