

RÍVIA MARA LAMAITA

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA NO SORO
E LÍQUIDO FOLICULAR EM PACIENTES COM
ANOVULAÇÃO CRÔNICA SUBMETIDAS A
HIPERESTIMULAÇÃO OVARIANA CONTROLADA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia – área de Ginecologia, da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, para obtenção do Título de Doutor

Orientador: Profa. Dra. Anaglória Pontes
Co-Orientador:a Profa. Dra. Andrezza Vilaça Belo

**BOTUCATU – SP
2006**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E
TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO
- CAMPUS DE BOTUCATU – UNESP -
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Lamaita, Rívia Mara.

Avaliação da resposta inflamatória no soro e líquido folicular em pacientes com anovulação crônica submetidas a hiperestimulação ovariana controlada / Rívia Mara Lamaita. – 2006.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2006

Orientadora: Anaglória Pontes

Co-orientador: Andrezza Vilaça Belo

Assunto CAPES: 40101150

1. Ginecologia endócrina 2. Ovários - Fisiologia
CDD 618.10043

Palavras-chave: Anovulação crônica; Estimulação ovariana; MCP1; MPO; NAG; PCR; Resposta inflamatória

DEDICO ESTA TESE...

Aos meus pais, José Arloyngue e Aline, pela dedicação, amor e incentivo ao longo de minha vida.

Ao meu marido Agnaldo, por ser companheiro, pelo amor, carinho e compreensão.

À minha filha Teresa pelos momentos de minha ausência.

Ao meu irmão Rodrigo e à minha família que tornam os caminhos mais suaves.

Sou profundamente grata à Professora Anaglória Pontes pela
confiança e oportunidade de trabalhar sob a sua orientação.

À Professora Andrezza Vilaça Belo pela disponibilidade,
paciência e ensinamentos que ampliaram meus horizontes na pesquisa
científica

AGRADECIMENTOS:

Um agradecimento especial ao Professor Aroldo Fernando Camargos, o grande responsável pela minha inserção na Reprodução Humana.

À Professora Sílvia Passos Andrade pela confiança e disponibilidade, por abraçar as minhas dúvidas e me incentivar na busca pelos meus resultados, abrindo as portas do Laboratório de Fisiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

Ao Dr. João Pedro Junqueira Caetano, diretor clínico da Clínica Pró-Criar, pela compreensão e pelo apoio incondicional a minha busca pelo conhecimento.

Ao Dr. Leonardo Meyer de Moraes e a Luciana Pompermeyer Teodoro Aguiar, médico embriologista e bióloga da Clínica Pró-Criar, pela ajuda e paciência na coleta do material e dados.

Aos colegas da Clínica Pró-Criar: Dra. Ana Márcia Cota Miranda, Dr. Antônio Geraldo de Oliveira Antunes, Dr. Sandro Magnavita Sabino, Dr. Ricardo Mello Marinho Dra. Bernadete Veado e Dra. Érica Becker por acreditarem nas minhas idéias e anseios e oferecerem suporte à execução desse trabalho.

À Dra. Cleusa Maria Vieira Miguel, médica patologista clínica do Hospital Mater Dei, pela disponibilidade e empenho no auxílio das dosagens do PCR.

A Dra. Cláudia Lourdes Soares Laranjeira e Dra. Juliana Marques Figueiredo Kaukal pela amizade, compreensão e possibilidade de uma convivência diária descontraída durante essa jornada.

Aos diretores e amigos do Hospital Mater Dei por acreditarem e colaborarem com meu trabalho.

Aos funcionários da Clínica Pró-Criar, especialmente Sílvia Letícia, Adriana Ferreira e Márcia Marcolino pela dedicação e carinho durante a execução desse trabalho.

Aos Professores do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Paulo Traiman, Rogério Dias, Gilberto Uemura, Jorge Náhas Neto e Eliana Aguiar Petri Nahás, que me receberam com cortesia e amizade.

A Ana Cláudia, secretária do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, pela sua disponibilidade e ajuda.

Este estudo recebeu apoio da CAPES.

"Nunca se deve engatinhar quando se tem o impulso de voar".

Hellen S ller

ÍNDICE:

Siglas
Glossário
Resumo

1. Introdução	1
1.1. Processo inflamatório	1
1.1.1. N-acetilglucosaminidase (NAG)	4
1.1.2. Miloperoxidasas (MPO)	5
1.1.3. Proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1)	6
1.1.4. Proteína C reativa (PCR)	8
1.2. A resposta inflamatória e o sistema reprodutivo	11
1.3. Anovulação crônica	18
1.4. Síndrome do hiperestímulo ovariano	21
2. Objetivos	24
2.1. Objetivo geral	24
2.2. Objetivos específicos	24
3. Casuística e Métodos	25
3.1. Casuística	25
3.1.1. Critérios de inclusão	26
3.1.2. Critérios de exclusão	26
3.2. Métodos	28
3.2.1. Hiperestimulação ovariana controlada	28
3.2.2. Coleta ovular	29
3.2.3. Coleta das amostras	31
3.2.4. Dosagens laboratoriais	31
3.2.4.1. Atividade de N-acetilglucosaminidase (NAG)	31
3.2.4.2. Atividade de Miloperoxidasas (MPO)	33
3.2.4.3. Dosagem da proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1)	35
3.2.4.4. Dosagem da Proteína C reativa (PCR)	39
3.3. Análise estatística	39
4. Resultados	41
4.1. Características gerais da amostra	41
4.2. Atividade de N-acetilglucosaminidase (NAG)	47
4.3. Atividade de Miloperoxidasas (MPO)	50
4.4. Dosagem da Proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1)	53
4.5. Dosagem da Proteína C reativa (PCR)	56
4.6. Associação das dosagens de NAG, MPO, MCP-1 e PCR com desfechos reprodutivos	60
5. Discussão	65
5.1. Resposta inflamatória na anovulação crônica	69
5.2. Resposta inflamatória e desfechos reprodutivos	72
5.3. Considerações finais	73
6. Conclusões	75
7. Referências bibliográficas	76
8. Anexos	92
I. Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) do Hospital Mater Dei	92
II. Termo de consentimento livre e esclarecido	95
9. Summary	97

SIGLAS:

- CEP** Comitê de Ética e Pesquisa
- cm³** Centímetros cúbicos
- EGF** Fator de crescimento epidermal
- ELISA** *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*
- FGF** Fator de crescimento de fibroblastos
- FIV** Fertilização *in vitro*
- FSH** Hormônio folículo estimulante
- GM-CSF** Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos
- GnRH-a** Agonista do hormônio liberador de gonadotrofinas
- GRO- α** Oncogene- α regulador do crescimento
- hCG** Gonadotrofina coriônica humana
- hMG** Gonadotrofina menopausal humana
- ICSI** Injeção intracitoplasmática de espermatozóides
- IGF-I** Fator insulínico de crescimento I
- IGF II** Fator insulínico de crescimento II
- IL-1** Interleucina-1
- IL-2** Interleucina-2
- IL-4** Interleucina-4
- IL-5** Interleucina-5
- IL-6** Interleucina-6
- IL-8** Interleucina-8
- IL-10** Interleucina 10
- IL-12** Interleucina-12
- IL-13** Interleucina-13
- IMC** Índice de massa corpórea
- INF- λ** Interferon- λ
- Kg/m²** Kilograma por metro ao quadrado
- LH** Hormônio luteinizante
- Linfócitos NK** Linfócitos *Natural Killer*
- M** Molar

MCP-1 Proteína quimiotática de monócitos-1
mg/l Miligrama por litro
μl Microlitro
mm Milímetros
MPO Mieloperoxidase
NAG N-Acetilglucosaminidase
NF-kB Fator nuclear-kB
ng/ml Nanograma por mililitro
nm Nanômetro
PCR Proteína C reativa
PDGF Fator de crescimento derivado de plaquetas
RNA-m Ácido ribonucléico mensageiro
rpm Rotações por minuto
SHO Síndrome do Hiperestímulo Ovariano
SOP Síndrome dos ovários policísticos
TGF α Fator de transformação do crescimento α
TGF β Fator de transformação do crescimento β
TNF-α Fator de necrose tumoral-α
VEGF Fator de crescimento vascular endotelial

GLOSSÁRIO:

Análogo do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH-a) O acetato de leuprolida é um nonapeptídeo sintético análogo agonista do hormônio liberador da gonadotrofina natural (GnRH ou LH-RH). Possui maior potência que o hormônio natural e atua como um inibidor da produção de gonadotrofina.

Astenoteratozoospermia Presença de alterações na motilidade e morfologia dos espermatozóides

Astenozoospermia Contagem de espermatozóides móveis com progressão linear abaixo de 50%

Azoospermia Ausência de espermatozóides no ejaculado

Gonadotrofina coriônica humana (hCG) É um hormônio glicoprotéico obtido de mulheres grávidas. Estimula a formação de esteróides nas gônadas, particularmente da progesterona após a ovulação, devido ao efeito biológico similar ao do LH. Promove a maturação folicular e induz a sua ruptura, que acontece no período de 34 a 36 horas após a sua administração.

Gonadotrofina menopausal humana (hMG) Extrato purificado obtido a partir da urina de mulheres menopausadas. A ampola utilizada contém 75 UI de FSH e LH. O mecanismo de ação baseia-se na promoção do recrutamento e crescimento folicular promovidos pelo FSH, enquanto o LH é necessário para a esteroidogênese plena.

Mieloperoxidase (MPO) Enzima pró-inflamatória e marcador indireto da proliferação de neutrófilos.

N-Acetilglucosaminidase (NAG) Enzima que atua como um marcador indireto da proliferação de macrófagos/monócitos.

- Nefelometria** Nefelometria é um método direto de medida de uma luz incidente sendo uma técnica sensível para quantificar as reações de precipitação entre antígenos e anticorpos.
- Oligoastenoteratozoospermia** Presença de alterações na concentração, motilidade e morfologia dos espermatozóides
- Oligoastenozoospermia** Presença de alterações na concentração e motilidade dos espermatozóides
- Oligozoospermia** Contagem ou concentração de espermatozóides por mililitro abaixo de vinte milhões.
- Proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP1)** Quimiocina que age especificamente como um agente químico atrativo e ativador de macrófagos/monócitos durante um processo inflamatório.
- Síndrome do Hiperestímulo ovariano (SHO)** Complicação iatrogênica na maioria das vezes grave, conseqüente a hiperestimulação ovariana controlada principalmente se realizada com gonadotrofinas e à administração do hCG, evoluindo com aumento da permeabilidade capilar e acúmulo de líquido no terceiro espaço.
- Teratozoospermia** Contagem menor que 30% de espermatozóides com morfologia normal, ovais pelos critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS) ou menor que 14% pelos critérios estritos de Kruger

RESUMO:

Introdução: A anovulação crônica é o distúrbio ovariano mais freqüente associado com quadros de infertilidade. Mecanismos inflamatórios apresentam um importante envolvimento na determinação da anovulação crônica. Esse estudo foi realizado para avaliar a resposta inflamatória no líquido folicular e soro de pacientes com infertilidade causada por anovulação crônica comparadas a pacientes ovulatórias e com ciclos regulares, submetidas à injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).

Métodos: Treze pacientes com anovulação crônica (casos) e 23 mulheres ovulatórias e com ciclos regulares (grupo controle) foram estudadas prospectivamente. As dosagens de N-acetilglucosaminidase (NAG), Mieloperoxidase (MPO), proteína quimioatrativa de monócitos-1 (MCP-1) e proteína C reativa (PCR) foram avaliadas no soro e líquido folicular obtidos no período da coleta dos oócitos.

Resultados: A média de idade das pacientes variou de 20 a 37 anos ($28,9 \pm 0,6$ anos). O valor médio do índice de massa corporal (IMC) foi $21,7 \pm 0,4$ kg/cm² (17,6 to 28,0 kg/cm²). Não houve diferenças entre os grupos com relação à média de idade, IMC e dosagens de hormônio folículo estimulante (FSH). As pacientes com anovulação crônica apresentaram níveis maiores de hormônio luteinizante (LH), contagem de folículos antrais e volume ovariano. Nas pacientes com anovulação crônica foram observadas atividades elevadas de NAG ($p=0,025$) e MPO ($p=0,030$) no líquido folicular quando comparadas a mulheres ovulatórias, submetidas a ICSI. Os níveis de MCP-1 no líquido folicular foram maiores que no soro em todas as pacientes. O PCR no fluido folicular ($p=0,025$) e soro ($p=0,024$) estavam mais elevados nas pacientes com anovulação crônica que no grupo controle. A ocorrência de síndrome do hiperestímulo ovariano (SHO) foi associada com níveis elevados de MCP-1 no líquido folicular ($p=0,038$) e PCR no soro ($p=0,016$).

Conclusões: Pacientes com anovulação crônica associaram-se com uma proliferação folicular elevada de macrófagos e neutrófilos e também com uma resposta inflamatória inespecífica comparadas a mulheres ovulatórias e com ciclos regulares, submetidas a ICSI. Níveis de MCP-1 no líquido folicular e de PCR no soro associaram-se com a ocorrência da SHO.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Processo inflamatório

Denomina-se inflamação a reação do tecido vivo vascularizado a uma agressão local⁽¹⁾. A inflamação serve para destruir, diluir, ou imobilizar o agente agressor⁽¹⁾. O processo inflamatório está intimamente relacionado com o processo de reparo⁽²⁾. O reparo inicia-se durante as primeiras fases da inflamação, atingido o seu pico após a neutralização da agressão. No entanto, a inflamação e reparo podem ser potencialmente nocivos⁽²⁾.

O processo inflamatório pode ser dividido, didaticamente, em fase aguda e crônica⁽³⁾. A fase aguda tem curta duração e caracteriza-se por alteração da permeabilidade vascular com exsudação de líquidos e proteínas plasmáticas, liberação de mediadores inflamatórios e leucócitos polimorfonucleares, predominantemente neutrófilos, para o sítio da lesão⁽³⁾. Os principais fatores responsáveis pela quimiotaxia neutrofílica são a fração 5a do complemento, interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α)⁽³⁾. Esse tipo celular é responsável pela resposta fagocítica rápida e não específica e pela ação destrutiva de seus conteúdos granulares⁽³⁾.

Os mediadores químicos envolvidos na fase aguda da inflamação originam-se do plasma, células imunológicas ou tecido agredido⁽⁴⁾. Destacam-se as aminas vasoativas (histamina, serotonina), as proteases plasmáticas (componentes do sistema complemento, da coagulação e as cininas), os metabólitos do ácido aracdônico, constituintes lisossômicos (grânulos de monócitos e neutrófilos, proteases, hidrolases), radicais livres de oxigênio, fator ativador plaquetário, citocinas e fatores de crescimento⁽⁴⁾.

Caso os leucócitos envolvidos nessa etapa do processo inflamatório consigam extinguir o estímulo, ocorrerá o reparo tissular⁽⁴⁾. A persistência do estímulo inflamatório implica recrutamento contínuo e ativação de células mononucleares, estabelecendo-se uma inflamação crônica⁽⁴⁾. A ativação contínua de células mononucleares provoca um aumento de produção e secreção de citocinas inflamatórias, as quais amplificam e perpetuam a resposta à lesão⁽⁴⁾.

O macrófago é a figura central da inflamação crônica devido ao grande número de substâncias biologicamente ativas que produz como citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento⁽⁵⁾. O acúmulo de macrófagos durante a resposta inflamatória ocorre pelo recrutamento de monócitos da circulação⁽⁶⁾. Sua ativação resulta na liberação de fatores quimiotáticos direcionados a vários tipos de células, ou na produção de substâncias tóxicas para os tecidos envolvidos no processo inflamatório, ou ainda na proliferação de fibroblastos com deposição de colágeno, levando ao reparo tecidual⁽⁶⁾.

Outros tipos celulares presentes na inflamação crônica são os linfócitos, plasmócitos, eosinófilos, mastócitos e neutrófilos, apesar desses últimos serem os tipos celulares característico de um processo inflamatório agudo⁽⁷⁾.

As citocinas são glicoproteínas capazes de modular várias respostas biológicas⁽⁷⁾. Além da resposta imune e inflamatória, também estão presentes nas reações alérgicas, na hematopoiese, no crescimento ósseo, no remodelamento tecidual e na homeostasia glicêmica⁽⁷⁾.

O monócito/macrófago apresenta atividade celular citotóxica e modula as funções de linfócitos T e B por meio da liberação de citocinas como as IL 1 (α/β), IL-6, interleucinas-10 (IL-10) e interleucinas-12 (IL-12) e o fator

estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF)⁽⁷⁾. As IL-6, IL-10 e IL-12 influenciam o desenvolvimento das células T citotóxicas e células T *helper*⁽⁸⁾. Essas últimas produzem citocinas do tipo I (Th1) ou tipo II (Th2)⁽⁸⁾. As citocinas do tipo I são representadas pelo interferon- λ (IFN- λ), interleucina-2 (IL-2) e linfotoxina, promovendo uma resposta imune celular⁽⁸⁾. As citocinas tipo II associam-se à resposta imune humoral, sendo representadas pela interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), IL-6, IL-10 e interleucina-13 (IL-13)^(7,8).

1.1.1. N-Acetilglucosaminidase (NAG)

A N-Acetilglucosaminidase (NAG) é uma enzima lisossômica intracelular liberada por macrófagos durante o processo de fagocitose, lise celular ou dano tecidual^(9,10).

A detecção da atividade do NAG em fluidos biológicos, juntamente com os níveis de cito/quimiocinas inflamatórias pode ser utilizado como marcador indireto do acúmulo de macrófagos ativados e da resposta inflamatória^(9,10).

1.1.2. Mieloperoxidase (MPO)

A mieloperoxidase (MPO) é uma hemoproteína tradicionalmente vista como uma enzima microbicida, expressada por células polimorfonucleares, os neutrófilos e secretada durante a ativação dessas células^(9,10). Possui potente propriedade pró-inflamatória e pode contribuir diretamente com a lesão tecidual^(9,10). Pode também ser minimamente expressada por monócitos e macrófagos^(9,10).

Seu mecanismo de ação antimicrobiano ocorre pela conversão do peróxido de hidrogênio sintetizado pelo neutrófilo em hidroxiloreto, um poderoso oxidante de membranas celulares, destruindo as células⁽¹⁰⁾.

As células polimorfonucleares representam a fonte celular intravascular mais freqüente da MPO e contribuem com 95% do seu conteúdo total circulante^(9,10).

A enzima mieloperoxidase é considerada um importante marcador quantitativo indireto de neutrófilos e representa um modelo potencial para diagnóstico e intervenções terapêuticas nas doenças vasculares e inflamatórias em geral⁽¹¹⁾.

1.1.3. Proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1)

As quimiocinas, embora considerados membros da superfamília das citocinas, estabelecem rapidamente a sua própria identidade e são proteínas de baixo peso molecular (oito a doze kilodaltons)⁽¹²⁾. Elas agem através de receptores de superfície celular, ativando a proteína G e promovendo a fosforilação da guanosina trifosfato⁽¹²⁾. São potentes quimioatrativas de leucócitos, uma regra essencial na ativação da resposta inflamatória⁽¹²⁾.

Mais de trinta quimiocinas diferentes já foram identificadas e elas se agrupam basicamente em quatro famílias⁽¹³⁾. As duas principais subfamílias de quimiocinas são distinguidas estruturalmente pela presença ou ausência de um aminoácido (X) entre os dois primeiros resíduos de cisteína, constituindo a α quimiocina ou CXC e a β quimiocina ou CC⁽¹³⁾. A proteína -1 quimiotática de monócitos (MCP-1), que atrai monócitos e células T é o tipo representativo do grupo CC. As do tipo CXC são específicas para neutrófilos⁽¹³⁾. As outras duas subfamílias são CX₃C com três aminoácidos entre os dois resíduos de cisteína e C com uma única cisteína próximo ao N-terminal, com potente capacidade de quimioatração de linfócitos, mas nenhuma ação em monócitos⁽¹³⁾.

