



Reprodução & Climatério

<http://www.sbrh.org.br/revista>



Artigo original

Mulheres inférteis com endometriose pélvica mínima e leve submetidas à estimulação ovariana apresentam menor expressão do gene CYP19A1 em células do cumulus[☆]

Ionara Diniz E.S. Barcelos^{*}, Flavia Capello Donabela, Michele G. Da Broi, Cristiana Padovan Ribas, Juliana Meola e Paula Andrea Navarro

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

INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

Histórico do artigo:

Recebido em 13 de maio de 2013

Aceito em 4 de agosto de 2013

On-line em 11 de setembro de 2013

Palavras-chave:

Aromatase

Gene CYP19A1

Endometriose

Qualidade oocitária

Células do cumulus

R E S U M O

Objetivo: Menores taxas de gestação em portadoras de endometriose submetidas a técnicas de reprodução assistida podem estar relacionadas à piora da qualidade oocitária. A análise da expressão gênica em células do cumulus (CC) pode fornecer biomarcadores passíveis de prever a qualidade gamética. O objetivo deste estudo foi comparar os níveis da expressão do gene CYP19A1 em CC de mulheres inférteis com endometriose mínima/leve (I/II) e controles inférteis.

Método: Foram selecionadas pacientes com infertilidade por endometriose pélvica inicial e por fator masculino e/ou tubário (grupo controle), submetidas à estimulação ovariana controlada para injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI). Imediatamente após a captação oocitária, CC foram isoladas e armazenadas. Foi realizada a quantificação da expressão do gene CYP19A1 nas CC por meio de PCR-Real Time.

Resultados: Foram isoladas CC de 23 mulheres inférteis com endometriose I/II e de 41 controles. Observou-se expressão significativamente menor do gene CYP19A1 em CC de mulheres inférteis com endometriose I/II ($0,56 \pm 0,17$) quando comparadas às controles ($0,15 \pm 0,04$) ($p = 0,043$).

Conclusões: A menor expressão do gene CYP19A1 em CC de mulheres inférteis com endometriose pélvica em estágios iniciais pode mediar a piora da qualidade oocitária, abrindo novas perspectivas no entendimento da etiopatogênese da infertilidade relacionada à doença.

© 2013 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Publicado por Elsevier Editora Ltda.

Este é um artigo Open Access sob a licença de [CC BY-NC-ND](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

[☆] Trabalho realizado no Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

^{*} Autor para correspondência.

E-mail: ionarabarcelos@hotmail.com (I.D.E.S. Barcelos).

Infertile women with minimal and mild endometriosis submitted to controlled ovarian stimulation present lower expression of the gene CYP19A1 in cumulus cells

ABSTRACT

Keywords:

Aromatase
CYP19A1 gene
Endometriosis
Oocyte quality
Cumulus cells

Objective: Lower pregnancy rate in women with endometriosis submitted to assisted reproductive techniques might be related to poor oocyte quality. The analysis of the expression of the genes in cumulus cells (CC) might provide biomarkers that can predict gamete quality. The main objective of the present study was to compare the levels of the expression of the gene CYP19A1 in CC of infertile women with minimal and mild (I/II) endometriosis and infertile controls.

Method: There were selected patients with infertility caused by initial pelvic endometriosis and by male/tubal factor (control group), submitted to controlled ovarian stimulation to ICSI. Immediately after the oocyte retrieval, CC were isolated and stored. Quantification of the expression of the gene CYP19A1 in CC was performed using PCR-real time.

Results: CC were isolated from 23 infertile women with endometriosis I/II and 41 from control. Significant lower expression of the gene CYP19A1 in CC was observed in infertile women with endometriosis I/II (0.56 ± 0.17) when compared to control (0.15 ± 0.04) ($p = 0,043$).

Conclusions: The lower expression of the gene CYP19A1 in CC of infertile women with pelvic endometriosis in initial stages might mediate the poor oocyte quality, opening new perspectives on the understanding of the etiopathogenesis of infertility related to the disease.

© 2013 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Published by Elsevier Editora Ltda.

