UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**O fluido peritoneal de mulheres inférteis com endometriose mínima/leve compromete o
fuso meiótico de oócitos bovinos em metáfase II**

Bruna Talita Gazeto Melo Jianini

RIBEIRÃO PRETO

2015

Bruna Talita Gazeto Melo Jianini

**O fluido peritoneal de mulheres inférteis com endometriose mínima/leve compromete o
fuso meiótico de oócitos bovinos em metáfase II**

Dissertação apresentada ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia

Orientador (a): Professora Doutora Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro

RIBEIRÃO PRETO

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Jianini, Bruna Talita Gazeto Melo.

O fluido peritoneal de mulheres inférteis com endometriose mínima/leve compromete o fuso meiótico de oócitos bovinos em metáfase II/Bruna Talita Gazeto Melo Jianini; Ribeirão Preto, 2015.

102 p. il: 30cm.

Dissertação para título de Mestre apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia.

Orientadora: Navarro, Paula Andrea de Albuquerque Salles.

1. Infertilidade feminina. 2. Endometriose mínima e leve. 3. Fluido peritoneal. 4. Qualidade oocitária. 5. Fuso meiótico.

Folha de aprovação

Bruna Talita Gazeto Melo Jianini

O fluido peritoneal de mulheres inférteis com endometriose mínima/leve compromete o fuso meiótico de oócitos bovinos em metáfase II

Dissertação apresentada ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia

Orientador (a): Professora Doutora Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Fernando Marcos dos Reis

Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais

Assinatura:

Profa. Dra. Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

Assinatura:

Profa. Dra. Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

Assinatura:

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Elias e Mara, as pessoas mais importantes da minha vida. Obrigada pela confiança e apoio em todas as minhas escolhas e decisões.

Esta vitória é para vocês.

Agradecimientos

Agradeço primeiramente a DEUS, por ter me dado a permissão de chegar até aqui e por toda a força concedida na concretização deste sonho. Além disso, agradeço a Ele por todas as pessoas que cruzaram meu caminho e que estão aqui citadas, todas muitíssimo importantes e especiais.

Aos meus pais, Elias e Mara, por terem sonhado junto comigo. Vocês se sacrificaram, se dedicaram, e abdicaram de muitos projetos pessoais para que eu tivesse a oportunidade de ter uma boa formação profissional, e também pessoal. Eu devo tudo que sou a vocês dois, e se hoje sinto orgulho de mim e do lugar onde cheguei, é porque sei que vocês vieram segurando a minha mão. Agradeço pela vida que me deram, pelo amor, pelo carinho, pela paciência, pelo apoio, pela confiança e por serem os melhores pais do mundo. Sem vocês, eu nada seria. Eu amo muito vocês.

Ao meu irmão, Guilherme, pela amizade, pelas conversas e pelas privações que muitas vezes teve que passar para que eu pudesse chegar até aqui. Eu amo você.

Aos meus avós, Fidel e Aparecida, que sempre ajudaram na minha educação e contribuíram para que eu fosse a pessoa que sou hoje. Obrigada pelo carinho, pela confiança, pelas conversas, pelos conselhos e pelas orações poderosas nos momentos mais difíceis.

Ao meus padrinhos, Cláudio e Naide, pela hospitalidade durante esses anos e por fazerem com que eu me sentisse sempre muito confortável. Obrigada por me acolherem, por me apoiarem e por terem me considerado mesmo como uma filha. Nunca poderei agradecer o suficiente.

Aos meus primos queridos, Bruno e Leonardo, por todo carinho, amizade, companheirismo, cumplicidade e cuidado como se fossemos irmãos. Obrigada pelas infinitas conversas, inúmeros conselhos, incansáveis festas, enfim, por todos os momentos.

Ao meu melhor amigo e namorado, Francisco Sergi, que sempre me incentivou e confiou que eu seria capaz. Você sempre esteve ao meu lado, me colocando para cima e me fazendo acreditar que posso mais do que imagino. Agradeço pelo amor, carinho, dedicação, apoio, incentivo, paciência e atenção que, mesmo distante, foram essenciais para que eu concluísse este trabalho. Eu amo você.

À minha querida orientadora, Profa. Dra. Paula Navarro, por ter acreditado em mim desde sempre. Obrigada pela oportunidade, pela dedicação, pelos ensinamentos, pela paciência, pela atenção, pela amizade e preocupações sempre a mim dedicadas. Nada

seria possível sem você. Fica aqui minha imensa gratidão, meu respeito, minha admiração e meu carinho por você.

A meus colegas de pós graduação, Aline, Carlos, Caroline M., Caroline P., Catiele, Cristiana, Daiane B., Daiana P., Gislaine, Iara, Jacira, Juliana, Liliane, Lisandra, Luciene, Marina, Michele, Thalita, Thaís, Valéria, Vanessa e Viviane pelo acolhimento e companheirismo nesta jornada. Obrigada por fazerem parte de uma etapa muito importante e especial da minha vida. Cada uma de vocês tem um lugar guardado no meu coração.