Cada grupo de quimiocinas apresenta seus receptores distintos em células alvo⁽¹⁴⁾. Cada receptor pode servir como ligação para várias citocinas do mesmo grupo⁽¹⁴⁾.

O MCP-1 age especificamente como um agente químico atrativo e ativador de macrófagos/monócitos⁽¹⁵⁾. É secretado por várias células incluindo as endoteliais, fibroblastos e monócitos⁽¹⁵⁾.

A expressão de MCP-1 tem sido observada no estroma ovariano e nas células granulosas-luteinizadas, sugerindo sua potencial importância na formação do

corpo lúteo⁽¹⁵⁾. Demonstrou-se também um elevado nível dessa quimiocina durante o processo ovulatório, induzido pelo pico de hormônio luteinizante (LH)⁽¹⁵⁾. Ela atrai os leucócitos para o interior de folículos que estão ovulando e assim mimetizam uma resposta inflamatória local⁽¹⁵⁾. Possui uma correlação positiva dependente da duração e da concentração de IL-1 e TNF- α ⁽¹⁵⁾.

Os estudos têm demonstrado que o MCP-1 é também expresso no corpo lúteo humano, principalmente pelas células endoteliais dos vasos que o circundam⁽¹⁶⁾. Sua produção nesses vasos é induzida por vários agentes secretados pelas células lúteas⁽¹⁶⁾. Corresponde a substâncias oxigênio reativas, citocinas como IL-1, TNF- α , INF- λ e fatores de crescimento como o fator de crescimento epidermal (EGF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)⁽¹⁶⁾. A expressão dessa quimiocina, juntamente com a infiltração de macrófagos, aumentou com o processo de luteólise⁽¹⁶⁾.

1.1.4. Proteína C reativa (PCR)

A Proteína C Reativa (PCR) é um polímero não glicosilado, composta por cinco subunidades idênticas⁽¹⁷⁾.

A PCR foi descoberta em 1930 onde se observou que poderia ligar-se ao polissacarídeo C do pneumococo⁽¹⁸⁾. Sabe-se agora que a PCR reconhece especificamente a fosfocolina, porção hidrofílica da fosfatidilcolina, nas membranas celulares⁽¹⁸⁾. A complexa ação da PCR ativa as paredes celulares do complemento estimulando o processo de fagocitose em macrófagos e demais células⁽¹⁸⁾.

A Proteína C Reativa é uma das principais proteínas de fase aguda produzida pelo fígado para combater a invasão de antígenos⁽¹⁸⁾. A sua concentração pode aumentar precocemente de dez a cem vezes, nas primeiras 24 horas, em processos infecciosos, inflamatórios, infarto do miocárdio e neoplasias⁽¹⁸⁾. A liberação de PCR é mediada por citocinas como a IL-6, que estimulam os hepatócitos preferencialmente na produção de proteínas inflamatórias de fase aguda no lugar de outras proteínas como albumina e a transferrina⁽¹⁸⁾.

Em algumas circunstâncias, a dosagem de PCR pode ser usada para discriminar processo infeccioso bacteriano, quando está elevada, do processo infeccioso viral, quando permanece em níveis baixos⁽¹⁸⁾.

É encontrada em baixas concentrações no soro de indivíduos saudáveis⁽¹⁹⁾. Em situações agudas como nas infecções, processos inflamatórios ou de destruição tecidual, ela se eleva rapidamente⁽¹⁹⁾. Sua presença no sangue pode ser detectada a partir de reação de precipitação específica⁽¹⁹⁾. Tem sido especialmente valorizada na sinalização precoce do processo inflamatório em doenças cardiovasculares, devido à hipótese de sua produção ser estimulada

pela lesão do endotélio vascular⁽¹⁹⁾. Estudos comparativos mostram ser o PCR um marcador mais sensível na detecção da resposta inflamatória endotelial, em relação a outros existentes como o soro amilóide A, a interleucina 6, a Apo A, a Apo B e a homocisteína⁽¹⁹⁾. No entanto, sua inespecificidade faz com que o tabagismo, a obesidade e outros fatores reproduzam resultados falsos positivos⁽¹⁹⁾.

A PCR tem vida média de cinco a sete horas e por isto seus valores caem a níveis de referência mais rapidamente que outras proteínas de fase aguda⁽²⁰⁾. Elevações de PCR ocorrem mais rapidamente do que o aumento da velocidade de hemossedimentação⁽²⁰⁾.

Quando a resposta é mediada por neutrófilos ou monócitos, a síntese hepática de PCR está aumentada, atingindo 100 mg/l⁽²⁰⁾. Em uma resposta inflamatória mediada por linfócitos, a síntese hepática de PCR não se altera ou pode estar ligeiramente aumentada, fazendo com que os valores séricos não se modifiquem ou raramente excedam a 26 mg/l⁽²⁰⁾.

Os valores dos testes laboratoriais utilizados como referência são inferiores a 0,11 mg/dl quando utilizados para avaliação de risco de doença vascular e inferiores a 0,5 mg/dl quando utilizados para avaliar processos inflamatórios/infecciosos⁽²¹⁾.

Devido à sua alta sensibilidade (limite de detecção de 0,02 mg/dl), a dosagem de PCR ultra-sensível pode ser utilizada⁽²¹⁾. É importante ressaltar que a maioria dos métodos rotineiros que dosam essa proteína tem um limite de detecção entre 0,4 e 0,5 mg/dl, adequados para a utilização clínica tradicional da Proteína C Reativa⁽²¹⁾.

Com relação ao ciclo menstrual normal, não há relatos entre alterações do PCR entre as suas diversas fases, exceto pela observação de aumento nos seus níveis seguido à administração de estrogênio⁽²²⁾.

1.2. A resposta inflamatória e o sistema reprodutivo

A relação entre o sistema imune e reprodutivo é evidenciada pela presença de fatores reguladores de caráter parácrino e autócrino entre esses sistemas⁽²³⁾.

Uma resposta imune persistente do tipo I ou II tem sido implicada no processo reprodutivo das mulheres. As citocinas do tipo I estariam correlacionadas com uma diminuição da fecundidade assim como as do tipo II com o seu aumento⁽¹⁴⁾.

No ciclo menstrual e na fase inicial da gestação são observadas alterações no número e padrão de leucócitos presentes no útero e ovários^(23,24). A regulação da migração e replicação leucocitária, sua resposta a substâncias quimioatrativas e a secreção de fatores parácrinos podem estar direta ou indiretamente sujeitos ao controle hormonal nas diversas fases, como ovulação, função lútea, proliferação endometrial, decidualização e parto^(23,25).

Os macrófagos constituem o principal componente do compartimento celular intrafolicular e fonte primária das citocinas. Quando maduros, entram na corrente sanguínea como monócitos sendo responsáveis pela homeostasia tecidual. Apresentam atividades como fagocitose, remoção de debris celulares apoptóticos, degradação de antígenos estranhos e ativação de células T. Produzem proteases para a dissolução da matriz celular e proteínas ligadas à matriz e membrana celular. Os macrófagos promovem ainda remodelamento dos tecidos e secretam substâncias específicas como as citocinas.

O macrófago atua nas diversas fases do ciclo ovariano (Figura 1.1). A liberação de citocinas e fatores de crescimento regulam os aspectos funcionais das células da teca e granulosa. As quimiocinas, membros da superfamília das citocinas e liberadas pelos macrófagos, são responsáveis pela atração e

ativação de monócitos, neutrófilos e células T provenientes da circulação sanguínea para o ovário. As quimiocinas estão envolvidas nos processos de desenvolvimento folicular e atresia, ovulação, esteroidogênese ovariana e na formação, desenvolvimento e regressão do corpo lúteo^(5, 26,27).

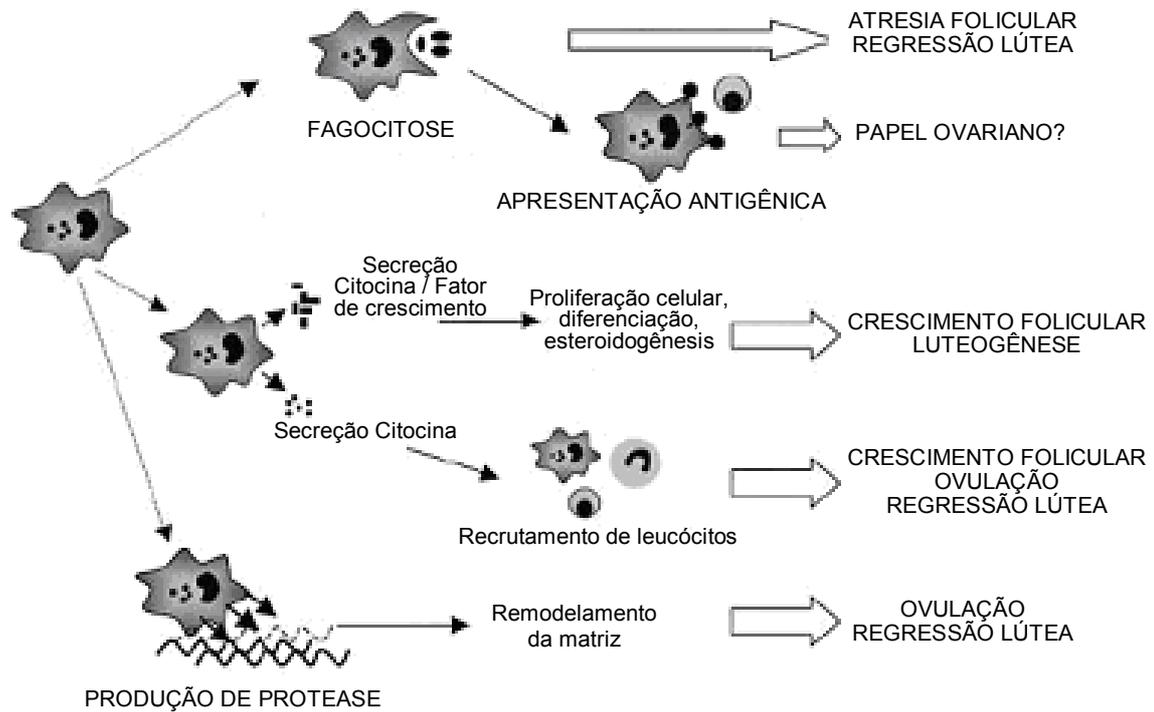


Figura 1-1

Representação esquemática da resposta inflamatória mediada por macrófagos no ciclo menstrual. O macrófago é capaz de fagocitose contribuindo para o processo de apoptose celular, apresenta antígenos e ativa linfócitos T, secreta substâncias como as quimiocinas que atraem macrófagos/monócitos e neutrófilos para o ovário e secretam proteases para a digestão da matriz. Impacto causado na função ovariana.

Nota: Adaptado de Wu R et al.⁽⁵⁾, 2004. p. 120

Outras células presentes no ovário, além dos macrófagos, secretam citocinas como as células T, as células da granulosa e as células do complexo *cumulus-oophorus*⁽⁷⁾. As citocinas exercem importantes funções no ciclo menstrual^(28,29). A interleucina-8 (IL-8) apresenta uma alta concentração na camada da teca vascularizada durante a foliculogênese normal e associa-se ao acúmulo de neutrófilos^(28,29). Dessa forma, a IL-8 atua como um mediador da atração de neutrófilos durante o desenvolvimento folicular⁽²⁹⁾. O ovário produz ainda IL-1 β , IL-6, IL-8, GM-CSF e TNF- α durante o período pré-ovulatório⁽²⁸⁾.

O TNF- α influencia a biossíntese de esteróides sexuais, modula a ligação das gonadotrofinas aos seus receptores no ovário e afeta a foliculogênese e maturação ovariana^(7,30). Quando esse fator encontra-se em associação com o INF- λ , os estudos têm demonstrado uma redução na produção de estradiol e progesterona pelas células lúteas humanas^(7,30).

A atividade quimiotática de neutrófilos no fluido folicular de folículos periovulatórios é maior nos ciclos onde houve concepção em comparação aos ciclos não-concepcionais⁽²⁴⁾. O oncogene- α regulador do crescimento (GRO- α), outro fator quimioatrativo de neutrófilos dez vezes mais potente que IL-8, está presente no fluido folicular periovulatório⁽³¹⁾. Acredita-se que o estroma ovariano e as células da granulosa e luteínicas expressem o ácido ribonucléico mensageiro (RNA-m) desse fator⁽³¹⁾.

Similarmente, o MCP-1 também foi expressa em cultura de células da granulosa luteinizada e do estroma do ovário⁽³²⁾. Sua concentração foi estimulada e mediada pela interleucina-1 (IL-1), pelo TNF- α e LH e hormônio gonadotrófico coriônico (hCG)⁽³²⁾. O MCP-1 contribui para a migração de

macrófagos para o folículo pré-ovulatório e é regulado também pelos hormônios esteróides ovarianos⁽³²⁾.

A regulação de IL-8, IL-10, GRO- α e MCP-1 nas células do ovário por seus hormônios tróficos sugere que essas citocinas têm uma regra importante na fisiologia dos eventos periovulatórios, tanto quanto no processo de ruptura do folículo⁽²³⁾.

Após a ocorrência da ovulação, são necessários o reparo e organização do local da ruptura folicular para a produção do corpo lúteo⁽³³⁾. Acontece nessa fase, uma migração maciça para o seu interior de leucócitos, coincidindo com a neovascularização que se instala nesse momento⁽³⁴⁾. Essa rápida vascularização do corpo lúteo é acreditada ser guiada por fatores angiogênicos detectados no fluido folicular, sendo a IL-8 descrita como um potente fator^(23,35).

Se a ovulação não é seguida pela fertilização e pela gravidez, ocorrerá a regressão do corpo lúteo⁽³⁶⁾. Nessa fase é descrita a importante presença do MCP-1, demonstrada por imunohistoquímica e análise pelo *Northern blot* em corpo lúteo de ratos, relacionando-o com o estado funcional desse componente celular⁽³⁷⁾.

Outro estudo realizado em porcos observou ser as células lúteas uma fonte tanto de MCP-1 quanto da proteína quimiotática de monócitos-2 (MCP-2). Esses compostos foram identificados nas células do corpo lúteo de porcos por clonagem do DNA complementar, análise da reação em cadeia da polimerase (PCR) e análise pelo *Northern blot*, associando a presença dessas citoquinas ao funcionamento do corpo lúteo e sua regressão^(38,39).

O seguimento em reprodução humana é primeiramente dependente do sucesso no processo de implantação no endométrio materno sete a dez dias

após o pico ovulatório do LH⁽⁴⁰⁾. Esse processo traz o embrião para um contato direto com células maternas imunocompetentes⁽⁴⁰⁾. Há evidências para uma dicotomia na resposta imunológica mediada por células *T-helper*, com um aumento nas citocinas T-helper-1 (TH-1) durante o processo de rejeição embrionária, enquanto as citocinas T-helper-2 (TH-2) conferem proteção⁽⁴⁰⁾. Essas respostas não foram demonstradas serem dependentes de variações hormonais durante o ciclo menstrual⁽⁴⁰⁾.

Nenhum estudo demonstrou mudanças no número total de linfócitos circulantes e na variação de porcentagem de subtipos de linfócitos durante o ciclo menstrual⁽⁴¹⁾.

Alguns estudos encontraram uma maior concentração e função de granulócitos, representados principalmente por neutrófilos, um essencial componente da resposta inflamatória aguda, durante a gravidez e na fase lútea, quando comparados com a fase folicular menstrual⁽⁴²⁾. Isso refere um possível efeito regulador causado pelo estrogênio e a progesterona⁽⁴²⁾.

O mecanismo de ação do estradiol, progesterona e testosterona no controle da produção de citocinas parece ser mediado pelo fator nuclear-kB (NF-kB), um fator induzível da transcrição que regula positivamente a expressão de genes pró-ímmunes e pró-inflamatórios⁽⁴³⁾. Tem-se demonstrado que o complexo receptor/esteróide pode fisicamente interagir com NF-kB e inibir sua atividade de transcrição⁽⁴³⁾. Através desse mecanismo, esses hormônios sexuais podem inibir a expressão das citocinas pró-inflamatórias nas células ímmunes⁽⁴³⁾. Ainda permanecem obscuros todos os passos dessa complexa interação⁽⁴³⁾.

Por sua vez, as citocinas são consideradas importantes na criação de um ambiente favorável para o sucesso do ciclo reprodutivo, na implantação e gestação⁽⁴⁴⁾.

1.3. Anovulação crônica

A chamada anovulação persistente ou crônica e também a síndrome dos ovários polimicrocísticos (SOP) é uma desordem heterogênea, de etiologia desconhecida e presente em aproximadamente cinco a 10% das mulheres na idade reprodutiva⁽⁴⁵⁾. Acomete tanto o sistema reprodutivo, quanto o endócrino e metabólico, levando a um modelo crescente de preocupação preventiva na assistência à saúde⁽⁴⁶⁾. É a causa mais comum de infertilidade de causa ovariana⁽⁴⁶⁾.

Várias teorias e sistemas tentam explicar a etiologia desse distúrbio⁽⁴⁷⁾. Os ovários policísticos surgem quando se instala um estado de anovulação persistente por qualquer tempo de duração⁽⁴⁷⁾. É caracterizado pelo lento crescimento e desenvolvimento dos folículos antrais cuja vida média pode estender-se por vários meses, gerando cistos foliculares múltiplos que acumulam no parênquima ovariano⁽⁴⁷⁾.

As células foliculares presentes nos ovários policísticos de pacientes anovulatórias são caracterizadas pela excessiva produção de androgênio e estrogênio, levando a um microambiente endócrino anormal, que contribui para as alterações clínicas encontradas⁽⁴⁷⁾.

Não foi evidenciado até o momento um defeito fisiopatológico específico que caracterize a SOP⁽⁴⁷⁾. Esses incluem vários momentos envolvidos no controle neuro-enzimático-protéico-hormonal do ciclo menstrual e que podem se alterar, mudando assim toda a dinâmica do funcionamento ovariano⁽⁴⁷⁾. Esse mecanismo cíclico é regulado pelo hormônio folículo estimulante (FSH), LH, estradiol e inibina transmitindo mensagens entre o ovário e o eixo hipotálamo-hipófise⁽⁴⁷⁾. Fatores parácrinos/autócrinos como o fator de crescimento

insulínico II (IGF-II), inibina, ativina, folistatina e outros também coordenam a seqüência de atividades dentro do folículo dominante⁽⁴⁷⁾. A disfunção pode acontecer devido a uma anormalidade em qualquer evento responsável pelo controle dessas substâncias ou em uma incapacidade de responder adequadamente aos sinais necessários⁽⁴⁷⁾.

É observada nas portadoras da SOP uma hipersecreção de LH que estimula a parada prematura do crescimento dos folículos ainda em tamanhos bem pequenos^(47,48). Esse evento pode ser precipitado ou ampliado pela ação gonadotrófica da insulina em conjunto com o excesso de androgênio⁽⁴⁷⁾.

Essa alta proporção de folículos antrais prematuramente avançados no seu desenvolvimento produzem níveis elevados de estradiol e inibina-B⁽⁴⁷⁾. Isso contribui para o retrocontrole negativo na secreção de FSH, abaixando seus níveis em relação à fase folicular precoce de ciclos normais⁽⁴⁷⁾. Sob a influência de baixos, mas constantes níveis de FSH, múltiplos folículos são estimulados, porém não alcançam a maturação⁽⁴⁷⁾.