Este é um artigo Open Access sob a licença de [CC BY-NC-ND](#)

Introdução

A endometriose afeta aproximadamente 10 a 15% das mulheres em idade reprodutiva¹ e é associada à subfertilidade. Sua prevalência atinge 40% em mulheres com subfertilidade e aproximadamente 30 a 50% das portadoras de endometriose são inférteis.² Entretanto, os mecanismos envolvidos na etiopatogênese da infertilidade em pacientes com endometriose ainda não foram completamente elucidados, sobretudo nos estágios iniciais (doença mínima e leve), em que não se observam alterações na anatomia pélvica.^{3,4}

Alguns estudos têm evidenciado redução da fecundidade natural em mulheres inférteis com endometriose pélvica em estágios iniciais quando comparadas a mulheres férteis, com melhora significativa da fecundidade natural após a exérese e ablação cirúrgica das lesões,⁵⁻⁷ evidenciando o papel da endometriose, mesmo em estágios iniciais, na fertilidade destas pacientes.

Novas abordagens para o tratamento da infertilidade relacionada à endometriose se tornaram disponíveis, com ênfase na utilização cada vez mais frequente das técnicas de reprodução assistida (TRA). Alguns estudos têm sugerido a ocorrência de menores taxas de implantação e gestação em portadoras de endometriose pélvica em estágios iniciais submetidas à estimulação ovariana para a realização de procedimentos de reprodução assistida de alta complexidade,^{8,9} o que poderia ser secundário, pelo menos parcialmente, à piora da qualidade oocitária.^{10,11}

Todavia, a doação de óocitos humanos maduros para pesquisas utilizando metodologias invasivas que impossibilitam a utilização subsequente dos mesmos nos procedimentos de reprodução assistida é incomum, de modo que há escassez de estudos avaliando a qualidade oocitária humana.

Desta forma, persiste a dúvida sobre a ocorrência ou não de comprometimento da qualidade oocitária relacionada à endometriose. Neste contexto, a identificação de biomarcadores não invasivos, passíveis de predição da competência oocitária, é bastante desejável. Estudos demonstram que células da granulosa e células do cumulus podem ser marcadores de viabilidade de óocitos e embriões.^{12,13}

A aromatase (codificada pelo gene CYP19A1), enzima envolvida na conversão da androstenediona e testosterona em estrona e estradiol, respectivamente, está presente nas células da granulosa e exerce papel fundamental na maturação folicular e no estabelecimento da qualidade oocitária.¹³⁻¹⁶ Alguns autores evidenciaram, em modelo de cultivo celular, uma redução da atividade da aromatase em células da granulosa de mulheres inférteis com endometriose.¹⁷ Outros observaram redução de transcritos do gene CYP19A1 em células da granulosa luteinizadas murais cultivadas in vitro.^{18,19}

Todavia, até o presente, nenhum estudo avaliou a expressão do gene CYP19A1 em células do cumulus (CC) de mulheres inférteis com endometriose pélvica em estágios iniciais, cuja desregulação poderia estar relacionada à piora da qualidade oocitária, conseqüentemente, na etiopatogênese da infertilidade associada à doença, estimulando a realização do presente estudo.

O objetivo deste estudo foi comparar os níveis de transcritos do gene CYP19A1 em CC de mulheres inférteis com endometriose I/II e controles inférteis submetidos à estimulação ovariana para a realização de injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI).

Método

Realizou-se um estudo transversal prospectivo, submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das

Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP).

Pacientes

Foram incluídos no presente estudo, consecutivamente, todos os casais submetidos à estimulação ovariana para a realização de injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) junto ao Setor de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) no período de fevereiro de 2009 a outubro de 2010. Deste grupo, foram selecionados os que preencheram os critérios de elegibilidade abaixo descritos e manifestaram o desejo de participar do projeto, mediante a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

O Grupo Endometriose I/II foi constituído por 23 pacientes inférteis cujo procedimento de reprodução assistida foi indicado pela presença exclusivamente de endometriose inicial, diagnosticada por meio de videolaparoscopia e confirmação histológica das lesões, segundo os critérios definidos pela American Society for Reproductive Medicine.²⁰ O Grupo Controle foi constituído por 41 pacientes inférteis cujo procedimento foi indicado devido à presença exclusiva de fator masculino e/ou fator tubário.

Foram excluídas pacientes com idade ≥ 38 anos, índice de massa corpórea ≥ 30 kg/m², FSH basal ≥ 10 mUI/mL, tabagistas, etilistas, portadoras de doenças como diabetes mellitus ou quaisquer outras endocrinopatias, doença cardiovascular, dislipidemia, lupus eritematoso sistêmico e outras doenças reumatológicas, qualquer infecção ativa, hidrossalpinge e uso de medicamentos que pudessem interferir na foliculogênese ovariana nos três meses que antecederam o início da estimulação ovariana, como anti-inflamatórios não esteroidais e corticosteroides.

Estimulação ovariana e suporte de fase lútea

A estimulação ovariana seguiu o protocolo do setor, que consiste em bloqueio hipofisário com análogo do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRHa) iniciado 10 dias antes do dia de realização da ultrassonografia transvaginal (USTV) basal (protocolo longo), no período vespertino, por meio da administração de acetato de leuprolide (Lupron®, Abbott, Brasil) na dose de 0,5 mg/dia (10 UI), por via subcutânea, mantida durante todo o período de estimulação ovariana controlada até o dia da administração da gonadotrofina coriônica humana (hCG) (Ovidrel®, Serono, Brasil).

A hiperestimulação ovariana controlada foi iniciada, preferencialmente, entre o segundo e o quarto dia do ciclo menstrual. As pacientes receberam 200 a 300 UI por dia de FSH recombinante (FSHr) (Gonal-F®, Serono, Brasil; Puregon®, Organon, Brasil) nos primeiros 6 dias da indução. A partir do sétimo dia da indução da ovulação, a dose foi ajustada de acordo com o crescimento folicular e a espessura endometrial, monitorados com USTV diariamente ou em dias alternados. Quando pelo menos dois folículos atingiram 18 mm de diâmetro médio, foram administrados 250 µg de hCG recombinante (Ovidrel®, Serono, Brasil) às 22 horas. A captação dos oócitos

foi realizada 34 a 36 horas após a administração do hCG recombinante.

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

Captação oocitária

A aspiração dos folículos foi realizada por via endovaginal guiada por transdutor ultrassonográfico transvaginal acoplado à agulha de punção. No presente estudo foi coletado o fluido folicular e foram obtidas CC apenas do primeiro folículo aspirado, individualmente, em tudo sem meio de cultura, do primeiro ovário punccionado. Os demais folículos foram aspirados continuamente formando um pool de fluido, seguindo o protocolo assistencial do serviço.

Após uma lavagem cuidadosa, os complexos cummulus oophorus (COCs) identificados foram colocados em placas NUNC (Multidish 4 well Nuclon, Delta SI) preenchidas com meio de cultura com fluido de tuba humano-HEPES (HTF, Irvine Scientific) suplementado com 10% de soro sintético substituto (SSS, Irvine Scientific), coberto com óleo mineral (Sigma-Aldrich), e incubado na estufa na presença de CO₂ à 5% a 37 °C e 95% de umidade por um período de 2 a 3 horas. Após esse período, os oócitos foram desnudados através da exposição dos COCs a hialuronidase (H4272 type IV-S, Sigma; 80 IU/mL) por 30 segundos e as células do cumulus foram mecanicamente removidas em HTF-SSS através de uma pipeta (130 µm - Denuding Pipette, Cook).

Amostras obtidas

Células do cumulus

Imediatamente após a identificação do complexo cummulus oophorus do primeiro folículo aspirado do primeiro ovário punccionado (com diâmetro maior ou igual a 15 mm), as células do cumulus foram separadas do oócito através de microdissecção com a utilização de duas agulhas de insulina, colocadas no criotubo e imediatamente em seguida, congeladas em nitrogênio líquido até a utilização para a extração do RNA.

Extração de RNA total e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído das células do cummulus oophorus com o reagente TRIzol (Invitrogen Life Technologies, Paisley, Reino Unido) de acordo com as instruções do fabricante. Após o tratamento das amostras com DNase I (Sigma), a integridade do RNA foi confirmada pela presença das bandas ribossomais 28S e 18S quando analisadas por eletroforese em gel de agarose 1%. As concentrações de RNA total foram determinadas no espectrofotômetro NanoDrop (2000c, Thermo Scientific, EUA) à densidade óptica de 260 nm. O RNA permaneceu armazenado à -80 °C até os procedimentos posteriores.

Um micrograma de RNA total de cada amostra foi transcrito reversamente usando primers randômicos do kit High Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido) segundo as instruções do fabricante. A reação foi realizada no

termociclador PIKO Thermal Cycler, (Finnzymes) na ciclagem de 10 minutos a 25 °C, 37 °C por 2 horas, 85 °C por 5 minutos, 4 °C por 5 minutos.