Os critérios para o diagnóstico clínico da SOP são controversos sobre quais os critérios seriam preponderantes na definição do quadro⁽⁴⁹⁾. Recentemente, em uma tentativa de padronizar os critérios diagnósticos para a SOP, obteve-se um consenso entre as sociedades americana e europeia de medicina reprodutiva e embriologia, chamado Consenso de Rotterdam, revisado em 2003 e publicado em 2004⁽⁴⁹⁾. Pelo Consenso definiu-se que a SOP é uma condição primariamente ovariana na ausência de morbididades como hiperprolactinemia, hiperplasia adrenal congênita ou tumores secretores de androgênios que quando associadas poderiam levar a um quadro de distúrbio ovulatório⁽⁴⁹⁾. Para o diagnóstico deveriam estar presentes dois ou mais dos

seguintes critérios: oligo e/ou anovulação, sinais clínicos e/ou bioquímicos de hiperandrogenismo e, no mínimo, um ovário de aspecto polimicrocístico a ultrassonografia⁽⁴⁹⁾. Morfologicamente, essa aparência ultrassonográfica ovariana seria definida pela presença de um ovário com doze ou mais folículos medindo entre dois a nove mm de diâmetro e/ou um volume ovariano acima de dez cm³⁽⁴⁹⁾. Esses critérios, apesar das críticas a ele atribuídas, foram aceitos pela comunidade científica como uma tentativa de padronizar o diagnóstico e a definição da SOP, principalmente para pesquisas epidemiológicas sobre a patofisiologia e tratamento dessa entidade⁽⁴⁹⁾.

Clinicamente as pacientes podem apresentar quadros de obesidade, hiperandrogenismo bioquímico ou clínico manifestando-se por hirsutismo, acne e/ou alopecia androgênica, distúrbios menstruais variando de um estado de amenorréia persistente a oligomenorréia, ou sangramento uterino disfuncional⁽⁵⁰⁾. Outra importante manifestação clínica seria a infertilidade ou as perdas gestacionais recorrentes, freqüentes nesse grupo de pacientes⁽⁵⁰⁾.

O principal mecanismo etiológico de infertilidade nessas pacientes é a anovulação persistente, sendo necessário o uso de drogas indutoras para restabelecer o processo ovulatório⁽⁴⁶⁾. A maioria das mulheres anovuladoras crônicas responde de forma exacerbada a esse tipo de tratamento ao recrutar múltiplos folículos, apresentando risco aumentado para gravidez múltipla e síndrome do hiperestímulo ovariano⁽⁴⁶⁾. O processo pelo qual há um aumento da sensibilidade as gonadotrofinas exógenas não é ainda completamente conhecido⁽⁴⁶⁾.

Em mulheres com SOP e hiperandrogenismo, os estudos demonstraram uma relação entre o sistema imune e o endócrino promovendo um decréscimo nos

linfócitos T CD8⁺ e NK (linfócitos *natural killer*)⁽¹⁵⁾. Não houve diferenças entre a produção de IL-1 e TNF- α entre ovários de pacientes normais e com ovários micropolicísticos^(15, 51).

Estudos foram feitos para determinar o mecanismo pelo qual o tratamento de ovários polimicrocísticos com a técnica de laser (“*ovarian drilling*”) restaurava a ovulação. Os resultados mostraram uma consistente resposta inflamatória local após seis horas do procedimento e persistindo além do décimo segundo dia pós-operatório, sugerindo que sua eficiência nesse grupo de pacientes poderia ser atribuído aos produtos secretados pelas células inflamatórias⁽¹⁵⁾.

O excesso de LH presente nas pacientes com anovulação crônica influencia na síntese de pró-renina e do fator vascular de crescimento endotelial (VEGF), substâncias importantes no processo de angiogênese e que poderiam contribuir para o risco elevado para a síndrome do hiperestímulo ovariano⁽⁵²⁾.

1.4. Síndrome do Hiperestímulo Ovariano (SHO):

A síndrome do hiperestímulo ovariano (SHO) é uma condição fisiológica e iatrogênica conseqüente à estimulação ovariana farmacológica, especialmente quando utilizado gonadotrofinas⁽⁵³⁾. Suas manifestações instalam-se após o pico de hCG, administrado para completar a maturação oocitária ou estimular a ocorrência da ovulação⁽⁵³⁾.

O mecanismo patológico principal da SHO é o aumento da permeabilidade capilar resultando no extravasamento de líquido do espaço vascular para o terceiro espaço⁽⁵⁴⁾. Os fatores envolvidos nesse processo compreendem a exudação de fluidos protéicos dos ovários aumentados de volume ou da

superfície peritoneal, aumento nos níveis de pró-renina e renina no líquido folicular e alterações na permeabilidade vascular secundária a angiotensina⁽⁵⁴⁾. As citocinas também se encontram presentes na fisiopatologia da SHO⁽⁵⁴⁾. A mais estudada é o VEGF, considerado um estimulador e fator de permeabilidade do endotélio vascular^(54,55). O VEGF é importante para o desenvolvimento folicular, no funcionamento do corpo lúteo e na angiogênese ovariana^(54,55,56). Sua concentração encontra-se diretamente proporcional com a gravidade da SHO e é estimulada pelo hCG⁽⁵⁴⁾. Outros fatores direta ou indiretamente envolvidos na SHO, via VEGF, seriam angiotensina II, IGF-1, EGF, TGF (fator de transformação do crescimento), FGF (fator de crescimento de fibroblastos), PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), IL-1 e IL-6^(54,55,56).

Os fatores de risco para a ocorrência da SHO são pacientes jovens, baixo peso corporal, SOP, altas doses de gonadotrofinas, níveis elevados ou aumento súbito do estradiol, episódios prévios de SHO, grande número de folículos em desenvolvimento e de oócitos retirados durante procedimento de reprodução assistida⁽⁵⁷⁾.

Clinicamente a SHO manifesta-se com sintomas relacionados ao acúmulo de líquido no terceiro espaço, portanto edema, ascite derrame pleural e/ou pericárdico, hemoconcentração, leucocitose, hipovolemia, oligúria, distúrbio hidroeletrólítico, náuseas, vômitos, dispnéia dentre outros sintomas que variam de intensidade conforme a gravidade do quadro⁽⁵³⁾.

É importante esclarecer as reais influências das células efetoras da resposta inflamatória e seus produtos, tanto no controle fisiológico quanto nas doenças ovarianas. A identificação de marcadores prognósticos entre as várias

substâncias presentes durante o processo inflamatório e o correto entendimento da ativação ou supressão de passos importantes da foliculogênese, competência oocitária e angiogênese propiciaria um tratamento mais adequado e um melhor seguimento das pacientes. É possível que a expressão de quimiocinas, especialmente o MCP-1, a avaliação da atividade de enzimas pró-inflamatórias como o NAG e o MPO e a resposta inflamatória inespecífica fornecida pelo PCR possam ser utilizados como fatores prognósticos em pacientes submetidas a hiperestimulação ovariana controlada e desenvolver pesquisas através da terapêutica com antagonistas da resposta inflamatória. Esse estudo visa avaliar a resposta inflamatória no líquido folicular e soro em pacientes inférteis com anovulação crônica comparando-as com mulheres com ciclos menstruais ovulatórios, submetidas à estimulação ovariana controlada com gonadotrofinas para ICSI.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a resposta inflamatória após a hiperestimulação ovariana controlada com gonadotrofinas para técnica de reprodução assistida (ICSI) em pacientes com infertilidade por anovulação crônica e mulheres apresentando ciclos menstruais regulares e ovulatórios associado a fator masculino.

2.2. Objetivos específicos

- Comparar as dosagens de NAG, MPO, MCP-1 e PCR no soro e líquido folicular em pacientes com infertilidade por anovulação crônica com pacientes apresentando ciclos menstruais regulares e ovulatórios associado a fator masculino submetidas a hiperestimulação ovariana controlada para técnica de reprodução assistida (ICSI).
- Verificar se as dosagens de NAG, MPO, MCP-1 e PCR influenciam no número e maturidade dos oócitos obtidos na punção folicular, nas taxas de gravidez e ocorrência de síndrome do hiperestímulo ovariano em pacientes com infertilidade submetidas à hiperestimulação ovariana controlada para técnica de reprodução assistida (ICSI).

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Casuística

O estudo foi realizado prospectivamente em 36 mulheres atendidas no ambulatório de infertilidade da Clínica Pró-Criar/MaterDei, no período de abril/2006 a maio/2006.

Foram incluídas na pesquisa somente aquelas que concordaram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, de acordo com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (Anexo II).

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) do Hospital MaterDei (parecer número 154 – Anexo I)

As pacientes foram divididas em dois grupos:

- Grupo 1: 13 pacientes com infertilidade e anovulação crônica que foram submetidas a hiperestimulação ovariana e injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) por fator masculino associado
- Grupo 2: 23 pacientes com infertilidade e ciclos menstruais regulares e ovulatórios que foram submetidas a hiperestimulação ovariana e ICSI devido à presença de uma causa masculina.

Como não existe na literatura o valor esperado das dosagens de PCR e atividade de NAG, MPO e MCP 1 no soro e/ou líquido folicular de pacientes jovens e inférteis o cálculo amostral demonstrou que essa casuística (n=13) e o

controle (n=23) foram capazes de demonstrar uma diferença na média de dosagem dessas proteínas/enzimas entre os grupos superiores a um desvio padrão com um nível de confiança de 95% e poder estatístico de 80%.

3.1.1. Critérios de inclusão

- Pacientes inférteis com anovulação crônica, afastado outras causas de anovulação pela dosagem de prolactina e 17-hidroxiprogesterona e mulheres com ciclos menstruais regulares, ovulatórios apresentando dosagem de progesterona acima de 5 ng/ml⁽⁵⁸⁾, idade inferior a 38 anos, índice de massa corporal < 30 Kg/m² e presença de um fator masculino associado, que serão submetidas à estimulação ovariana com gonadotrofinas para ICSI .

3.1.2. Critérios de exclusão

- Pacientes com infertilidade por outras causas como endometriose, infertilidade sem causa aparente (ISCA), fator tubário ou idade avançada, com sinais sugestivos de processos infecciosos e/ou inflamatórios agudos, diabetes e outras doenças associadas e história de uso de drogas antiinflamatórias, imunossupressores e/ou hipoglicemiantes orais nos últimos 30 dias.

As pacientes e seus parceiros foram submetidos à investigação básica para o casal infértil apresentando no mínimo três análises de espermograma, citologia cérvico-vaginal; dosagens hormonais basais no terceiro dia do ciclo menstrual

de FSH, LH, prolactina e TSH; sorologia para sífilis, hepatite B, C e HIV; histerossalpingografia; histeroscopia diagnóstica; espermograma e dosagem sérica de progesterona no 21º dia do ciclo menstrual.

Também na fase folicular precoce, isto é, no terceiro dia de qualquer ciclo menstrual prévio ao início do tratamento, espontâneo ou induzido com uso de progestagênio, todas as pacientes foram submetidas à contagem de folículos antrais bilaterais e à medida do volume de cada ovário. Foi realizado exame ultrassonográfico transvaginal (SonoAce 3200 – Medson), utilizando cortes longitudinal, transversal e oblíquo do órgão para avaliação da média entre duas medidas perpendiculares ao maior eixo dos folículos presentes, variando entre dois a nove mm. Para o cálculo do volume ovariano foi utilizada a fórmula simplificada para uma estrutura elipsóide em cm^3 ($0,5 \times \text{altura} \times \text{largura} \times \text{espessura}$).

As pacientes anovuladoras crônicas foram caracterizadas pela presença clínica de oligo-amenorréia e pelo critério ultrassonográfico transvaginal de ovários morfologicamente policísticos com mais de doze microcistos dispersos na periferia e volume acima de dez cm^3 , de acordo com o proposto pelo Consenso de Rotterdam 2003⁽⁴⁹⁾. A dosagem de prolactina e 17 alfa hidroxiprogesterona foram realizadas para afastar quadros de hiperprolactinemia e hiperplasia adrenal congênita de início tardio, respectivamente⁽⁴⁹⁾.

A avaliação do fator masculino foi verificada pela presença de alterações nos espermatozoides em três análises de espermogramas referentes à ausência, concentração, motilidade e morfologia pelo critério estrito de Kruger. Esses

parâmetros foram utilizados para a indicação da técnica de reprodução assistida através do ICSI em ambos os grupos estudados⁽⁵⁹⁾.

3.2. Métodos

3.2.1. Hiperestimulação ovariana controlada

Todas as pacientes foram submetidas ao protocolo para estimulação ovariana, onde inicialmente era administrado um agonista do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH-a), na dose de 3,75 mg em aplicação única para inibição da secreção de gonadotrofinas, iniciando no meio da fase lútea do ciclo precedente (21º dia) ou no 1º ou 2º dia do ciclo atual. A confirmação do bloqueio hipofisário foi realizada em todas as pacientes através de avaliação ultrassonográfica transvaginal (Sono Ace 3200 – Medson), constatando uma espessura endometrial abaixo de cinco mm e a ausência de cistos foliculares em ambos os ovários no período de 12 a 14 dias após o uso da medicação. Após a dessensibilização hipofisária, foi iniciada a hiperestimulação ovariana com gonadotrofinas da mulher menopausada (hMG), na dose de 150 a 300 UI/dia. O ajuste da primeira dose foi realizado de acordo com a resposta individual obtida e avaliada através da quantidade de folículos recrutados, seis a sete dias após o início da estimulação ovariana. O crescimento folicular foi monitorizado através de ultrassonografia transvaginal seriada, com intervalos de 48 horas. Quando no mínimo dois folículos alcançaram o diâmetro médio de 17 mm ou quatro folículos com um tamanho médio de 15 mm, a gonadotrofina coriônica humana (hCG) foi administrada via subcutânea na dose de 10.000 UI.

3.2.2. Coleta ovular

A punção folicular guiada por ultrassom transvaginal para coleta bilateral dos oócitos (Figura 3.1) foi realizada entre 35 a 36 horas após a aplicação do hCG, com agulha de 17 gauge CCD (COOK – Irlanda). O procedimento foi realizado em ambiente hospitalar, sob anestesia geral por sedação venosa com propofol. Seguindo a retirada dos oócitos, esses foram transportados imediatamente através de incubadora própria até o laboratório de reprodução assistida onde foram analisados e apenas os oócitos maduros, em metáfase II (MII), segundo os critérios de Veek⁽⁶⁰⁾ foram inseminados. Os óvulos fertilizados pela técnica de injeção intracitoplasmática (ICSI) foram incubados a 37° C em incubadora com 5,5% de CO₂ (Forma – Scientific). Em aproximadamente doze horas foram avaliados os oócitos fertilizados pela visualização dos pró-núcleos. A transferência embrionária foi realizada com o cateter de Sidney (Sidney IVS® ET SET – Cook – Irlanda) 48 a 72 horas após a retirada dos oócitos, guiada por ultrassom pélvico e estando a paciente com a bexiga repleta. No máximo quatro embriões foram transferidos por paciente. Todas as pacientes receberam suporte da fase lútea através de progesterona natural micronizada na dose diária de 600 mg/dia, via vaginal, iniciada 24 horas após a retirada dos oócitos e mantida até o resultado do teste de gravidez ou 12 semanas de gestação. A gravidez foi confirmada através do teste quantitativo sérico de β-hCG, com valores considerados positivos se superiores a 25 mUI/ml. Nos resultados positivos, o exame de ultrassonografia transvaginal foi realizado após 14 dias para avaliar o número de sacos gestacionais e sua presença intraútero.

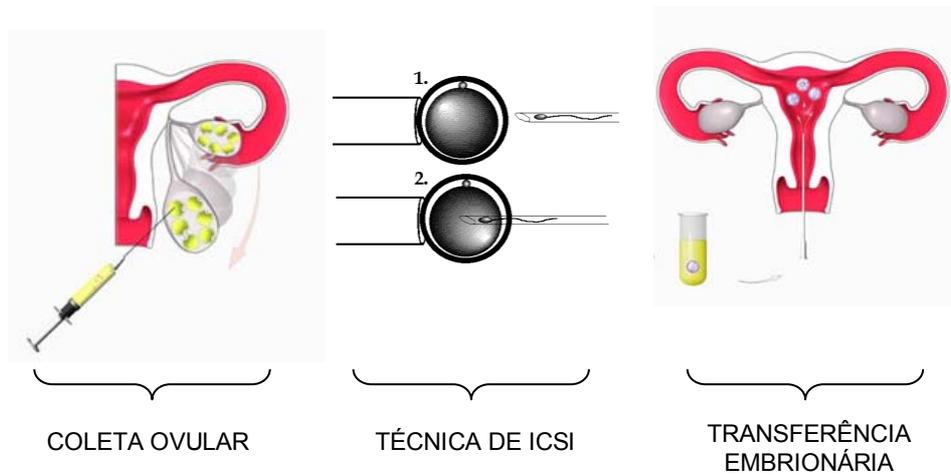


Figura 3-1

Descrição do procedimento de coleta ovular, injeção intracitoplasmática de oócitos (ICSI) e transferência embrionária. A punção folicular para coleta bilateral de oócitos é realizada guiada por ultrassonografia transvaginal. Para a técnica de ICSI é necessário micromanipulador com pipetas de apreensão do óvulo e injeção do espermatozóide. A transferência intra-uterina embrionária é realizada por cateter próprio de transferência, por exame especular.

3.2.3. Coleta das amostras

As amostras de sangue (12 ml) e do líquido de folículos maiores que 17 mm de diâmetro após a retirada do oócito (12ml) foram coletados em tubos de Falcon sem anticoagulante no momento da punção. A seguir eram transportadas e condicionadas em gelo até o laboratório, onde foram centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos e armazenadas em tubos *ependorffs* em freezer a -80°C para posteriores dosagens. Não foi utilizado meio de cultivo para lavagem dos folículos ovarianos aspirados cujas amostras foram enviadas para análise.

3.2.4. Dosagens laboratoriais

3.2.4.1. Atividade de N- Acetilglicosaminidase (NAG)

Para realização da dosagem da NAG, utilizou-se 100 μl das amostras de soro e líquido folicular que foram colocados em duplicata a uma placa de 96 poços. Nesses poços foram adicionados 100 μl do substrato (p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glicosaminida) (Sigma - Aldrich), diluído em tampão citrato/fosfato com pH = 4,5. A seguir foram incubadas a 37°C durante 10 minutos. Por último, foram adicionados 100 μl de tampão glicina 0,2M, pH = 10,6 (Figura 3.2). A absorbância foi medida por espectrofotometria em leitor de Elisa (Thermoplate 3200 TM) com comprimento de onda de 400 nm. Os resultados foram expressos em atividade de NAG (Absorbância em OD 400 nm/ml de cada amostra).