Quantificação por PCR em tempo real

A quantificação relativa da expressão dos genes analisados foi realizada no aparelho ABI PRISM™ 7500 FAST (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido). As reações foram executadas utilizando o sistema TaqMan® Gene Expression Assays (TaqMan® MGB probes, FAM™ dye-labeled) da Applied Biosystems. Os assay IDs das sondas usadas foram: GAPDH Hs 99999905.m1, ACTB Hs 99999903.m1 (genes de referência) e CYP19A1 Hs 00240671.m1. A PCR em tempo real foi realizada para cada amostra em triplicata seguindo as seguintes condições: 10 µL do TaqMan® Universal PCR Master Mix (2x) (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido), 1 µL do TaqMan® Gene Expression Assay Mix (20X) (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido), e 9 µL de cDNA diluído (1:25) em volume final de 20 µL reação. As condições da reação foram 50 °C por 2 minutos, então 95 °C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto.

A quantificação relativa (RQ) para os genes analisados foi calculada para cada amostra de acordo com o método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (ou 2^{-Ct}).²¹ Um pool de cDNA contendo iguais quantidades das amostras do grupo controle foi usado como amostra calibradora. Os genes GAPDH e ACTB (genes de referência) foram usados para normalizar as reações.

Análise estatística

Os dados foram analisados considerando cada paciente como unidade experimental do estudo. Os grupos endometriose I/II e controle foram analisados de forma comparativa. As análises estatísticas foram realizadas no software SAS 2003 (2002-2003, SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). A variável expressão gênica foi transformada pelo \log_{10} . A transformação logarítmica foi necessária, pois não foi atendida uma das suposições (linearidade) feitas em análises empregando-se os modelos lineares. Estas análises especificam que a média condicional $E\{y|2x = x_0\}$ da variável resposta y dado o valor x_0 do vetor preditor x é linear em x_0 . A aplicação dos modelos lineares pode ser estendida supondo-se que uma transformação apropriada da variável resposta dada por $t(y)$, em que $E\{t(y)|2x\}$, seja linear em x na função $t(y) = b_0 + b^T x + e$ para b_0 e b^T desconhecidos. O termo e (erro aleatório) é independente de x e tem média zero.²² Utilizou-se o teste Tukey pelo PROC GLM para comparar as médias de expressão do gene CYP19A1 entre os grupos controle e endometriose.

Resultados

Foram isoladas CC de 23 mulheres inférteis com endometriose I/II e de 41 controles. Observou-se expressão significativamente menor do gene CYP19A1 em CC de mulheres inférteis com endometriose I/II ($0,56 \pm 0,17$) quando comparadas às controles ($0,15 \pm 0,04$) ($p = 0,043$) (tabela 1).

Tabela 1 – Expressão gênica de CYP19A1 de células do cumulus de pacientes controle inférteis e pacientes com endometriose I/II submetidas a estimulação ovariana para ICSI

	n	CYP19A1	
		Média	Desvio padrão
Controle	41	0,5569332	0,1659951
Endometriose I/II	23	0,1502222	0,0404223

Discussão

Os mecanismos envolvidos na etiopatogênese da infertilidade em pacientes com endometriose ainda não foram completamente identificados.^{3,4} Resultados conflitantes de alguns estudos têm sugerido piora dos resultados de procedimentos de reprodução assistida em mulheres inférteis com endometriose pélvica,^{8,9,23} que poderia ser decorrente do comprometimento da qualidade oocitária.^{10,11}

Sabe-se da comunicação bidirecional entre oócitos e células do cumulus oophorus, que ocorre durante todo o processo de desenvolvimento folicular,²⁴⁻²⁹ e que isso é essencial para a aquisição de competência para desenvolvimento adequado dos oócitos de mamíferos.³⁰⁻³² Além disso, sabemos do importante papel das células da granulosa no processo de diferenciação folicular que leva a condições ótimas para o desenvolvimento oocitário, ovulação, fertilização e subsequente implantação.³³

Alguns dados sugerem que as CC podem ser utilizadas como biomarcadores da qualidade oocitária.³⁴⁻³⁹ Desta forma, a análise da expressão de genes envolvidos na aquisição da competência oocitária nas CC de oócitos humanos maduros pode ser utilizada com a finalidade de avaliação não invasiva da qualidade oocitária e preditor de resultados de procedimentos de reprodução assistida.^{13,34-36,40-42}