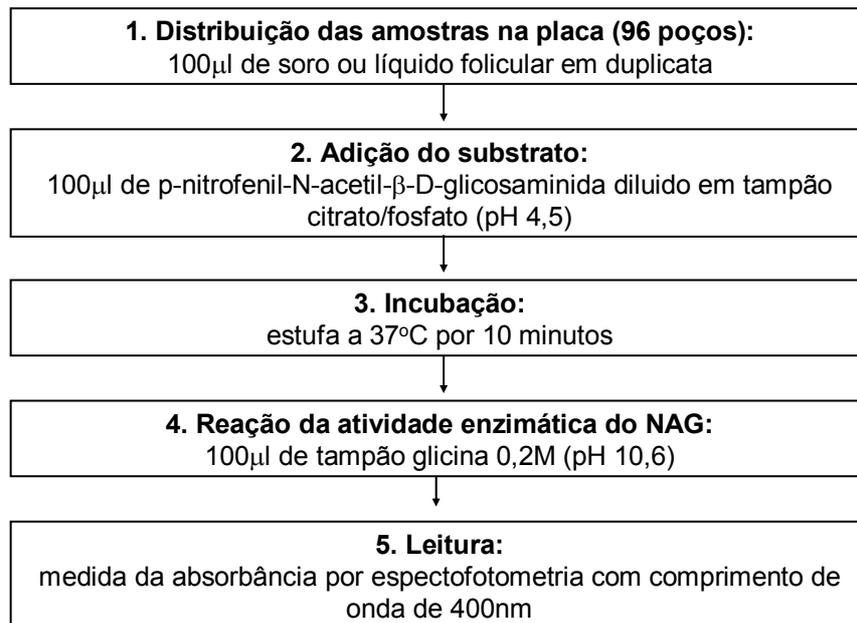


Figura 3-2

Fluxograma do protocolo básico de ELISA para detecção da atividade de N-Acetilglicosaminidase (NAG).

Nota: ELISA - *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*; NAG -N- Acetilglicosaminidase.

3.2.4.2. Atividade de Mieloperoxidase (MPO)

Para a dosagem da atividade do MPO foram utilizadas amostras de soro e líquido folicular diluídas em tampão fosfato com pH 5,4 nas concentrações de 1:3 e 1:1, respectivamente. Em seguida foi colocado 25µl das amostras em duplicata a uma placa de 96 poços. Às amostras, adicionaram-se 25µl do substrato TMB (3,3', 5,5' – tetrametilbenzidina – Sigma - Aldrich) diluído em DMSO (Dimetil sulfóxido – Merck) e procedeu-se à incubação da placa a 37° C por 5 minutos. Após esse período, foi acrescentado 100µl de peróxido de hidrogênio 0,003% a cada poço e a placa foi novamente incubada a 37° C por 5 minutos. A reação foi interrompida através da adição de 100µl de H₂SO₄, 4M (Figura 3.3). A absorbância foi medida por espectrofotometria em comprimento de onda de 450 nm pelo aparelho Thermoplate 3200™. Os resultados foram expressos em atividade de MPO (Absorbância em OD 450 nm /ml das amostras).

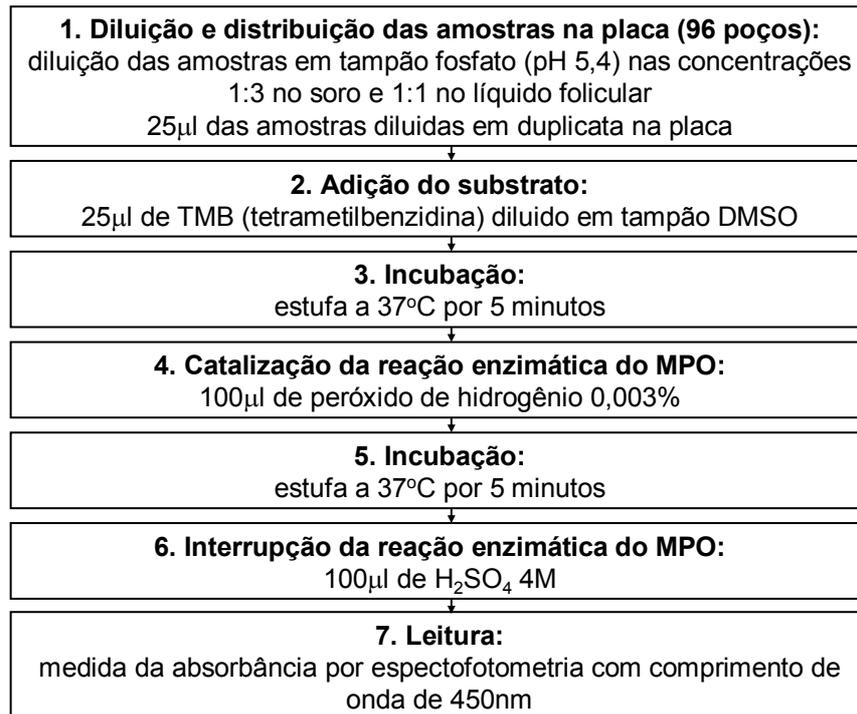


Figura 3-3

Fluxograma do protocolo básico de ELISA para detecção da atividade de Mieloperoxidase (MPO).

Nota: ELISA - *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*; DMSO - Dimetilsulfóxido; H₂SO₄ - Ácido sulfúrico; MPO - Mieloperoxidase.

3.2.4.3. Dosagem da proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1)

A quimiocina MCP-1 foi avaliada pela técnica de ELISA utilizando o KIT Citocina Humana LINCOpex – 1 Plex MCP-1 Humano- HCYTO-60K (Texas – EUA) e a leitura foi realizada pelo equipamento Luminex 200TM (Software versão 2.3 – Texas – EUA).

O ensaio enzimático foi realizado seguindo-se os passos do protocolo padronizado pelo fornecedor do Kit. A placa de 96 poços “virgem” foi fixada com anticorpo policlonal. Lavou-se cada poço da placa com 200 µl de solução tampão-ensaio, agitando-se a placa por 10 minutos à temperatura ambiente. Removeu-se toda essa solução e acrescentou-se 25 µl de solução tampão-ensaio aos poços classificados como “brancos”, como curva padrão e aos locais destinados às amostras. Uma fração de 25 µl de cada amostra foi adicionada aos poços apropriados, permitindo que os anticorpos específicos fossem ligados aos antígenos. Acrescentou-se às amostras meio próprio para lavagem dos anticorpos e a placa foi incubada por uma hora à temperatura ambiente. Lavou-se a placa duas vezes com 200 µl de solução de lavagem, com a finalidade de retirar os anticorpos não ligados. Adicionou-se aos poços 25 µl de solução para detecção do anticorpo e 25 µl de estreptavidina e a placa foi novamente incubada por trinta minutos à temperatura ambiente. Lavou-se a placa duas vezes com 200 µl de solução de lavagem para retirar os conjugados não ligados. Foi então adicionado 100 µl do substrato cromogênico para detectar a presença da ligação antígeno anticorpo (figuras 3.4 e 3.5). A placa foi encaminhada ao aparelho de leitura de ELISA.

Sensibilidade do KIT: 1,29 pg/ml.

Erro intra-ensaio: 11,1 %CV.

Erro inter-ensaio: 6,5 %CV

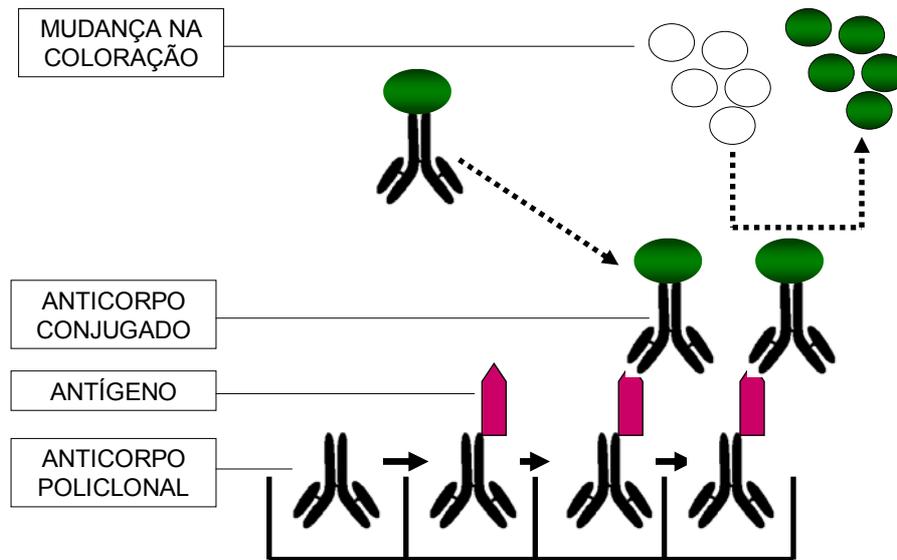


Figura 3-4

Representação esquemática da técnica de ELISA utilizada para avaliação da proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1).

Nota: ELISA - *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, MCP-1 - Proteína quimiotática de monócitos-1.

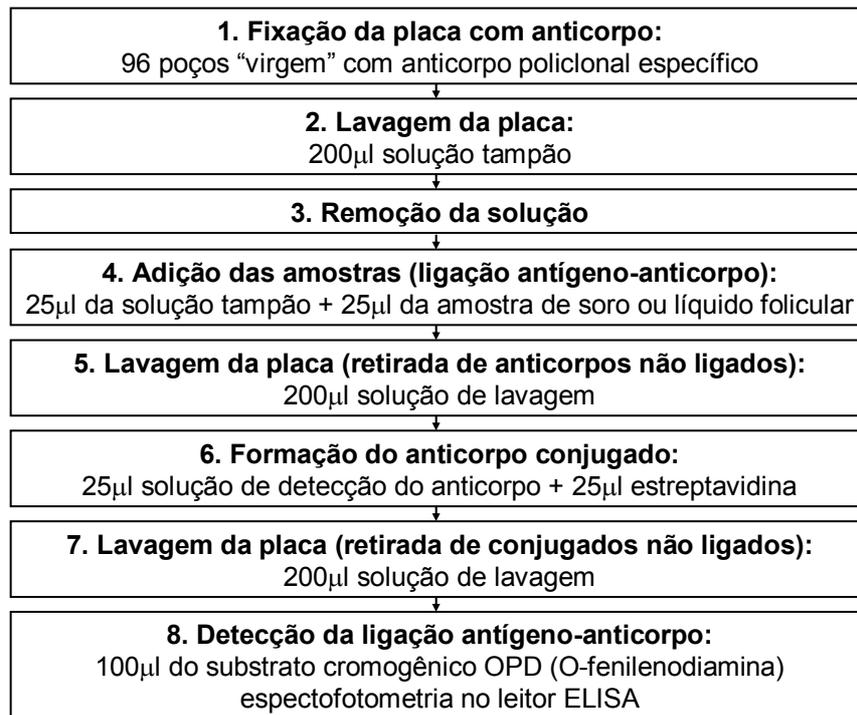


Figura 3-5

Fluxograma do protocolo básico de ELISA para detecção da proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1).

Nota: ELISA - *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, MCP-1 - Proteína quimiotática de monócitos-1.

Foram utilizados: 1- Anticorpo biotilado de detecção da quimiocina humana

2 – Solução tampão-ensaio: PBS + EDTA + ázido de sódio + BSA

3 – Solução de lavagem: 1:10 água deionizada + PBS (0,05%)

3.2.4.4. Dosagem da Proteína C reativa (PCR)

A medida quantitativa de PCR de alta sensibilidade foi realizada pelo método nefelométrico (Dade Behring Inc., Newark, DE, EUA). Por esse método, a aglutinação das partículas recobertas por anticorpos anti-PCR foi mensurada pela intensidade da luz refletida, proporcional à concentração de PCR nas amostras. Partículas de poliestireno, recobertas com um anticorpo monoclonal anti-PCR sofreram aglutinação quando misturados às amostras que contém PCR (limite de detecção 0,0175 mg/dl). Para a reprodutibilidade do PCR em baixas concentrações, foram utilizados volumes de 0,5 ml de soro e líquido folicular os quais foram diluídos na proporção de 1/10ml com albumina bovina 60g/l. A concentração de PCR (expressa em mg/l) foi calculada a partir de uma curva elaborada com um soro padrão fornecido pelo kit (com concentração conhecida) e testado em diferentes diluições. O valor de referência do método foi $\leq 3,5$ mg/l.

3.3. Análise estatística

As informações foram codificadas e digitadas em banco de dados no programa SPSS para Windows versão 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA), que desenvolveu os cálculos posteriores. Todos os dados analisados foram submetidos ao exame de normalidade utilizando-se o teste Kolmogorov-Smirnov. As variáveis foram descritas por meio de suas médias, valores mínimos, máximos e erro padrão da média. As diferenças entre as médias foram feitas pelo teste *t* de Student. As demais comparações foram feitas pelo teste do qui-quadrado (comparação entre grupos independentes). As

diferenças ou correlações com valor de $p < 0,05$ foram consideradas significativas.

4. RESULTADOS

4.1. Características gerais da amostra

O estudo incluiu pacientes com idades variando entre 20 e 37 anos (média±erro padrão da média = 28,9±0,6 anos). O índice de massa corpórea (IMC) médio foi de 21,7±0,4 Kg/cm² (17,6 a 28,0 Kg/cm²). A infertilidade primária foi evidenciada em 31 pacientes (86,1%) e secundária em 5 pacientes (13,9%).

Todas as pacientes estudadas apresentavam fator masculino associado como mostra a Tabela 4-1.

Como ilustra a tabela 4-2, não houve diferença significativa pré-estimulação ovariana controlada para técnica de reprodução assistida (ICSI) de pacientes com anovulação crônica (casos) e pacientes com ciclos menstruais regulares e ovulatórios (controle) em relação à idade (p=0,859), tipo de infertilidade (p=0,539), tempo de infertilidade (p=0,742), IMC (p=0,648) e FSH basal (p=0,541). As pacientes com infertilidade por anovulação crônica apresentaram uma maior dosagem sérica de LH basal (8,4±0,7 *versus* 5,7±0,8 UI/ml; p=0,017), contagem de folículos antrais no 3º dia do ciclo menstrual (29,1±1,6 *versus* 19,1±0,9; p<0,001), volume ovariano direito (12,3±0,5 *versus* 5,5±0,3 cm³; p<0,001) e esquerdo (11,5±0,5 *versus* 5,8±0,4 cm³; p<0,001) em comparação àquelas do grupo controle.

Tabela 4-1: Etiologia do fator masculino de infertilidade em pacientes com anovulação crônica (casos) e pacientes com ciclos menstruais regulares e ovulatórios (controle) submetidas a hiperestimulação ovariana controlada para técnica de reprodução assistida (ICSI).

Fator masculino	Anovulação crônica (casos) n (%)	Ciclos menstruais ovulatórios (controle) n (%)
Oligoastenoteratozoospermia	4 (38,8%)	6 (26,1%)
Azoospermia	0	7 (30,4%)
Astenozoospermia	5 (38,5%)	0
Astenoteratozoospermia	1 (7,7%)	5 (21,7%)
Teratozoospermia	1 (7,7%)	3 (13%)
Oligozoospermia	1 (7,7%)	1 (4,3%)
Oligoastenozoospermia	1 (7,7%)	1 (4,3%)

Nota: ICSI - Injeção intracitoplasmática de espermatozóide. O diagnóstico foi baseado em pelo menos 3 espermogramas e a morfologia analisada pelo critério estrito de Kruger⁽⁵⁹⁾.

Tabela 4-2: Comparação das características clínico-laboratoriais pré-estimulação ovariana controlada para técnica de reprodução assistida (ICSI) de pacientes com infertilidade por anovulação crônica (casos) com pacientes apresentando ciclos menstruais regulares e ovulatórios associado a fator masculino (controle).

Características clínico-laboratoriais	Anovulação crônica (casos) n=13	Ciclos menstruais ovulatórios (controle) n=23	p
Idade (anos)	28,8±0,9	29±0,8	0,859
Tipo de infertilidade			
Primária	11 (84,6%)	22 (95,7%)	0,539
Secundária	2 (15,4%)	1 (4,3%)	
Tempo de infertilidade (anos)	4,3±0,9	3,9±0,6	0,742
IMC (Kg/cm ²)	21,9±0,4	21,6±0,6	0,648
FSH 3º dia do ciclo (mUI/ml)	5,6±0,3	5,8±0,2	0,541
LH 3º dia do ciclo (mUI/ml)	8,4±0,7	5,7±0,8	0,017
Contagem de folículos antrais no 3º dia do ciclo	29,1±1,6	19,1±0,9	<0,001
Volume ovariano (cm ³)			
Direito	12,3±0,5	5,5±0,3	<0,001
Esquerdo	11,5±0,5	5,8±0,4	<0,001

Nota: ICSI - Injeção intracitoplasmática de espermatozóide; IMC - Índice de massa corpórea; FSH – Hormônio folículo estimulante; LH – Hormônio luteinizante. Os valores representam a média±erro padrão da média ou número de casos (%). Utilizou-se o teste *t* de Student e do qui-quadrado para avaliação das diferenças entre os grupos.

Não houve diferença significativa após a estimulação ovariana controlada para técnica de reprodução assistida (ICSI) entre os casos e controles em relação ao número de ampolas de hMG ($p=0,494$), oócitos obtidos ($p=0,662$), oócitos maduros (MII) ($p=0,223$), taxa de fertilização ($p=0,907$) ou número de embriões transferidos ($p=0,120$) (Tabela 4-3).

Como ilustra a figura 4-1, não houve diferenças na taxa de síndrome do hiperestímulo ovariano (15,4 *versus* 13%; $p=1,00$) e gravidez (38,5 *versus* 45,5%; $p=0,737$) entre pacientes com anovulação crônica (casos) e pacientes com ciclos menstruais regulares e ovulatórios (controle) após hiperestimulação ovariana controlada para técnica de reprodução assistida.

Tabela 4-3: Comparação das características laboratoriais de pacientes com infertilidade por anovulação crônica (casos) com pacientes apresentando ciclos menstruais regulares e ovulatórios associado a fator masculino (controle) após hiperestimulação ovariana controlada para técnica de reprodução assistida (ICSI).

Características clínico-laboratoriais	Anovulação crônica (casos) n=13	Ciclos menstruais ovulatórios (controle) n=23	p
Número de ampolas de hMG	25,5±2,4	27,3±1,4	0,494
Número oócitos obtidos	24,9±3,3	23,2±2,2	0,662
Número de oócitos maduros (MII)	21,1±3,1	17,5±1,4	0,223
Taxa de fertilização (%)	74,1±4,9	73,3±4,1	0,907
Número de embriões transferidos	3,1±0,1	3,3±0,1	0,120

Nota: ICSI - Injeção intracitoplasmática de espermatozóide; hMG – Gonadotrofina humana menopausada; MII – Metáfase II⁽⁶⁰⁾. Os valores representam a média±erro padrão da média ou porcentagem dos casos. Considerou-se taxa de fertilização a relação entre o número de oócitos fertilizados com a presença de 2 pró-núcleos / o número de oócitos maduros injetados. Utilizou-se o teste *t* de Student para avaliação das diferenças entre os grupos.

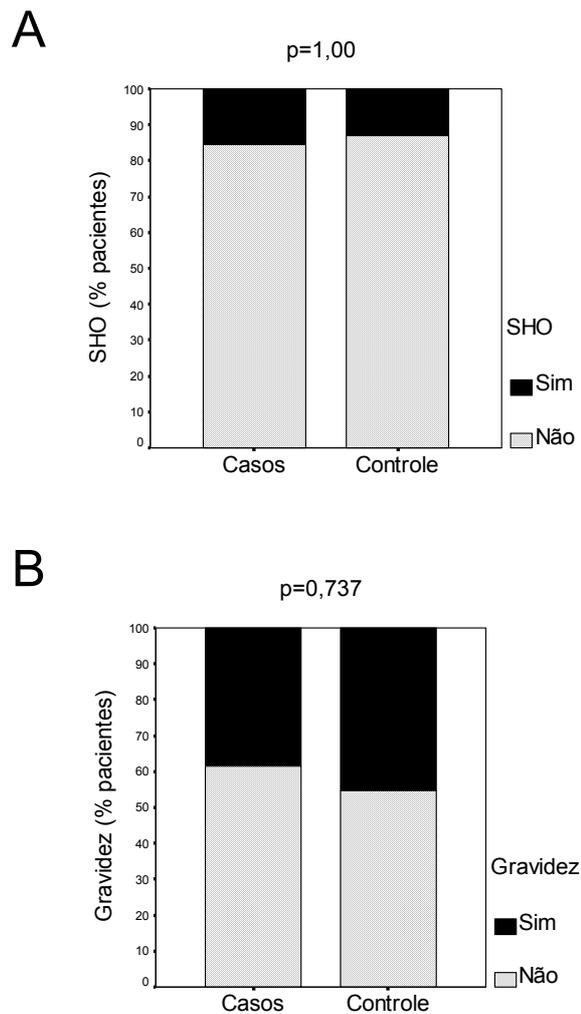


Figura 4-1

Comparação da taxa de síndrome do hiperestímulo ovariano (A) e gravidez (B) em pacientes com infertilidade por anovulação crônica (casos) com pacientes apresentando ciclos menstruais regulares e ovulatórios associado a fator masculino (controle) submetidas a hiperestimulação ovariana controlada para técnica de reprodução assistida (ICSI).

Nota: SHO - Síndrome do hiperestímulo ovariano; ICSI - Injeção intracitoplasmática de espermatozóide. Utilizou-se o teste do qui-quadrado para avaliação das diferenças entre os grupos.

4.2. Atividade de N- Acetilglicosaminidase (NAG)

A atividade de NAG nas pacientes do grupo controle foi superior no soro em comparação à atividade no líquido folicular ($191,6 \pm 8,0$ versus $309,8 \pm 17,0$ nmol/l; $p < 0,001$) (Figura 4-2). As pacientes com infertilidade por anovulação crônica (casos) apresentaram uma maior atividade de NAG no líquido folicular em comparação ao grupo controle ($216,3 \pm 15,8$ versus $187,9 \pm 7,7$ nmol/l; $p = 0,025$) (Figura 4-3A). Não houve diferença na atividade sérica do NAG entre os grupos ($344,2 \pm 38,3$ versus $309,8 \pm 17$ nmol/l; $p = 0,346$) (Figura 4-3B).

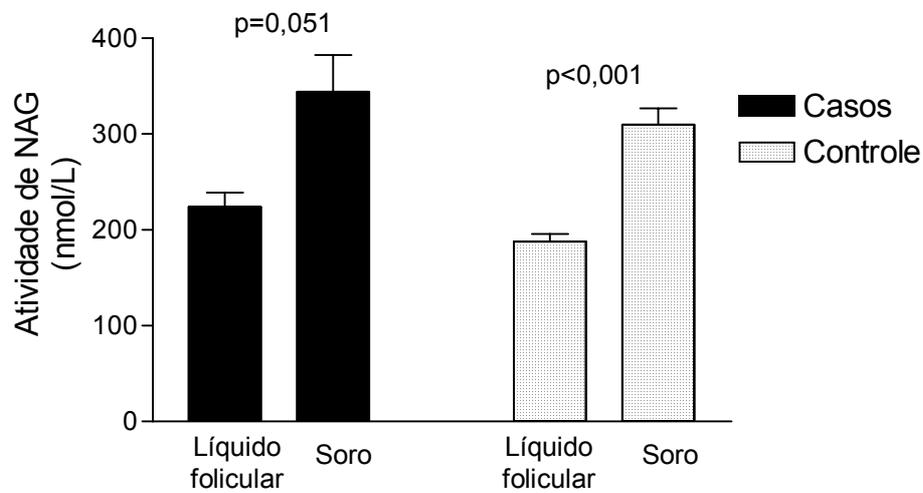


Figura 4-2

Comparação da atividade de NAG no líquido folicular com a atividade sérica em pacientes com infertilidade por anovulação crônica (casos) com pacientes apresentando ciclos menstruais regulares e ovulatórios associado a fator masculino (controle) submetidas a hiperestimulação ovariana controlada para técnica de reprodução assistida (ICSI).

Nota: NAG - N- Acetilglicosaminidase; Injeção intracitoplasmática de espermatozóide. A dosagem de NAG foi realizada pelo método de ELISA. As diferenças entre as médias foram feitas pelo teste *t* de Student. As colunas representam as médias e as barras os erros padrão da média.

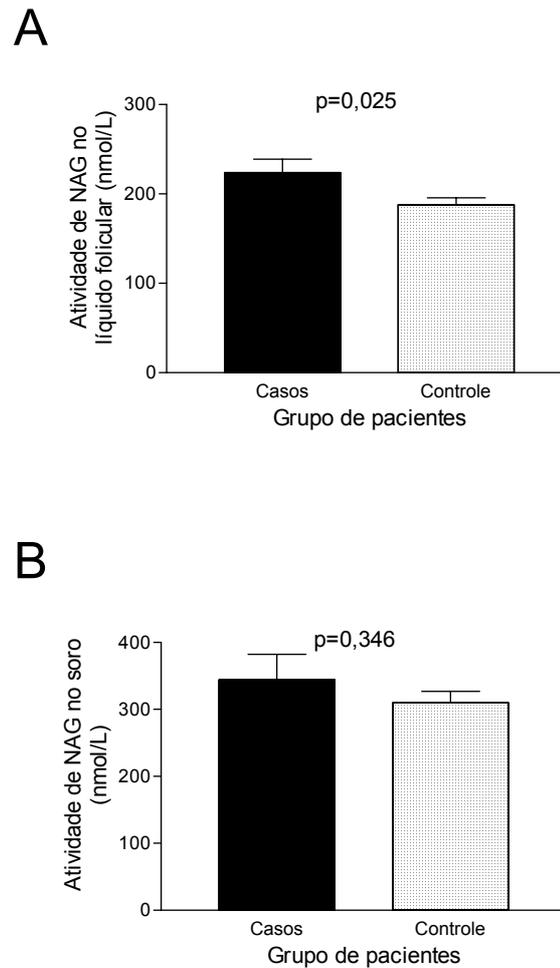


Figura 4-3

Comparação da atividade de NAG no líquido folicular (A) e soro (B) em pacientes com infertilidade por anovulação crônica (casos) com pacientes apresentando ciclos menstruais regulares e ovulatórios associado a fator masculino (controle) submetidas a hiperestimulação ovariana controlada para técnica de reprodução assistida (ICSI).

Nota: NAG - N- Acetilglicosaminidase; ICSI - Injeção intracitoplasmática de espermatozóide. A dosagem de NAG foi realizada pelo método de ELISA. As diferenças entre as médias foram feitas pelo teste *t* de Student. As colunas representam as médias e as barras os erros padrão da média.

4.3. Atividade de Mieloperoxidase (MPO)

A atividade de MPO nas pacientes com infertilidade por anovulação crônica (casos) foi superior no líquido folicular em comparação à atividade sérica ($3,1 \pm 0,2$ versus $2,6 \pm 2,2$ absorvância; $p=0,035$). Nas pacientes do grupo controle a atividade de MPO no soro foi superior à do líquido folicular ($2,5 \pm 0,1$ versus $3,4 \pm 0,1$ absorvância; $p < 0,001$) (Figura 4-4). A atividade de MPO no líquido folicular foi superior nos casos em comparação aos controles ($3,0 \pm 0,2$ versus $2,5 \pm 0,1$ absorvância; $p=0,030$) (Figura 4-5A). As dosagens séricas mostraram uma menor atividade nos casos em comparação aos controles ($2,6 \pm 0,2$ versus $3,4 \pm 0,1$ absorvância; $p=0,001$) (Figura 4-5B).

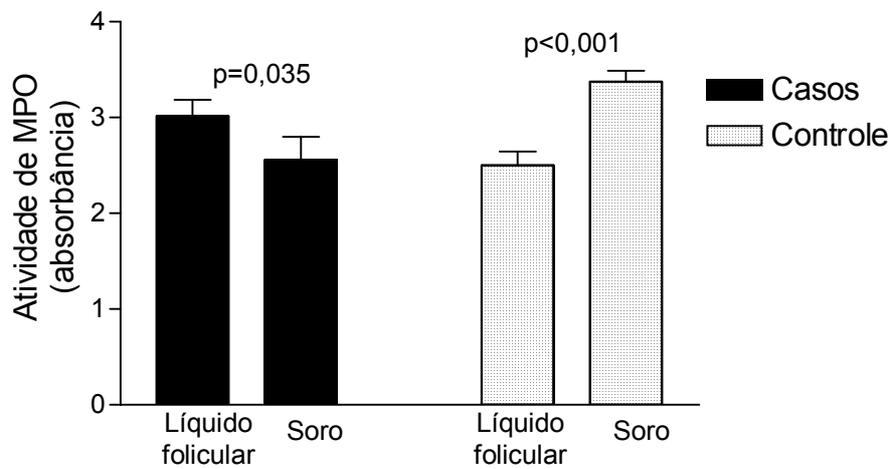


Figura 4-4

Comparação da atividade de MPO no líquido folicular com a atividade sérica em pacientes com infertilidade por anovulação crônica (casos) com pacientes apresentando ciclos menstruais regulares e ovulatórios associado a fator masculino (controle) submetidas a hiperestimulação ovariana controlada para técnica de reprodução assistida (ICSI).

Nota: MPO – Mieloperoxidase; ICSI - Injeção intracitoplasmática de espermatozóide. A dosagem de MPO foi realizada pelo método de ELISA. As diferenças entre as médias foram feitas pelo teste *t* de Student. As colunas representam as médias e as barras os erros padrão da média.

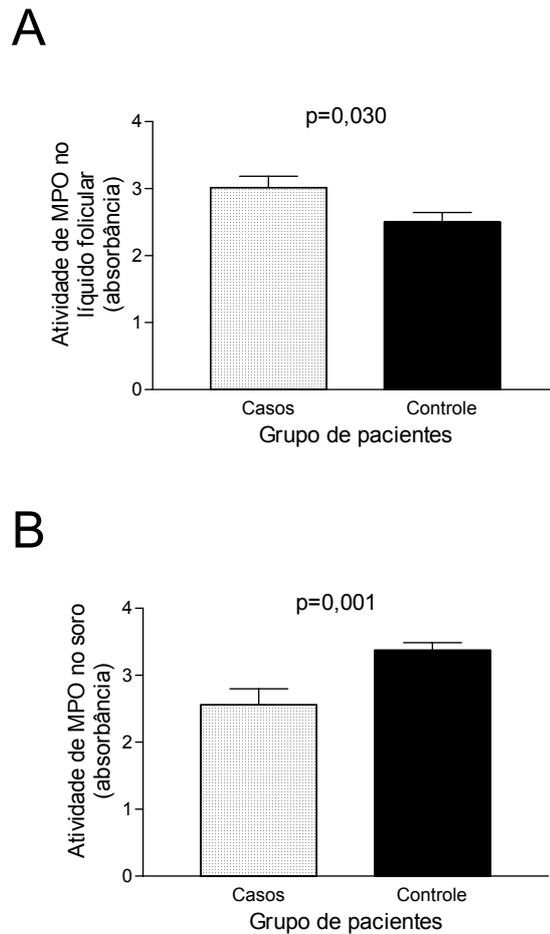


Figura 4-5

Comparação da atividade de MPO no líquido folicular (A) e soro (B) em pacientes com infertilidade por anovulação crônica (casos) com pacientes apresentando ciclos menstruais regulares e ovulatórios associado a fator masculino (controle) submetidas a hiperestimulação ovariana controlada para técnica de reprodução assistida (ICSI).

Nota: MPO – Mieloperoxidase; ICSI - Injeção intracitoplasmática de espermatozóide. A dosagem de MPO foi realizada pelo método de ELISA. As diferenças entre as médias foram feitas pelo teste *t* de Student. As colunas representam as médias e as barras os erros padrão da média.

4.4. Dosagem da Proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1)

A dosagem de MCP-1 foi superior no líquido folicular em comparação ao soro nos casos ($200,6 \pm 32,3$ versus $64,9 \pm 18,8$ pg/ml; $p=0,008$) e controles ($234,8 \pm 24,3$ versus $62,2 \pm 11,4$ pg/ml; $p < 0,001$) (Figura 4-6). Não houve diferença na dosagem de MCP-1 em pacientes com infertilidade por anovulação crônica (casos) em comparação aos controles no líquido folicular ($193,8 \pm 27,8$ versus $234,7 \pm 24,3$ pg/ml; $p=0,285$) ou soro ($64,9 \pm 318,8$ versus $61 \pm 10,9$ pg/ml; $p=0,852$) (Figura 4-7).

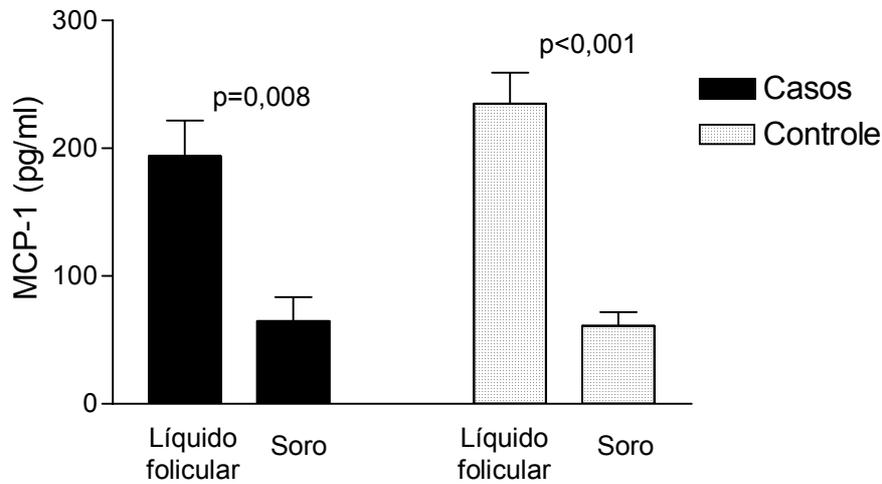


Figura 4-6

Comparação da dosagem de MCP-1 no líquido folicular com a dosagem sérica em pacientes com infertilidade por anovulação crônica (casos) com pacientes apresentando ciclos menstruais regulares e ovulatórios associado a fator masculino (controle) submetidas a hiperestimulação ovariana controlada para técnica de reprodução assistida (ICSI).

Nota: MCP-1 – Proteína quimiotática de monócitos-1; ICSI - Injeção intracitoplasmática de espermatozóide. A dosagem de MCP-1 foi avaliada pelo método de ELISA. As diferenças entre as médias foram feitas pelo teste *t* de Student. As colunas representam as médias e as barras os erros padrão da média.

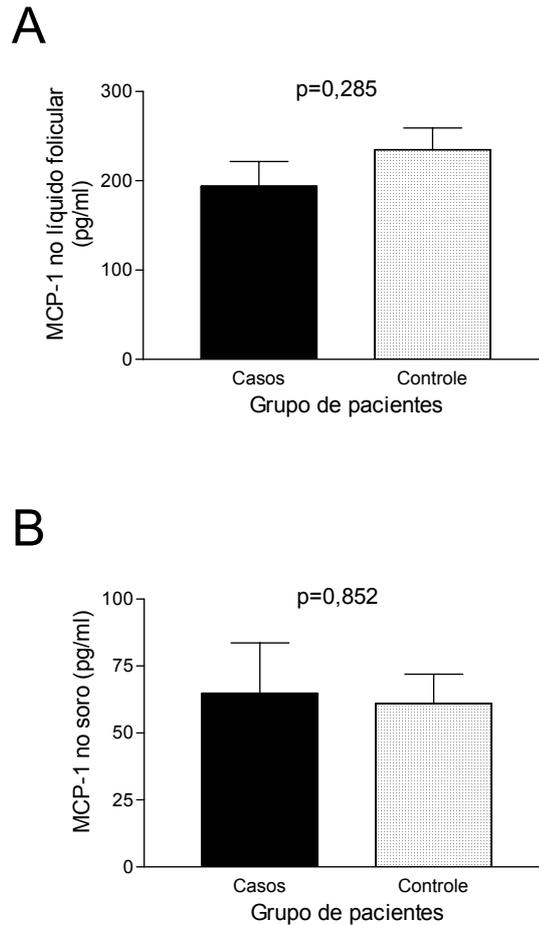


Figura 4-7

Comparação da dosagem de MCP-1 no líquido folicular (A) e soro (B) em pacientes com infertilidade por anovulação crônica (casos) com pacientes apresentando ciclos menstruais regulares e ovulatórios associado a fator masculino (controle) submetidas a hiperestimulação ovariana controlada para técnica de reprodução assistida (ICSI).

Nota: MCP-1 – Proteína quimiotática de monócitos-1; ICSI - Injeção intracitoplasmática de espermatozóide. A dosagem de MCP-1 foi avaliada pelo método de ELISA. As diferenças entre as médias foram feitas pelo teste *t* de Student. As colunas representam as médias e as barras os erros padrão da média.

4.5. Dosagem de Proteína C reativa (PCR)

A dosagem de PCR foi superior no soro em comparação ao líquido folicular nos casos ($2,1 \pm 0,5$ versus $3,0 \pm 0,7$ mg/L; $p=0,015$) e controles ($0,9 \pm 0,2$ versus $1,5 \pm 0,3$ mg/L; $p=0,002$) (Figura 4-8). As pacientes com infertilidade por anovulação crônica (casos) apresentaram uma maior dosagem de PCR no líquido folicular ($2,1 \pm 0,4$ versus $0,9 \pm 0,1$ mg/L; $p=0,025$) e soro ($3,0 \pm 0,7$ versus $1,5 \pm 0,3$ mg/L; $p=0,024$) em comparação ao grupo controle (Figura 4-9).

A tabela 4-4 mostra uma representação esquemática dos resultados obtidos nas dosagens de NAG, MPO, MCP-1 e PCR no líquido folicular e soro em pacientes com infertilidade por anovulação crônica (casos) com pacientes apresentando ciclos menstruais regulares e ovulatórios associado a fator masculino (controle) submetidas a hiperestimulação ovariana controlada para técnica de reprodução assistida (ICSI).

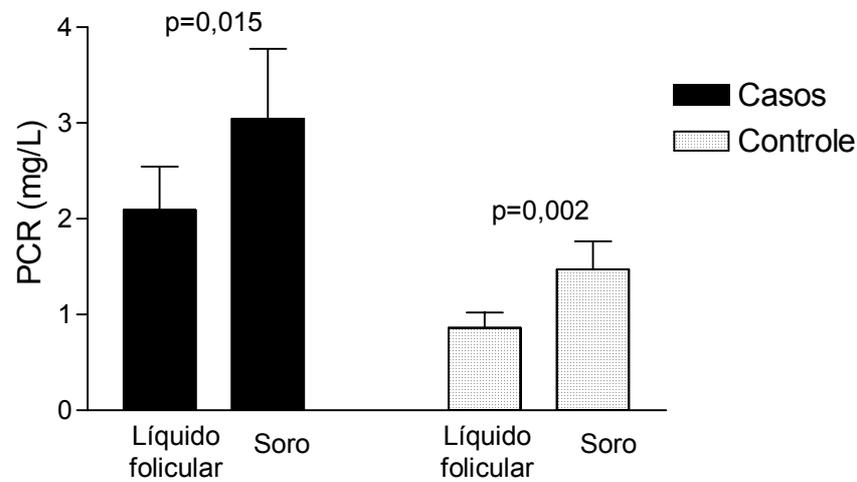


Figura 4-8

Comparação da dosagem de PCR no líquido folicular com a dosagem sérica em pacientes com infertilidade por anovulação crônica (casos) com pacientes apresentando ciclos menstruais regulares e ovulatórios associado a fator masculino (controle) submetidas a hiperestimulação ovariana controlada para técnica de reprodução assistida (ICSI).

Nota: PCR – Proteína C reativa; ICSI - Injeção intracitoplasmática de espermatozóide. A dosagem de PCR foi realizada pelo método nefelométrico. As diferenças entre as médias foram feitas pelo teste *t* de Student. As colunas representam as médias e as barras os erros padrão da média.