Pela primeira vez na literatura, evidenciamos redução significativa da expressão do gene CYP19A1 em CC de pacientes inférteis com endometriose I/II quando comparadas às inférteis controles. Dados acerca da expressão do gene CYP19A1 em células da granulosa humanas são escassos e controversos.^{18,19} Abreu et al. (2011)¹⁸ não demonstraram diferença entre a expressão do RNAm da aromatase em células da granulosa de mulheres inférteis com e sem endometriose submetidas a estimulação ovariana para TRA. Todavia, os referidos autores não analisaram separadamente os estágios iniciais da doença e as células analisadas foram obtidas a partir da centrifugação do fluido folicular obtido durante a captação oocitária. Embora a maioria das células analisadas sejam células granulosas murais, o fluido folicular pode conter algumas células do cumulus, células sanguíneas e eventualmente algumas células estromais ou da teca, de modo que os dados obtidos por Abreu et al. (2011)¹⁸ não podem ser comparados diretamente aos obtidos no presente estudo.

Por outro lado, outro estudo evidenciou produção reduzida de estradiol e menor expressão de RNAm da aromatase P450 em células da granulosa de mulheres inférteis com endometriose,¹⁹ sem individualização dos estágios da doença, cultivadas in vitro. Entretanto, como não dispomos de dados comparando expressão de RNAm da aromatase P450 entre

células da granulosa murais e CC em humanos, não é possível comparar os dados obtidos dos dois estudos previamente citados com os do presente estudo.

Sabe-se que a qualidade oocitária resulta de um complexo e sincronizado processo que tem duração de vários meses, desde a fase de folículo primordial até a fase de folículo pré-ovulatório.⁴³ Está bem estabelecido que as células da granulosa têm um papel fundamental no processo de diferenciação folicular criando condições ideais para o desenvolvimento oocitário, a ovulação e a fertilização.³³ Dessa forma, a qualidade embrionária parece depender fundamentalmente da maturação folicular final, produzindo um ócito com capacidade de levar a uma gravidez viável.

Nossa compreensão sobre mudanças específicas na expressão gênica das células foliculares durante o crescimento folicular de animais e humanos está longe de se concluir. Entretanto, há evidência de que a aromatase P450 (codificada pelo gene CYP19A1) é estimulada pelo FSH e expressa em concentrações elevadas em folículos dominantes.⁴⁴ Portanto, níveis de expressão mais elevados dessa enzima parecem estar relacionados à indução hormonal (FSH e LH), produção de hormônios esteroides (estrogênio e progesterona) e a mecanismos de dominância folicular.¹³

Nesse contexto, Hamel et al. (2008),¹³ por meio da análise de células foliculares, tanto granulosa murais quanto cumulus, obtidas de folículos aspirados individualmente de pacientes submetidas a FIV, demonstrou maior expressão do gene CYP19A1 em células foliculares provenientes de folículos cujo ócito fertilizado resultou em gravidez. Esses autores sugeriram que a maior expressão desse gene em células foliculares poderia ser usada como biomarcador de qualidade e competência embrionária.

Desta forma, sugerimos que a redução da expressão do gene CYP19A1 em CC de pacientes inférteis com endometriose pélvica em estágios iniciais pode favorecer o comprometimento da qualidade oocitária, participando da patogênese da infertilidade relacionada à doença.

Financiamento

FAPESP (Processo 2008/58197-6) e CNPq (Processo 474858/2009-0).