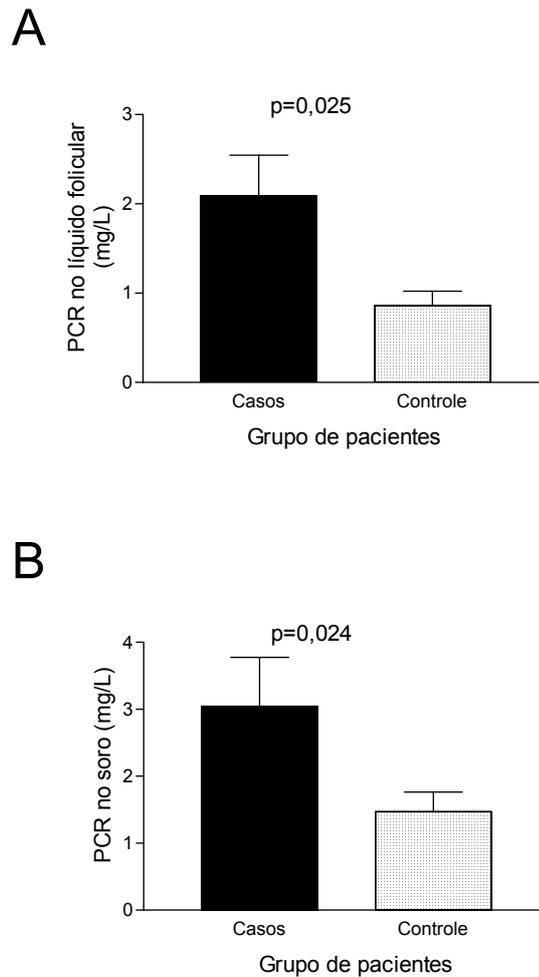


Figura 4-9

Comparação da dosagem de PCR no líquido folicular (A) e soro (B) em pacientes com infertilidade por anovulação crônica (casos) com pacientes apresentando ciclos menstruais regulares e ovulatórios associado a fator masculino (controle) submetidas a hiperestimulação ovariana controlada para técnica de reprodução assistida (ICSI).

Nota: PCR – Proteína C reativa; ICSI - Injeção intracitoplasmática de espermatozóide. A dosagem de PCR foi realizada pelo método nefelométrico. As diferenças entre as médias foram feitas pelo teste *t* de Student. As colunas representam as médias e as barras os erros padrão da média.

Tabela 4-4: Representação esquemática dos resultados obtidos nas dosagens de NAG, MPO, MCP-1 e PCR no líquido folicular e soro em pacientes com infertilidade por anovulação crônica (casos) com pacientes apresentando ciclos menstruais regulares e ovulatórios associado a fator masculino (controle) submetidas a hiperestimulação ovariana controlada para técnica de reprodução assistida (ICSI).

	Anovulação crônica (casos)		Ciclos menstruais ovulatórios (controle)	
	Líquido folicular	Soro	Líquido folicular	Soro
NAG	↑	↑↑	→	↑↑
MPO	↑↑	→	→	↑↑
MCP-1	↑↑	→	↑↑	→
PCR	↑	↑↑	→	↑

Nota: NAG - N- Acetilglicosaminidase; MPO - Mieloperoxidase; MCP-1 - Proteína quimiotática de monócitos-1; PCR - Proteína C reativa; ICSI - Injeção intracitoplasmática de espermatozóide. As dosagens de NAG, MPO e MCP-1 foram realizadas pelo método de ELISA e a dosagem de PCR foi realizada pelo método nefelométrico.

4.6. Associação das dosagens de NAG, MPO, MCP-1 e PCR com desfechos reprodutivos

Nas tabelas 4.5 e 4.6 houve associação significativa na dosagem de MPO no soro, respectivamente com um maior número de oócitos totais e maduros obtidos durante a punção folicular.

Como mostra a tabela 4-7 houve uma associação significativa da dosagem do MCP-1 no líquido folicular ($p=0,038$) e dosagem sérica do PCR ($p=0,016$) com a ocorrência da SHO em pacientes submetidas a hiperestimulação ovariana controlada para técnica de reprodução assistida (ICSI). Não houve associação das dosagens de NAG, MPO, MCP-1 e PCR no líquido folicular e soro com a taxa de gravidez (Tabela 4-6).

Tabela 4-5: Associação entre as dosagens de NAG, MPO, MCP-1 e PCR no líquido folicular e soro com o número de oócitos obtidos na punção folicular em pacientes com infertilidade por anovulação crônica (casos) com pacientes apresentando ciclos menstruais regulares e ovulatórios associado a fator masculino (controle) submetidas a hiperestimulação ovariana controlada para técnica de reprodução assistida (ICSI).

	Oócitos obtidos ≥ 24		p
	Não (n=19)	Sim (n=17)	
NAG (nmol/l)			
Líquido folicular	200,8 \pm 10,3	199,6 \pm 11,9	0,944
Soro	313,8 \pm 22,2	332,0 \pm 26,7	0,904
MPO (absorbância)			
Líquido folicular	2,7 \pm 0,1	2,7 \pm 0,2	0,753
Soro	3,1 \pm 0,2	3,2 \pm 0,2	0,005
MCP-1 (pg/ml)			
Líquido folicular	220,1 \pm 20,0	222,4 \pm 37,2	0,961
Soro	63,4 \pm 12,8	62,8 \pm 15,2	0,737
PCR (mg/L)			
Líquido folicular	1,1 \pm 0,2	1,5 \pm 0,4	0,610
Soro	1,9 \pm 0,4	1,93 \pm 0,6	0,919

Nota: NAG - N- Acetilglicosaminidase; MPO - Mieloperoxidase; MCP-1 - Proteína quimiotática de monócitos-1; PCR - Proteína C reativa; ICSI - Injeção intracitoplasmática de espermatozóide. Considerou-se como ponte de corte para dicotomização entre os grupos a média do número de oócitos obtidos. As dosagens de NAG, MPO e MCP-1 foram realizadas pelo método de ELISA e a dosagem de PCR foi realizada pelo método nefelométrico. As diferenças entre as médias foram feitas pelo teste *t* de Student.

Tabela 4-6: Associação entre as dosagens de NAG, MPO, MCP-1 e PCR no líquido folicular e soro com o número de oócitos maduros (MII)⁽⁶⁰⁾ obtidos na punção folicular em pacientes com infertilidade por anovulação crônica (casos) com pacientes apresentando ciclos menstruais regulares e ovulatórios associado a fator masculino (controle) submetidas a hiperestimulação ovariana controlada para técnica de reprodução assistida (ICSI).

	Oócitos maduros (MII) ⁽⁶⁰⁾ ≥ 19		p
	Não (n=19)	Sim (n=17)	
NAG (nmol/l)			
Líquido folicular	200,8±10,3	199,6±11,9	0,765
Soro	313,8±22,2	332,0±26,7	0,379
MPO (absorbância)			
Líquido folicular	2,7±0,1	2,7±0,2	0,529
Soro	3,1±0,2	3,2±0,2	0,016
MCP-1 (pg/ml)			
Líquido folicular	220,1±20,0	222,4±37,2	0,401
Soro	63,4±12,8	62,8±15,2	0,391
PCR (mg/L)			
Líquido folicular	1,1±0,2	1,5±0,4	0,368
Soro	1,9±0,4	1,9±0,6	0,857

Nota: MII - Metáfase II; NAG - N- Acetilglicosaminidase; MPO - Mieloperoxidase; MCP-1 - Proteína quimiotática de monócitos-1; PCR - Proteína C reativa; ICSI - Injeção intracitoplasmática de espermatozóide. Considerou-se como ponte de corte para dicotomização entre os grupos a média do número de oócitos maduros (MII)⁽⁶⁰⁾. As dosagens de NAG, MPO e MCP-1 foram realizadas pelo método de ELISA e a dosagem de PCR foi realizada pelo método nefelométrico. As diferenças entre as médias foram feitas pelo teste *t* de Student.

Tabela 4-7: Associação entre as dosagens de NAG, MPO, MCP-1 e PCR no líquido folicular e soro com a ocorrência da Síndrome do hiperestímulo ovariano em pacientes com infertilidade por anovulação crônica (casos) com pacientes apresentando ciclos menstruais regulares e ovulatórios associado a fator masculino (controle) submetidas a hiperestimulação ovariana controlada para técnica de reprodução assistida (ICSI).

	SHO		p
	Não (n=31)	Sim (n=5)	
NAG (nmol/l)			
Líquido folicular	196,6±8,2	221,7±21,0	0,261
Soro	329,7±18,4	272,5±29,3	0,199
MPO (absorbância)			
Líquido folicular	2,7±0,12	2,7±0,4	0,888
Soro	3,2±0,13	2,6±0,3	0,05
MCP-1 (pg/ml)			
Líquido folicular	202,6±16,6	308,3±71,6	0,038
Soro	63,8±11,1	54,5±8,8	0,725
PCR (mg/L)			
Líquido folicular	1,1±0,2	2,16±0,7	0,091
Soro	1,6±0,3	3,64±1,1	0,016

Nota: NAG - N- Acetilglicosaminidase; MPO - Mieloperoxidase; MCP-1 - Proteína quimiotática de monócitos-1; PCR - Proteína C reativa; ICSI - Injeção intracitoplasmática de espermatozóide; SHO – Síndrome do hiperestímulo ovariano. As dosagens de NAG, MPO e MCP-1 foram realizadas pelo método de ELISA e a dosagem de PCR foi realizada pelo método nefelométrico. As diferenças entre as médias foram feitas pelo teste *t* de Student.

Tabela 4-8: Associação entre as dosagens de NAG, MPO, MCP-1 e PCR no líquido folicular e soro com a ocorrência de gravidez em pacientes com infertilidade por anovulação crônica (casos) com pacientes apresentando ciclos menstruais regulares e ovulatórios associado a fator masculino (controle) submetidas a hiperestimulação ovariana controlada para técnica de reprodução assistida (ICSI).

	Gravidez		p
	Não (n=21)	Sim (n=15)	
NAG (nmol/l)			
Líquido folicular	203,7±10,7	197,8±11,9	0,720
Soro	313,8±22,2	331,9±26,7	0,601
MPO (absorbância)			
Líquido folicular	2,7±0,1	2,76±0,2	0,781
Soro	3,1±0,2	3,2±0,2	0,542
MCP-1 (pg/ml)			
Líquido folicular	220,1±20,0	222,4±37,2	0,953
Soro	63,4±12,8	62,8±15,2	0,976
PCR (mg/L)			
Líquido folicular	1,1±0,2	1,5±0,4	0,430
Soro	1,9±0,4	1,9±0,6	0,989

Nota: NAG - N- Acetilglicosaminidase; MPO - Mieloperoxidase; MCP-1 - Proteína quimiotática de monócitos-1; PCR - Proteína C reativa; ICSI - Injeção intracitoplasmática de espermatozóide. As dosagens de NAG, MPO e MCP-1 foram realizadas pelo método de ELISA e a dosagem de PCR foi realizada pelo método nefelométrico. As diferenças entre as médias foram feitas pelo teste *t* de Student.

5. DISCUSSÃO

Neste estudo foram avaliadas as dosagens de NAG, MPO, MCP-1 e PCR no soro e líquido folicular de pacientes inférteis submetidas à estimulação ovariana com gonadotrofinas e ICSI, visando determinar possíveis fatores prognósticos e marcadores da resposta inflamatória que poderiam interferir nos resultados dessa técnica de reprodução assistida. Essas enzimas e quimiocinas estudadas participam de importantes etapas do processo inflamatório como marcadores indiretos de proliferação celular, lesão endotelial, atividade inflamatória, além de um estudo inespecífico da presença de inflamação avaliado pelo PCR⁽⁶¹⁾. A identificação de novos marcadores pode ser valiosa para um melhor entendimento do processo de hiperestimulação ovariana, trazendo novas perspectivas para a seleção, seguimento e prognóstico dessas pacientes⁽⁶²⁾.

A anovulação crônica constitui a causa ovariana mais comum de infertilidade⁽⁶³⁾. Apresenta alterações complexas em qualquer etapa de seu retrocontrole hormonal, desencadeando o quadro clínico característico de ausência de ovulação⁽⁶³⁾. O exato momento e o fator desencadeante desse processo ainda não é bem esclarecido⁽⁶³⁾. Mecanismos imunes parecem ter um importante papel na ocorrência desses eventos, sugerido pela elevada concentração de leucócitos alta prevalência de anticorpos antiovarianos e mudanças na ativação de linfócitos no sangue periférico dessas pacientes^(15,64,65). Os dados na literatura sobre a relação entre o envolvimento da anovulação crônica, o risco de SHO e o desfecho reprodutivo com uma possível resposta inflamatória alterada nessas pacientes são conflitantes⁽⁶²⁾.

O papel das citocinas em pacientes com anovulação crônica têm sido investigado, apresentando resultados controversos na literatura⁽⁶⁶⁾. Não houve diferença nas concentrações de IL-6, IL-1 e TNF- α no líquido folicular, em ciclos não estimulados, em pacientes com anovulação crônica comparadas àquelas com ciclos regulares^(66,67). Uma maior concentração de TNF- α no líquido folicular foi evidenciada em mulheres com anovulação crônica em ciclos não estimulados^(68,69). O motivo da controvérsia nesses resultados pode ser devido às diferenças na forma de avaliação, período da análise e no grupo estudado⁽⁷⁰⁾. Esse estudo avaliou pacientes com anovulação crônica que representam uma população de risco para estimulação ovariana excessiva⁽⁵³⁾. As citocinas presentes no fluido folicular e ovário exercem efeitos diretos sobre a esteroidogênese, proliferação de células da granulosa, crescimento folicular e concentração de receptores de gonadotrofinas⁽⁷¹⁾. As gonadotrofinas podem modular a produção de citocinas durante os diferentes estágios da foliculogênese⁽⁷²⁾. O presente estudo avaliou a resposta inflamatória após a administração do hCG em um ciclo de hiperestimulação ovariana controlada com gonadotrofinas para técnica de reprodução assistida (ICSI). Esse momento da avaliação possibilitou a obtenção das amostras de líquido folicular e soro em uma mesma fase de desenvolvimento folicular.

Nesse estudo foram avaliados mediadores da resposta inflamatória e proliferação celular, derivados de macrófagos e neutrófilos, representados pelo NAG e MPO. A ativação e a liberação de marcadores indiretos dessas células e sua participação ou influência nos eventos do ciclo reprodutivo, em ciclos normais e em pacientes com anovulação crônica, ainda não foram avaliados.

As técnicas de imunoensaio utilizadas e reproduzidas nessa pesquisa para dosagem do NAG e MPO são bem estabelecidas e sensíveis na correlação entre a medida da atividade dessas enzimas e a infiltração celular tecidual de macrófagos e neutrófilos que elas representam, confirmados pela análise histológica dos tecidos expostos^(63,71,74).

A quimiocina MCP-1 é considerada uma importante moduladora dos eventos periovulatórios⁽⁷¹⁾. Sua avaliação no fluido folicular em pacientes submetidas a técnicas de reprodução assistida têm sido implicada como possível marcador molecular de maturação oocitária e fertilização⁽⁷¹⁾. A expressão da proteína MCP-1 e RNA-m em células estromais e granulosa luteinizadas foram demonstradas em cultura de células obtidas de líquidos foliculares de pacientes submetidas à fertilização *in vitro* e avaliadas por técnica de imunocitoquímica e ELISA⁽³²⁾. Demonstrou-se uma associação do MCP-1 com a IL-1 α , TNF- α e LH/hCG⁽³²⁾. Não há relatos na literatura sobre o comportamento do MCP-1 em pacientes com anovulação crônica, submetidas a hiperestimulação ovariana. Como nessas mulheres há uma alta incidência de oócitos imaturos obtidos durante a punção folicular, um risco elevado de hiperestimulação ovariana e uma menor taxa de gravidez quando comparadas a mulheres férteis, o comportamento dessa quimiocina foi avaliado nesse estudo^(75,76).

A técnica de ELISA é capaz de detectar o nível de quimiocinas presentes em uma amostra⁽¹⁰⁾. Entre os diversos kit's comercializados encontram-se diferenças na sensibilidade o que poderia justificar as diversidades observadas entre vários estudos⁽⁴⁰⁾. Os resultados, no entanto podem ser confirmados e validados utilizando a análise da expressão dos receptores das quimiocinas pela precisa medida do RNA-m seguida pela ativação do gene, avaliados por

reação em cadeia da polimerase-transcriptase reversa (RT-PCR) ⁽¹⁰⁾. Essa técnica apresenta uma sensibilidade maior que o ELISA⁽⁴⁰⁾, no entanto apresenta um custo elevado inviabilizando nosso estudo.

Vários estudos têm sugerido que pacientes com anovulação crônica encontram-se em um estado inflamatório crônico^(77,78). Os níveis de PCR são maiores em pacientes com anovulação crônica comparadas àquelas com ciclos regulares ovulatórios^(79,80). Para completar a hipótese da existência de uma resposta inflamatória alterada tanto sistêmica quanto local no grupo de pacientes com anovulação crônica comparadas com as de ciclos regulares e ovulatórios, utilizamos também a dosagem de PCR como marcador inflamatório inespecífico.

A técnica para dosagem da proteína C reativa nesse estudo foi quantitativa, por nefelometria com um limite de detecção de 0,0175 mg/dl. Um estudo avaliou a dosagem de PCR pela técnica de ELISA no líquido folicular obtido durante a coleta ovular e no soro de pacientes submetidas a hiperestimulação ovariana controlada para ICSI, com uma sensibilidade de 0,30 ng/ml, encontrando níveis maiores sangüíneos que no líquido folicular⁽⁸¹⁾. Outro estudo analisou o PCR no líquido folicular e soro de pacientes submetidas a ciclos de FIV pela técnica imunoturbidimétrica de alta sensibilidade, apresentando uma variação intra e inter ensaio menor que a descrita pelo método anterior, o ELISA (1,0 e 2,9% x 5,5 e 10,6%, respectivamente) ⁽⁸²⁾. A sensibilidade do método usado foi adequada para a avaliação de concentrações muito baixas esperadas no material analisado.

5.1. Resposta inflamatória na anovulação crônica

Nesse estudo, as pacientes com anovulação crônicas e submetidas a hiperestimulação ovariana com gonadotrofinas para ICSI apresentaram uma maior atividade de NAG e MPO no líquido folicular quando comparadas às pacientes com ciclos regulares ovulatórios. Esses valores representam respectivamente, de uma maneira indireta, uma maior proliferação local de macrófagos e neutrófilos nas pacientes com anovulação crônica. Sabe-se que leucócitos presentes no ovário podem regular a função ovariana pela secreção local de moduladores^(15,83) Existe um fluxo cíclico de leucócitos em associação às mudanças nos fluxos sangüíneos e linfáticos durante o ciclo ovariano, que pode ser aumentado durante e estimulação ovariana exógena⁽¹⁵⁾.

O líquido folicular é um material biológico com grande potencial para ser investigado e que até o momento apresenta composição celular incerta⁽⁸⁴⁾. A variedade na composição do líquido folicular pode refletir uma infiltração celular de uma reposta inflamatória característica e progressiva presente em outros sistemas⁽⁸⁴⁾. Um estudo avaliou a contagem e caracterização dos leucócitos e eritrócitos no aspirado folicular e sangue periférico em pacientes submetidas à estimulação ovariana e FIV⁽⁸⁴⁾. Não houve associação entre o número de leucócitos e eritrócitos no líquido folicular, afastando a possibilidade do acúmulo de células brancas ser resultante de lesão provocada pela punção. O perfil dos leucócitos também foi diferente do encontrado no sangue com um predomínio no líquido folicular de monócitos/macrófagos e uma menor contagem de polimorfonucleares, caracterizando uma população local específica⁽⁸⁴⁾. Outro estudo, avaliando ciclos menstruais normais, mostrou que a camada da teca do folículo periovulatório apresenta um número elevado de

neutrófilos e que macrófagos estariam presentes em maior concentração no corpo lúteo⁽⁸⁵⁾. Sugere-se que desenvolvimento folicular e as características do óvulo resultante da estimulação com gonadotrofinas poderiam também alterar o padrão migratório dessas células⁽⁸⁴⁾. Não existem estudos avaliando as enzimas NAG e MPO como marcadores de proliferação celular em pacientes submetidas à estimulação ovariana com gonadotrofinas ou em pacientes com anovulação crônica.

O achado de uma atividade do MPO maior no líquido folicular que no soro de pacientes com anovulação crônica pode sugerir um acúmulo de neutrófilos intraovarianos nesse grupo de pacientes. Não há relatos na literatura sobre a avaliação direta ou indireta de alterações nas concentrações de neutrófilos ou macrófagos obtidos no líquido folicular de pacientes com anovulação crônica. Evidencia-se um maior número de linfócitos T *helper* e ativados em pacientes com anovulação crônica em comparação àquelas ovulatórias^(84,87).

O nível de MCP-1 foi superior no líquido folicular em comparação ao soro nas pacientes com anovulação crônica e nas pacientes com ciclos regulares e ovulatórios, não havendo diferenças entre os grupos. Um estudo avaliando as concentrações de M-CSF e MCP-1, pelo método de ELISA, em pacientes submetidas a FIV por fator tubário confirmou esse achado⁽⁷¹⁾. Observou-se uma maior concentração do MCP-1 no líquido folicular em comparação ao soro, sendo mais elevada nas amostras de fluido folicular que continham oócitos maduros⁽⁷¹⁾. Um outro estudo avaliou o MCP-1 pelo método de ELISA, no líquido folicular e sangue periférico em pacientes com infertilidade associada a um fator masculino, tubária, endometriose e de causa inexplicada⁽³²⁾. Houve uma maior concentração de MCP-1 no líquido folicular, aumentando suas

concentrações progressivamente horas após a injeção de hCG, avaliados por meio de cultura de células granulosas-luteínicas obtidas no líquido folicular durante a punção⁽³²⁾. Outro estudo confirmou a maior concentração do MCP-1 no líquido folicular, mostrando ainda um aumento na sua expressão no período ovulatório e com a adição de IL-1 na cultura de células da teca⁽¹⁶⁾. Essa maior concentração observada no líquido folicular pode estar relacionada a uma maior produção local pelas células foliculares, pelo estímulo causado pelo hCG e pela influência de outras citocinas que se encontram também localmente aumentadas durante ciclos estimulados, principalmente IL-1 e TNF- α ^(16,84,88). Não houve diferença nos níveis de MCP-1 no líquido folicular ou soro entre os grupos estudados. Não há relato na literatura de dosagens de MCP-1 em pacientes com anovulação crônica. Um estudo demonstrou um aumento nos níveis de TNF- α e IL-6, medidos pela técnica de ELISA, no líquido folicular e soro de pacientes com anovulação crônica comparadas àquelas com ciclos regulares e submetidas a FIV⁽⁶²⁾.

As pacientes com anovulação crônica apresentaram uma maior dosagem de PCR no líquido folicular e soro em comparação às pacientes com ciclos regulares e ovulatórios. Nenhum estudo avaliando as dosagens de citocinas em pacientes com anovulação crônica associou seus achados com a dosagem de PCR no líquido folicular ou soro. Um estudo avaliou a dosagem de PCR, por imunoturbidimetria no soro e líquido folicular, em pacientes submetidas a hiperestimulação ovariana controlada para técnicas de reprodução assistida devido à associação de fator masculino, tubário, anovulação ou de causa inexplicada⁽⁸⁹⁾. Não houve diferença na dosagem do PCR entre os grupos⁽⁸⁹⁾. Houve um maior nível de PCR no soro dessas pacientes após a administração

do hCG, sugerindo a interferência da hiperestimulação ovariana controlada em uma resposta inflamatória sistêmica⁽⁸⁹⁾.

5.2. Resposta inflamatória e desfechos reprodutivos

Nesse estudo apenas a dosagem sérica de MPO associou-se significativamente com um maior número de oócitos totais e maduros obtidos na punção folicular. Um estudo demonstrou que a hiperestimulação ovariana controlada e a administração do hCG elevam os níveis de vários mediadores da resposta inflamatória, como o PCR e selectinas endoteliais e de leucócitos, estimulando ainda a proliferação de neutrófilos⁽⁸⁹⁾.

Vários estudos têm investigado o papel das citocinas no desenvolvimento da SHO^(90,91,92). O estudo do líquido ascítico e pleural em pacientes que apresentaram a SHO mostraram níveis progressivamente mais baixos de VEGF, IL-6, IL-8 e TNF- α com a involução da doença^(93,94). Um outro estudo evidenciou um aumento do VEGF no soro e diminuição no líquido folicular em pacientes de risco para a SHO, sem alteração nas concentrações de IL-1 β e IL-6^(67,95,96).

Nesse estudo observamos uma associação significativa da dosagem do MCP-1 no líquido folicular com a ocorrência da SHO. Não há relatos na literatura sobre alteração no nível folicular ou sanguíneo de MCP-1 e sua relação com a SHO. Um estudo avaliou em amostras de líquido folicular e sangue os níveis de IL-6, IL-8, TNF- α e VEGF em mulheres submetidas a FIV e que desenvolveram a SHO, comparadas a grupos que não apresentaram essa complicação^(94,97). Houve um aumento de IL-6 no líquido folicular e de IL-8 no soro no momento da transferência embrionária nas pacientes com SHO, sem alteração nas

demais citocinas avaliadas^(94,98). Uma maior dosagem de IL-2 no líquido folicular de pacientes submetidas a FIV e que desenvolveram a SHO foi descrita⁽⁹⁹⁾. Existe a possibilidade do MCP-1 no líquido folicular de pacientes com SHO ser influenciado por fatores intrínsecos ovarianos liberados pelo aumento exagerado do seu volume ou pela presença e estímulo de outras citocinas que poderiam estar alteradas em pacientes com risco ou que desenvolveram a síndrome.

Não há relatos na literatura da associação do PCR com a ocorrência da SHO. Um estudo demonstrou nível sérico elevado de PCR em pacientes submetidas a hiperestimulação ovariana controlada para FIV nos dias de administração do hCG e retirada dos oócitos, com um aumento progressivo entre esses dias^(99,100). O achado de uma associação significativa da dosagem sérica do PCR com a ocorrência da SHO pode ser explicada pelo caráter inflamatório agudo dessa complicação.

5.3. Considerações finais

Os resultados desse estudo sugerem uma maior proliferação folicular de neutrófilos e macrófagos e resposta inflamatória inespecífica em pacientes com anovulação crônica comparadas àquelas com ciclos menstruais regulares e ovulatórios. Uma implicação clínica desse achado seria a possível utilização de terapias antiinflamatórias nesse grupo de pacientes para amenizar essa resposta inflamatória. Poderiam ser utilizados corticosteróides sistêmicos, agentes anti-soro neutralizantes de quimiocinas, imunomoduladores e agentes sensibilizantes da insulina. Outros estudos fora do período de hiperestimulação

ovariana seriam necessários para avaliar se o tratamento com essas drogas reverteria o quadro crônico de anovulação.

Os grupos estudados de anovuladoras crônicas e pacientes com ciclos regulares constituiu-se de forma homogênea. Não podemos descartar a hipótese de que outras características, se presentes, influenciariam na resposta inflamatória observada e nos resultados encontrados.

As dosagens do MCP-1 e PCR como marcadores de risco para ocorrência de SHO é um achado de grande importância clínica. No entanto, estudos com um maior número de pacientes e específicos para essa questão devem ser realizados.

A infertilidade é uma condição multifatorial e uma preocupação crescente no modelo assistencial de saúde. A oportunidade de oferecer tratamentos efetivos e com menores custos, aliados a um baixo risco para as pacientes tem proporcionado avanços nas pesquisas por todo o mundo. Devem ser realizados maiores estudos para confirmar e estender os achados encontrados a um grupo maior de pacientes e a outros grupos que cursam com uma resposta inflamatória alterada, muitas vezes desencadeada pelo próprio fator que levou ao distúrbio da fertilidade, na busca do sucesso na concepção.

6. CONCLUSÕES

O presente estudo permite concluir que:

- Pacientes com infertilidade por anovulação crônica apresentam uma maior proliferação folicular de neutrófilos e macrófagos e resposta inflamatória inespecífica em comparação a mulheres pacientes apresentando ciclos menstruais regulares e ovulatórios associado a fator masculino submetidas a hiperestimulação ovariana controlada para técnica de reprodução assistida (ICSI).
- A atividade sérica do MPO apresentou uma associação significativa com um maior número de oócitos totais e maduros obtidos na punção folicular. A ocorrência de síndrome do hiperestímulo ovariano associou-se com um nível mais elevado de MCP-1 no líquido folicular e de PCR no soro em pacientes com infertilidade submetidas a hiperestimulação ovariana controlada para técnica de reprodução assistida (ICSI).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

*As referências citadas e relacionadas nesse estudo seguem as normas do *International Committee of Medical Journal Editors* – Grupo de Vancouver, desenvolvidas pela *US National Library of Medicine* (JAMA 1997; 227: 927-34).

1. Briscoe DM, Ganz P, Alexander SI, Melder RJ, Jain RK, Cotran RS, Lichtman AH. The problem of chronic rejection: influence of leukocyte-endothelial interactions. *Kidney Int Suppl* 1997; 58:S22-7.
2. McIntyre M, Dominiczak AF. Nitric oxide and cardiovascular disease. *Postgrad Med* 1997; 73(864):630-4.
3. Ravage ZB, Gomez HF, Czermak BJ., Watkins SA, Till GO. Mediators of microvascular injury in dermal burn wounds. *Inflammation* 1998; 22(6):619-29.
4. Wahl SM. Inflammation and growth factors. *J Urol* 1997; 157(1):303-5.
5. Wu R, Van der Hoek KH, Ryan NK, Norman RJ, Robker RL. Macrophage contributions to ovarian function. *Hum Reprod Update* 2004; 10(2):119-33.
6. Erwig LP, Kluth DC, Walsh GM, Rees AJ. Initial cytokine exposure determines function of macrophages and renders them unresponsive to other cytokines. *J Immunol* 1998 15; 161(4):1983-8.

7. Calogero AE, Nicoletti F, Palumbo MA, Burrello N, Mauro MD, Lunetta M, Bendtzen K, Cianci A . Macrophage-derived cytokines in the follicular fluids of women with infertility due to immunological causes. Elevated levels of interleukin 6 and low levels of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Cytokine* 1998; 10(10): 814-8.
8. Liblau RS, Singer MS, McDevitt HO. Th1 and Th2 CD4⁺ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol Today* 1995; 16:34-8.
9. Bailey PJ, Sturm A, Lopez-Ramos B. A biochemical study of the cotton pellet granuloma in the rat. Effects of dexamethasone and indomethacin. *Biochem Pharmacol* 1982; 31(7):1213-8.
10. Carollo M., Hogaboam CM., Kunkel SL., Delaney S., Christie MI., Perretti M. Analysis of the temporal expression of chemokines and chemokine receptors during experimental granulomatous inflammation: role and expression of MIP-1alpha and MCP-1. *Br J Pharmacol* 2001; 134(6):1166-79.
11. Baldus S, Heitzer T, Eiserich JP, Lau D, Mollnau H, Ortak M, Petri S, Goldmann B, Duchstein HJ, Berger J, Helmchen U, Freeman BA, Meinertz T, Munzel T. Myeloperoxidase enhances nitric oxide catabolism during myocardial ischemia and reperfusion. *Free Radic Biol Med* 2004; 37(6):902-11.

12. Mackay CR. Chemokines: what chemokine is that? *Curr Biol* 1997; 7:R384–6.
13. MacKay CR. Chemokine receptors and T cell chemotaxis. *J Exp Med* 1996; 184:799-802.
14. Zhou C, Borillo J, Wu J, Torres L, Lou YH. Ovarian expression of chemokines and their receptors. *J Reprod Immunol* 2004; 63(1):1-9.
15. Bukulmez O. and Arici A. Leukocytes in ovarian function. *Hum Rep Update* 2000; 6(1): 1-15.
16. Dahm-Kahler P, Runesson E, Lind AK, Brannstrom M. Monocyte chemotactic protein-1 in the follicle of the menstrual and IVF cycle. *Mol Hum Reprod* 2006; 12(1):1-6.
17. Ballou SP, Kushner I. C-reactive protein and the acute phase response. *Adv Intern Med* 1992; 37:313-36.
18. Kushner I. C-reactive protein and the acute-phase response. *Hosp Pract* 1990; 25(3A):13-28.
19. Chieko M. Clinical laboratory differentiation of infectious versus non-infectious systemic inflammatory response syndrome. *Clin Chim Acta* 2005; 351(1-2):17-29.

-
20. Paffen E, deMaat PMM. C-reactive protein in atherosclerosis: A causal factor? *Cardiovasc Res* 2006; 71(1): 30-9.
 21. Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med* 2002; 347:1557-65.
 22. Klufft C, Leuven JA, Helmerhorst FM, Krans HM. Pro-inflammatory effects of oestrogens during use of oral contraceptives and hormone replacement treatment. *Vascul Pharmacol* 2002; 39:149-54.
 23. Garcia- Velasco JA, Arici A. Chemokines and human reproduction. *Fertil Steril* 1999; 71: 983-93
 24. Herriot DM, Warres GM, Kerin JF. Pregnancy-related chemotactic activity of human follicular fluid. *Fertil Steril* 1986; 45:196-201.
 25. Gougeon A. Some aspects of the dynamics of ovarian follicular growth in the human. *Acta Eur Fertil* 1989; 20(4):185-92.
 26. Chabbert Buffet N, Djakoure C, Christin Maitre S, Bouchard P. Regulation of the Human Menstrual Cycle. *Front Neuroendocrinol* 1998; 19:151-86.

-
27. Gordon S. Macrophage-restricted molecules: role in differentiation and activation. *Immunol Lett* 1999a; 65:5-8.
 28. Ávila LM, Madero JI, Escobar M, Lopez C, Leon MF, Ardila J, Abdalla L, Guerra O, Aparício A, Ruiz JA. Proinflammatory cytokines IL-1h, IL-8 and IL-6 in the follicular fluid of healthy women. *Int Congr Ser* 2004; 1271:291-5.
 29. Chang RJ, Gougeon A, Erickson GF. Evidence for a neutrophilinterleukin-8 system in human folliculogenesis. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178:650-7.
 30. Stocco DM, Clark BJ. Regulation of the Acute Production of Steroids in Steroidogenic Cells. *Endocrine Reviews* 1996; 17(3):221-44.
 31. Oral E, Seli E, Bahtiyar MO, Jones EE, Arici A. Growth-regulated a expression in human preovulatory follicles and ovarian cells. *Am J Reprod Immunol* 1997; 37:19-25.
 32. Arici A, Oral E, Bukulmez O, Buradagunta S, Bahtiyar O, Jones EE. Monocyte chemotactic protein-1 expression in human preovulatory follicles and ovarian cells. *J Reprod Immunol* 1997; 32:201-19.
 33. Erickson GF, Shimasaki S. The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. *Fertil Steril* 2001; 76(5):943-9.

-
34. Giudice LC. Insulin-like growth factor family in Graafian follicle development and function. *J Soc Gynecol Investig* 2001; 8(1 Suppl Proceedings):S26-9.
35. Frederick JL, Shimanuki T, diZerega GS. Initiation of angiogenesis by human follicular fluid. *Science* 1984; 224:389-90.
36. Welt C, Sidis Y, Keutmann H, Schneyer A. Activins, inhibins, and follistatins: from endocrinology to signaling. A paradigm for the new millennium. *Exp Biol Med (Maywood)* 2002; 227(9):724-52.
37. Townson DH, Warren JS, Flory CM, Naftalin DM, Keyes PL. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 in the corpus luteum of the rat. *Biol Reprod* 1996; 54:513-20.
38. Hosang K, Knoke I, Klaudiny J, Wempe F, Wuttke W, Scheit KH. Porcine luteal cells express monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): analysis by polymerase chain reaction and cDNA cloning. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 199:962-8.
39. Hosang K, Knoke I, Klaudiny J, Wempe F, Wuttke W, Scheit KH. Porcine luteal cells express monocyte chemoattractant protein-2 (MCP-2): analysis by cDNA cloning and northern analysis. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 205:148-53.

-
40. Lim KJH, Odukoya OA, Ajjan RA, Tin-Chiu Li, Weetman AP, Cooke ID. The role of T-helper cytokines in human reproduction. *Fertil Steril* 2000; 73(1):136-42.
41. Bouman A, Heineman MJ, Faas MM. Sex hormones and the immune response in humans. *Hum Reprod Update* 2005; 11(4):411-23.
42. Veenstra van Nieuwenhoven AL, Bouman A, Moes H, Heineman MJ, de Leij LF, Santema J, Faas MM. Cytokine production in natural killer cells and lymphocytes in pregnant women compared with women in the follicular phase of the ovarian cycle. *Fertil Steril* 2002; 77:1032-7.
43. McKay LI, Cidlowski JA. Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr Rev* 1999; 20:435-59.
44. Chaouat G, Ledee-Bataille N, Dubanchet S, Zourbas S, Sandra O, Martal J. TH1/TH2 paradigm in pregnancy: paradigm lost? Cytokines in pregnancy/early abortion: reexamining the TH1/TH2 paradigm. *Int Arch Allergy Immunol* 2004; 134: 93-119.
45. Franks S. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 1995; 333(13):853-61.

-
46. Bako A.U, Morad S., Atiomo W.A. Polycystic ovary syndrome: An overview. *Rev Gynaecol Pract* 2005; 5:115-22.
47. Franks S, Mason H, Willis D. Follicular dynamics in the polycystic ovary syndrome. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 163(1-2):49-52.
48. Jennes L, Eyigor O, Janovick JA, Conn PM. Brain gonadotropin releasing hormone receptors: localization and regulation. *Recent Prog Horm Res* 1997; 52:475-90.
49. The Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and longterm health risks related to polycystic syndrome (PCOS). *Hum Reprod* 2004; 19:41-7.
50. Fraser IS, Kovacs G. Current recommendations for the diagnostic evaluation and follow-up of patients presenting with symptomatic polycystic ovary syndrome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004; 18(5):813-23.
51. Eden JA, Jones J, Carter GD, Alaghband-Zadeh J. Follicular fluid concentrations of insulin-like growth factor 1, epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha and sex-steroids in volume matched normal and polycystic human follicles. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1990; 32(4):395-405.

-
52. Vrtacnik-Bokal EE, Virant-Klun I, Meden-Vrtovec H. Quality of oocytes and embryos in patients with polycystic ovaries. *International Congress Series* 2004; 1271:112-5.
53. Whelan JG 3rd, Vlahos NF. The ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 2000; 73:883-96.
54. The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 2004; 82 (1):S81-S86.
55. Geva E, Jaffe RB. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology and pathology. *Fertil Steril* 2000; 74:429-38.
56. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrinol Rev* 1997; 18:4-25.
57. Enskog A, Henriksson M, Unander M, Nilsson L, Brannstrom M. Prospective study of the clinical and laboratory parameters of patients in whom ovarian hyperstimulation syndrome developed during controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1999; 71:808-14.
58. The ESHRE Capri Workshop Group, Guidelines to the prevalence, diagnosis, treatment and management of infertility. *Hum. Reprod.* 1996; 11:1775-807.