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

1. Donnez J, Van Langendonck A, Casanas-Roux F, Van Gossum JP, Pirard C, Jadoul P, et al. Current thinking on the pathogenesis of endometriosis. *Gynecol Obstet Invest.* 2002;54 Suppl 1:52-8.
2. Holoch KJ, Lessey BA. Endometriosis and infertility. *Clin Obstet Gynecol.* 2010;53:429-38.
3. De Ziegler D, Borghese B, Chapron C. Endometriosis and infertility: pathophysiology and management. *Lancet.* 2010;376:730-8. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60490-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60490-4), 28.
4. Burney RO, Giudice LC. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertil Steril.* 2012;98:511-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.06.029>.
5. Parazzini F. Ablation of lesions or no treatment in minimal-mild endometriosis in infertile women: a randomized trial. Gruppo Italiano per lo Studio dell'Endometriosi. *Hum Reprod.* 1999;14:1332-4. <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/14.5.1332>.
6. Bérubé S, Marcoux S, Langevin M, Maheux R. Fecundity of infertile women with minimal or mild endometriosis and women with unexplained infertility. The Canadian Collaborative Group on Endometriosis. *Fertil Steril.* 1998;69:1034-41.
7. Marcoux S, Maheux R, Bérubé S, Canadian Collaborative Group on Endometriosis. Laparoscopic surgery in infertile women with minimal or mild endometriosis. *N Engl J Med.* 1997;337:217-22. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199707243370401>.
8. Barnhart K, Dungs Moor-Su R, Coutifaris C. Effect of endometriosis on in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2002;77:1148-55.
9. Al-Fadhli R, Kelly SM, Tulandi T, Tanr SL. Effects of different stages of endometriosis on the outcome of in vitro fertilization. *J Obstet Gynaecol Can.* 2006;28:888-91.
10. Simón C, Gutiérrez A, Vidal A, de los Santos MJ, Tarín JJ, Remohí J, et al. Outcome of patients with endometriosis in assisted reproduction: results from in-vitro fertilization and oocyte donation. *Hum Reprod.* 1994;9:725-9.
11. Díaz I, Navarro J, Blasco L, Simón C, Pellicer A, Remohí J. Impact of stage III-IV endometriosis on recipients of sibling oocytes: matched case-control study. *Fertil Steril.* 2000;74:31-4.
12. Cetica PD, Pintos LN, Dalvit GC, Beconi MT. Antioxidant enzyme activity and oxidative stress in bovine oocyte in vitro maturation. *IUBMB Life.* 2001;51:57-64. <http://dx.doi.org/10.1080/15216540119253>.
13. Hamel M, Dufort I, Robert C, Gravel C, Leveille MC, Leader A, et al. Identification of differentially expressed markers in human follicular cells associated with competent oocytes. *Hum Reprod.* 2008;23:1118-27. <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/den048>.
14. Erickson GF, Garzo VG, Magoffin DA. Insulin-like growth factor-I regulates aromatase activity in human granulosa and granulosa luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 1989 Oct;69:716-24. <http://dx.doi.org/10.1210/jcem-69-4-716>.
15. Foldesi I, Breckwoldt M, Neulen J. Oestradiol production by luteinized human granulosa cells: evidence of the stimulatory action of recombinant human follicle stimulating hormone. *Hum Reprod.* 1998;13:1455-60. <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/13.6.1455>.
16. Speroff L, Fritz MA. Regulation of the Menstrual Cycle. In: Speroff L, Fritz MA, editors. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility.* 7 ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p. 187-231.
17. Harlow CR, Cahill DJ, Maile LA, Talbot WM, Mears J, Wardle PG, et al. Reduced preovulatory granulosa cell steroidogenesis in women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81:426-9. <http://dx.doi.org/10.1210/jc.81.1.426>.
18. Abreu LG, Silveira VS, Scrideli CA, Ramos ES, Reis RM, Ferriani RA, et al. Endometriosis does not alter aromatase gene expression (CYP19A1) in mural lutein-granulosa cells of women undergoing assisted reproduction techniques - a pilot study. *Journal of Endometriosis.* 2011;3:177-82.
19. Lu X, Wu Y, Gao XH, Wang YW, Wang L, Sun XX. Effect of letrozole on estradiol production and P450 aromatase messenger RNA expression of cultured luteinized granulosa