-
59. Menkveld R, Stander FSH, Kotze TJW, Kruger TF, van Zyl JA. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Hum Reprod* 1990; 5:586-92.
60. Veeck LL. Oocyte assessment and biological performance. *Ann N Y Acad Sci* 1988; 541:259-74.
61. Ferreira MA, Barcelos LS, Campos PP, Vasconcelos AC, Teixeira MM, Andrade SP. Sponge-induced angiogenesis and inflammation in PAF receptor-deficient mice (PAFR-KO). *Br J Pharmacol* 2004; 141(7):1185-92.
62. Amato G, Conte M, Mazziotti G, Lalli E, Vitolo G, Tucker A T, Bellastella A, Carella C, Izzo A. Serum and Follicular Fluid Cytokines in Polycystic Ovary Syndrome During Stimulated Cycles. *Obstet Gynecol* 2003; 101(6):1177-82.
63. Franks S, White DM. Prevalence of and etiological factors in polycystic ovarian syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 687:112-4.
64. Fenichel P, Gobert B, Carre´ Y, Barbarino-Monnier P, Hie´ronimus S. Polycystic ovary syndrome in autoimmune disease. *Lancet* 1999; 353:2210.
65. Turi A, Di Prospero F, Mazzarini A, Costa M, Cignitti M, Garzetti GG, et al. Lymphocytes subset in hyperandrogenic women with polycystic ovarian disease. *Acta Eur Fertil* 1988; 19:155-7.

66. Jasper M, Norman RJ. Immunoactive interleukin-1 beta and tumour necrosis factor-alpha in thecal, stromal and cell granulosa cell cultures from normal and polycystic ovaries. *Hum Reprod* 1995; 10:1352-54.
67. Pellicer A, Albert C, Mercader A, Bonilla-Musoles F, Remohy J, Simon C. The pathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome: In vivo studies investigating the role of interleukin-1 β , interleukin-6, and vascular endothelial growth factor. *Fertil Steril* 1999; 71:482-9.
68. Escobar-Morreale HF, Calvo RM, Sancho J, San Millan JL. TNF- α and hyperandrogenism: A clinical, biochemical, and molecular genetic study. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:3761-7.
69. Gonzalez E, Thusu K, Abdel-Rahman E, Prabhala A, Tomani M, Dandona P. Elevated serum levels of tumor necrosis factor alpha in normal-weight women with polycystic ovary syndrome. *Metabolism* 1999; 48:437-41.
70. Deshpande RR, Chang MY, Chapman JC, Micheal SD. Alteration of cytokine production in follicular cystic ovaries induced in mice by neonatal estradiol injection. *Am J Reprod Immunol* 2000; 44:80-8.
71. Kawano Y, Kawasaki F, Nakamura S, Matsui N, Narahara H, Miyakawa I. The Production and Clinical Evaluation of Macrophage Colony-Stimulating Factor and Macrophage Chemoattractant Protein-1 in Human Follicular Fluids. *Am J Rep Immunol* 2001; 45:1-5.

-
72. Zolti M, Meiom R, Shemesh M, Wollach D, Mashiach S, Shore L, Rafael ZB. Granulosa cells as a source and target organ for tumor necrosis factor-alpha. *FEBS Lett* 1990; 261(2):253-5.
73. Belo AV, Barcelos LS, Teixeira MM, Ferreira MA, Andrade SP. Differential effects of antiangiogenic compounds in neovascularization, leukocyte recruitment, VEGF production, and tumor growth in mice. *Cancer Invest* 2004; 22(5):723-9.
74. Barcelos LS, Talvani A, Teixeira AS, Cassali GD, Andrade SP, Teixeira MM. Production and in vivo effects of chemokines CXCL1-3/KC and CCL2/JE in a model of inflammatory angiogenesis in mice. *Inflamm Res* 2004; 53(10):576-84.
75. Aboulghar MA, Mansour RT, Serour GI, Ramzy AM, Amin YM. Oocyte quality in patients with severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 1997; 6:1011-21.
76. Howles CM, Macanamee MC, Edwards RG. Effect of high tonic levels of luteinizing hormone on outcome of in vitro fertilization. *Lancet II* 1986; 521-2.
77. Dhindsa G, Bhatia R, Dhindsa M, Bhatia V. Insulin resistance, insulin sensitization and inflammation in ovarian syndrome. *J Postgrad Med* 2004; 50(2):140-4.

-
78. Kousta E, Tolis G, Franks S. Polycystic ovary syndrome. Revised diagnostic criteria and long-term health consequences. *Hormones (Athens)*. 2005; 4(3):133-47.
79. Kelly CC, Lyall H, Petrie JR, Gould GW, Connell JM, Sattar N. Low grade chronic inflammation in women with polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(6):2453-5.
80. Sharma A, Atiomo W. Recent developments in polycystic ovary syndrome. *Cur Obstet Gynaecol* 2003; 13:281-6.
81. Wunder DM, Kretschmer R, Bersinger NA. Concentrations of leptin and C-reactive protein in serum and follicular fluid during assisted reproductive cycles. *Hum Reprod* 2005; 20(5):1266-71
82. Orvieto R, Chen R, Ashkenazi J, Ben-Harush A, Bar J and Fisch B . C-reactive protein levels in patients undergoing controlled ovarian hyperstimulation for IVF cycle. *Hum Reprod* 2004a; 19:357-9.
83. Mori T. Immuno-endocrinology of cyclic ovarian function. *Am J Reprod Immunol* 1990; 24(3):80-9
84. Smith MP, Flannery GR, Randle BJ, Jenkins JM, Holmes CH. Leukocyte origin and profile in follicular aspirates at oocyte retrieval. *Hum Reprod*. 2005; 20(12):3526-31.

-
85. Brannstrom M, Pascoe V, Norman RJ, McClure N. Localization of leukocyte subsets in the follicle wall and in the corpus luteum throughout the human menstrual cycle. *Fertil Steril* 1994; 61(3):488-95.
86. Gallinelli A, Ciaccio I, Giannella L, Salvatori M, Marsella T, Volpe A. Correlations between concentrations of interleukin-12 and interleukin-13 and lymphocyte subsets in the follicular fluid of women with and without polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2003; 79(6):1365-72.
87. Grossman CJ, Roselle GA, Mendenhall CL. Sex steroid regulation of autoimmunity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991; 40(4-6):649-59.
88. Runesson E, Ivarsson K, Janson PO and Brannstrom M. Gonadotropin and cytokine-regulated expression of the chemokine interleukin 8 in the human preovulatory follicle of the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:4387-95.
89. Orvieto R. Controlled ovarian hyperstimulation--an inflammatory state. *J Soc Gynecol Investig* 2004; 11(7):424-6.
90. Brännström M, Norman RJ: Involvement of leukocytes and cytokines in the ovulatory process and corpus luteum function. *Hum Reprod* 1993; 8:1762-75.

-
91. Louikides JA, Loy RA, Edwards R, Honig J, Visintin I, Polan ML. Human follicular fluids contain tissue macrophages. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71:1363-7.
92. Adashi EY. The potential relevance of cytokines to ovarian physiology. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992; 43(5):439-44.
93. Chen CD, Wu MY, Chen HF, Chen SU, Ho HN, Yang YS. Prognostic importance of serial cytokine changes in ascites and pleural effusion in women with severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 1999; 72(2):286-92.
94. Chen CD, Chen HF, Lu HF, Chen SU, Ho HN, Yang YS. Value of serum and follicular fluid cytokine profile in the prediction of moderate to severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod* 2000; 15(5):1037-42.
95. Wang LJ, Brannstrom M, Pascoe V, Norman RJ. Cellular composition of primary cultures of human granulosa-lutein cells and the effect of cytokines on cell proliferation. *Reprod Fertil Dev* 1995; 7(1):21-6.
96. Cavender JL, Murdoch WJ. Morphological studies of the microcirculatory system of periovulatory ovine follicles. *Biol Reprod* 1988; 39(4):989-97.
97. Standaert, FS, Zamor, CS, Chew, BP. Quantitative and qualitative changes in blood leukocytes in the porcine ovary. *Am. J. Reprod. Immunol* 1991; 215:163-8.

98. Araki M, Fukumatsu Y, Katabuchi H, Schultz LD, Takahashi K, Okamura H: Follicular development and ovulation in macrophage colony-stimulating factor deficient mice homozygous for the osteopetrosis (op) mutation. *Biol Reprod* 1996; 54:478-84.

99. Orvieto R, Voliovitch I, Fishman P, Ben-Rafael Z. Interleukin-2 and ovarian hyperstimulation syndrome: a pilot study. *Hum Reprod* 1995; 10(1):24-7.

100. Senturk LM, Seli E, Gutierrez LS, Mor G, Zeyneloglu HB, Arici A. Monocyte chemotactic protein-1 expression in human corpus luteum. *Mol Hum Reprod* 1999; 5(8):697-702.

8. ANEXOS

I. Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) do Hospital MaterDei



compromisso com a qualidade pela vida

Belo Horizonte, 11 de abril de 2006.

À Dra. Rívia Mara Lamaita
Investigadora Principal

Prezada Dra. Rívia,

Comunicamos que o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Mater Dei analisou e aprovou, na data de 05 de abril de 2006, Protocolo de Pesquisa intitulado: ***“Avaliação da resposta imune através da correlação entre a dosagem de citocinas no líquido folicular e sérico em pacientes portadoras de anovulação crônica e pacientes férteis”***; bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Esclarecemos ainda que a pesquisa será conduzida na Clínica Pró-Criar, sob sua responsabilidade.

Cordialmente,


Cleusa Maria Vieira Miguel
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Mater Dei

Comitê de Ética em Pesquisa
do Hospital Mater Dei



compromisso com a qualidade pela vida

PARECER CONSUBSTANCIADO

I - IDENTIFICAÇÃO

Registro no CEP: 154.

Título do projeto: *“Avaliação da resposta imune através da correlação entre a dosagem de citocinas no líquido folicular e sérico em pacientes portadoras de anovulação crônica e pacientes férteis”.*

Investigadora principal: Dra. Rívia Mara Lamaita.

Instituição onde se realizará: Clínica Pró-Criar – Rua Alvarenga Peixoto, 1379 – Belo Horizonte – MG – 30.180-121.

II - OBJETIVOS

O objetivo é avaliar através de um estudo comparativo prospectivo os níveis de citocinas dosados no líquido folicular e soro de pacientes submetidas a hiperestimulação ovariana para técnica de reprodução assistida (fertilização in vitro – F.I.V.), em portadoras de critérios clínicos e/ou laboratoriais de anovulação crônica e pacientes ovulatórias e férteis, com indicação de FIV devido a fator masculino exclusivo. O trabalho busca definir se existe nessas pacientes uma resposta inflamatória ovariana alterada e avaliar se isso seria responsável por um pior, ou melhor, prognóstico desse grupo de pacientes nos resultados obtidos nas técnicas de reprodução assistida.

III - SUMÁRIO DO PROJETO

O sumário do trabalho é completo e bem formatado, contendo todos os itens previstos na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS.

Trata-se de estudo prospectivo envolvendo 40 pacientes e com indicação para técnica de reprodução assistida (FIV). Será realizado estudo piloto preliminar com 10 pacientes.

O projeto contém histórico, fundamentação teórica para o estudo, objetivo bem identificado, seleção da população do estudo, tamanho da amostra bem definido, metodologia, critérios de inclusão e exclusão, métodos estatísticos, critérios para interrupção da pesquisa, orçamento financeiro, informações relativas ao sujeito da pesquisa, análise crítica de possíveis riscos e benefícios e consentimento livre e esclarecido.



compromisso com a qualidade pela vida

IV - COMENTÁRIOS DO RELATOR

A estrutura do protocolo é adequada, para que se pretende analisar; contendo os itens necessários à apreciação da referida pesquisa.

O termo de consentimento é descrito em linguagem acessível e clara, informando devidamente sobre o estudo, as complicações dos métodos, a técnica dos procedimentos, os insucessos, a faculdade de participar ou se retirar do mesmo a qualquer momento.

V - PARECER DO CEP

Conclusão: projeto aprovado. Analisado em reunião ocorrida dia 05 de abril de 2006.

Belo Horizonte, 11 de abril de 2006.


Cleusa Maria Vieira Miguel
Coordenadora do CEP do Hospital Mater Dei

Comitê de Ética em Pesquisa
do Hospital Mater Dei

II. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE ATRAVÉS DA CORRELAÇÃO ENTRE A DOSAGEM DE CITOCINAS NO LÍQUIDO FOLICULAR E SÉRICO EM PACIENTES PORTADORAS DE ANOVULAÇÃO CRÔNICA E PACIENTES FÉRTEIS

1. IDENTIFICAÇÃO DA PACIENTE:

Nome: Registro:
Idade: Carteira de identidade
Endereço: Telefone:

A senhora está sendo convidada a participar de um projeto de pesquisa que visa investigar a presença de algumas substâncias no sangue e no líquido folicular colhido durante a punção folicular (retirada dos óvulos) para a realização do processo da fertilização *in vitro* e que possam nos ajudar a fazer o tratamento mais adequado para as causas de infertilidade. A participação no estudo consiste em doar uma amostra de sangue e uma quantidade do líquido folicular que, após a identificação dos óvulos normalmente é completamente desprezado, para serem analisados. Essa participação não modifica o tratamento proposto para o seu caso.

A sua identidade será preservada e o seu direito de não participar no estudo não a prejudicará no seu tratamento.

2. DESCRIÇÃO DAS COMPLICAÇÕES DOS MÉTODOS: não haverá aumento do risco de complicações devido à retirada da amostra de sangue e da coleta do líquido folicular. As complicações serão as mesmas relacionadas ao procedimento cirúrgico a ser realizado

2a. DESCRIÇÃO TÉCNICA DOS PROCEDIMENTOS:

Uma amostra do líquido folicular que é retirado de rotina através de punção guiada por ultrassom para a retirada dos óvulos será armazenada para estudo naquelas pacientes que estão em tratamento de fertilização assistida. Será ainda armazenada uma amostra de sangue periférico (veia do braço) para posterior análise.

2b. OBJETIVO DOS PROCEDIMENTOS:

O objetivo da realização desse estudo é o melhor conhecimento do processo de fertilização assistida (fertilização *in vitro*), com a possibilidade de desenvolvimento de novos tratamentos no futuro e poder melhorar os resultados obtidos.

2c. DESCRIÇÃO DOS INSUCESSOS:

O único insucesso possível é a não obtenção dos efeitos necessários nas análises previstas no líquido folicular e da amostra de sangue.

2d. DESCRIÇÃO DAS COMPLICAÇÕES DOS MÉTODOS:

Não haverá aumento do risco de complicações ou de prejuízo nos resultados obtidos com o tratamento devido ao armazenamento do líquido folicular, visto que o mesmo seria totalmente desprezado. Se for o caso das amostras de líquido folicular e sangue serem usadas no futuro, um novo termo de consentimento será redigido e apresentando aos participantes da pesquisa, doadores do material biológico. Convém ressaltar que também nesse caso a sua identidade será preservada e o seu direito de não participar no estudo não a prejudicará no seu tratamento.

As complicações serão unicamente as relacionadas ao procedimento cirúrgico proposto.

2e. DESCRIÇÃO DA ANESTESIA:

Foi-me explicado que poderá haver necessidade de me submeter à anestesia para a realização da cirurgia proposta. O tipo de anestesia utilizado no tratamento proposto é a sedação venosa geral.

2f. DESTINO DOS ÓVULOS:

Todos os óvulos obtidos na punção folicular durante o tratamento serão utilizados conforme meu desejo expresso em termo de consentimento próprio e não farão parte desse ou qualquer outro estudo.

3. NÃO HAVERÁ RESSARCIMENTO OU INDENIZAÇÕES.

4. RECEBI TODAS AS INFORMAÇÕES QUE DESEJAVA CONHECER E A POSSIBILIDADE DE FAZER PERGUNTAS E QUESTIONAR DÚVIDAS.

6. TAMBÉM ENTENDI QUE, A QUALQUER MOMENTO E SEM NECESSIDADE DE DAR NENHUMA EXPLICAÇÃO PODEREI REVOGAR O CONSENTIMENTO QUE AGORA PRESTO.

7. ASSIM, DECLARO AGORA QUE ESTOU SATISFEITA COM A INFORMAÇÃO RECEBIDA E QUE COMPREENDO O ALCANCE E RISCOS DO TRATAMENTO.

8. RESERVO-ME EXPRESSAMENTE O DIREITO DE REVOGAR A QUALQUER MOMENTO MEU CONSENTIMENTO ANTES QUE O PROCEDIMENTO OBJETO DESTES DOCUMENTOS SE REALIZE.

9. POR TAL RAZÃO E NESTAS CONDIÇÕES **CONSI**NTO QUE PARTICIPE DESSA PESQUISA E QUE UMA AMOSTRA DO LÍQUIDO FOLICULAR E UMA AMOSTRA DE SANGUE SEJAM ENCAMINHADOS PARA ESTUDO CONFORME PROPOSTO.

Investigador: Dra. Rívia Mara Lamaita

Endereço: Rua Alvarenga Peixoto, 1379 – Santo Agostinho

Belo Horizonte – Minas Gerais – CEP:30.180-121

TELEFONE DE CONTATO: 31 3292-5299 31 91418131

CEP MATERDEI : 3339 9000

De pleno acordo

Cidade:

Data:

Assinatura do médico

Assinatura da paciente

Testemunha

Testemunha

Declaro que é possível a qualquer momento antes da cirurgia revogar o meu consentimento.

Revogo o consentimento prestado no dia E afirmo que não desejo prosseguir na pesquisa e tratamento que me foi proposto, que dou como finalizado nesta data.

Cidade:

Data:

Assinatura do médico

Assinatura da paciente

Testemunha

Testemunha

9. SUMMARY

Introduction: Chronic anovulation is the most frequently occurring ovarian disorder associated with infertility. Inflammatory mechanisms may play an important role in determining chronic anovulation. This study was performed to evaluate the inflammatory response in follicular fluid and serum in patients with infertility caused by chronic anovulation and normally ovulating women undergoing intracytoplasmic sperm injection (ICSI).

Methods: Thirteen patients with chronic anovulation (cases) and 23 normally ovulating women (control group) were prospectively studied. N-acetylglucosaminidase (NAG), Myeloperoxidase (MPO), Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and Reactive C protein (PCR) concentrations were evaluated in serum and in follicular fluids obtained at the time of oocyte retrieval.

Results: The age of the patients ranged from 20 to 37 years (28.9 ± 0.6 years). The average body mass index (BMI) was 21.7 ± 0.4 kg/cm² (17.6 to 28.0 kg/cm²). There were no differences between groups regarding mean age, BMI, follicle-stimulating hormone (FSH). The patients with chronic anovulation were associated with higher levels of luteinizing hormone (LH), antral follicles count and ovarian size. The patients with chronic anovulation presented higher NAG ($p=0.025$) and MPO ($p=0.030$) activity in follicular fluid compared to normally ovulating women undergoing ICSI. The MCP-1 levels in follicular fluid were higher than the serum levels in all patients. The PCR in follicular fluid ($p=0.025$) and serum ($p=0.024$) were higher in patients with PCR chronic anovulation to the control group. The occurrence of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) was associated with higher follicular fluid levels of MCP-1 ($p=0.038$) and serum PCR ($p=0.016$).

Conclusions: Patients with chronic anovulation are associated with higher follicle macrophage/neutrophil influx and also with an inespecific inflammatory response compared to normally ovulating women undergoing ICSI. Follicular fluid levels of MCP-1 and serum PCR associated with the occurrence of OHSS.