- cells from women with and without endometriosis. *Fertil Steril*. 2012;98:131-5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.03.055>.
20. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril*. 1997;67(5):817-21.[No authors listed].
 21. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25:402-8. <http://dx.doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
 22. Cook RD, Weisberg S. *An Introduction to Regression Graphics*. Hoboken NJ: John Wiley; 1994.
 23. Lin XN, Wei ML, Tong XM, Xu WH, Zhou F, Huang QX, et al. Outcome of in vitro fertilization in endometriosis-associated infertility: a 5-year database cohort study. *Chin Med J (Engl)*. 2012;125:2688-93.
 24. Buccione R, Schroeder AC, Eppig JJ. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biol Reprod*. 1990;43:543-7. <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod43.4.543>.
 25. Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola FL. The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:2890-4. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.052658699>, 5.
 26. Senbon S, Hirao Y, Miyano T. Interactions between the oocyte and surrounding somatic cells in follicular development: lessons from in vitro culture. *J Reprod Dev*. 2003;49:259-69. <http://dx.doi.org/10.1262/jrd.49.259>
 27. Gilchrist RB, Ritter LJ, Armstrong DT. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim Reprod Sci*. 2004;82-83:431-46.
 28. Makabe S, Naguro T, Stallone T. Oocyte-follicle cell interactions during ovarian follicle development, as seen by high resolution scanning and transmission electron microscopy in humans. *Microsc Res Tech*. 2006;69:436-49. <http://dx.doi.org/10.1002/jemt.20303>.
 29. Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*. 2006;65:126-36, 7.
 30. de Loos FA, Bevers MM, Dieleman SJ, Kruip TA. Morphology of preovulatory bovine follicles as related to oocyte maturation. *Theriogenology*. 1991;35:527-35.
 31. Webb RJ, Bains H, Cruttwell C, Carroll J. Gap-junctional communication in mouse cumulus-oocyte complexes: implications for the mechanism of meiotic maturation. *Reproduction*. 2002;123:41-52. <http://dx.doi.org/10.1530/rep.0.1230041>.
 32. Fair T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim Reprod Sci*. 2003;78:203-16, 15.
 33. Adashi EY. *Endocrinology of the ovary*. *Hum Reprod*. 1994;9:815-27.
 34. Assou S, Anahory T, Pantescio V, Le Carrour1 T, Pellestor F, Klein B, et al. The human cumulus-oocyte complex gene-expression profile. *Hum Reprod*. 2006;21:1705-19. <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/del065>.
 35. Assou S, Haouzi D, Mahmoud K, Aouacheria A, Guillemin Y, Pantescio V, et al. A non-invasive test for assessing embryo potential by gene expression profiles of human cumulus cells: a proof of concept study. *Mol Hum Reprod*. 2008;14:711-9. <http://dx.doi.org/10.1093/molehr/gan067>.
 36. Assou S, Haouzi D, De Vos J, Hamamah S. Human cumulus cells as biomarkers for embryo and pregnancy outcomes. *Mol Hum Reprod*. 2010;16:531-8. <http://dx.doi.org/10.1093/molehr/gaq032>.
 37. Gasca S, Pellestor F, Assou S, Loup V, Anahory T, Dechaud H, et al. Identifying new human oocyte marker genes: a microarray approach. *Reprod Biomed Online*. 2007;14:175-83.
 38. Ouandaogo ZG, Haouzi D, Assou S, Dechaud H, Kadoch IJ, De Vos J, et al. Human cumulus cells molecular signature in relation to oocyte nuclear maturity stage. *PLoS One*. 2011;6:e27179. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0027179>.
 39. Ouandaogo ZG, Frydman N, Hesters L, Assou S, Haouzi D, Dechaud H, et al. Differences in transcriptomic profiles of human cumulus cells isolated from oocytes at GV, MI and MII stages after in vivo and in vitro oocyte maturation. *Hum Reprod*. 2012;27:2438-47. <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/des172>.
 40. Hamamah S, Matha V, Berthenet C, Anahory T, Loup V, Dechaud H, et al. Comparative protein expression profiling in human cumulus cells in relation to oocyte fertilization and ovarian stimulation protocol. *Reprod Biomed Online*. 2006;13:807-14.
 41. Tesfaye D, Ghanem N, Carter F, Fair T, Sirard MA, Hoelker M, et al. Gene expression profile of cumulus cells derived from cumulus-oocyte complexes matured either in vivo or in vitro. *Reprod Fertil Dev*. 2009;21:451-61. <http://dx.doi.org/10.1071/RD08190>
 42. Haouzi D, Hamamah S. Pertinence of Apoptosis Markers for the Improvement of In Vitro Fertilization (IVF). *Curr Med Chem*. 2009;16:1905-16. <http://dx.doi.org/10.2174/092986709788186075>.
 43. Ola SI, Sun QY. Factors Influencing the Biochemical Markers for Predicting Mammalian Oocyte Quality. *J Reprod Dev*. 2012;58:385-92. <http://dx.doi.org/10.1262/jrd.11-084H>
 44. Sisco B, Hagemann LJ, Shelling AN, Pfeffer PL. Isolation of genes differentially expressed in dominant and subordinate bovine follicles. *Endocrinology*. 2003;144:3904-13. <http://dx.doi.org/10.1210/en.2003-0485>.