Separadamente, gostaria de agradecer as minhas amigas e companheiras de projeto Michele e Vanessa. Obrigada pela recepção, pelos treinamentos, pelas orientações, pela ajuda e dedicação neste trabalho, pela amizade, pelas conversas e por todos os momentos de apoio. E também à querida Juliana Meola, por ter sido para mim um exemplo de pessoa verdadeira, confiável, generosa, amiga, além de grande profissional. Obrigada pela receptividade, amizade, sinceridade, atenção e carinho desde sempre.

Ao meu querido amigo Rafael Zanetti, a primeira pessoa que me incentivou a prestar o processo seletivo do mestrado. Obrigada pela amizade de sempre, pelo incentivo, pela sinceridade, pelas conversas, pelos conselhos e pelas risadas, que não foram poucas. Serei eternamente grata a você.

À minha querida e melhor amiga Mariani Bálsamo, por tudo e mais um pouco. Agradeço pelos anos de amizade verdadeira, por estar sempre ao meu lado vibrando com as minhas vitórias, e por tornar minha vida muito mais divertida. Muito mais do que uma amiga, uma irmã.

Ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia – FMRP-USP, pelo suporte oferecido à realização deste trabalho.

Às funcionárias do Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia – Setor de Reprodução Humana – FMRP-USP, que, direta ou indiretamente, contribuíram com este projeto. Em especial, à Cristiana Padovan, obrigada pela ajuda, pelas conversas, pelo apoio e acolhimento.

Às secretárias Ilza e Suelen, por todo auxílio prestado desde o início.

Ao Prof. Dr. Júlio César Rosa e Silva, pela colaboração na coleta dos materiais. Agradeço também a todos os médicos, enfermeiros, e auxiliares do centro cirúrgico do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto que ajudaram nesta coleta.

Ao Laboratório Multiusuário Confocal da FMRP-USP, pela disponibilização do microscópio para realização das leituras das lâminas. Agradeço em particular, a Bete Milani, que proporcionou todo o apoio e ensinamento técnico para a utilização do microscópio.

À Profa. Dra. Cláudia CP de Paz, pela prestividade, dedicação e paciência durante o auxílio estatístico.

À todos os funcionários do Frigorífico Barra Mansa – Sertãozinho e ao Ricardo, pela ajuda e comprometimento com a coleta de ovários bovinos.

Ao órgão de fomento CAPES, pela auxílio financeiro concedido, que permitiu que eu me dedicasse, integralmente, ao longo de todo o mestrado, à minha pesquisa.

A Profa. Dra. Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva e ao Prof. Dr. Fernando Marcos dos Reis, pela disponibilidade em participar da banca examinadora e pelas valiosas contribuições para este trabalho.

Por último, mas não menos importante, agradeço à todas as pacientes que concordaram em participar deste trabalho, e que mesmo em um momento de sofrimento, tiveram paciência e não se opuseram a oferecer uma contribuição para a pesquisa. Obrigada pela confiança.

A todos que torceram por mim e que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, meu sincero agradecimento.

Resumo

JIANINI, B.T.G.M. O fluido peritoneal de mulheres inférteis com endometriose mínima/leve compromete o fuso meiótico de oócitos bovinos em metáfase II. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Os mecanismos etiopatogênicos da infertilidade relacionada à endometriose não estão bem elucidados, especialmente em mulheres com estágios iniciais da doença (mínima e leve), em que não são observadas alterações anatômicas expressivas na cavidade pélvica. Questionamos a possibilidade de haver alterações no microambiente peritoneal de mulheres inférteis com endometriose que poderiam afetar a aquisição da competência oocitária e dessa forma, comprometer a fertilidade natural dessas mulheres. Para ser competente, o oócito precisa estar maduro e ter um fuso meiótico morfológicamente normal e funcional, garantindo a fidelidade da segregação cromossômica durante as divisões da meiose. Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi comparar o potencial impacto de diferentes concentrações (1% e 10%) de fluido peritoneal (FP) de mulheres férteis sem endometriose e mulheres inférteis com endometriose mínima e leve (EI/II) sobre a integridade do fuso celular e alinhamento cromossômico de oócitos bovinos maturados *in vitro*. Realizou-se um estudo experimental, onde amostras de FP foram obtidas de 12 mulheres (6 mulheres férteis sem endometriose e 6 mulheres inférteis com endometriose mínima e leve) submetidas a videolaparoscopia, respectivamente, para realização de laqueadura tubária e investigação de infertilidade. Oócitos bovinos imaturos foram submetidos a maturação *in vitro* (MIV) na ausência de FP, na presença de 1% e 10% de FP de mulheres férteis sem endometriose e na presença de 1% e 10% de FP de mulheres inférteis com EI/II. Foram realizados 6 experimentos de MIV e cada amostra de FP foi utilizada em apenas um experimento. Os oócitos foram fixados, marcados por imunofluorescência e então analisados por microscopia confocal. A porcentagem de oócitos meioticamente normais foi significativamente maior nos oócitos submetidos a MIV na ausência de FP (88.46%) e na presença de 1% (78.57%) e 10% (84.62%) de FP de mulheres férteis sem endometriose do que aqueles oócitos submetidos a MIV na presença de 1% (62.50%) e 10% (56.25%) de FP de mulheres inférteis com EI/II. Além disso, no grupo endometriose, a porcentagem de oócitos meioticamente normais foi significativamente maior nos oócitos submetidos a MIV na presença de 1% (62.50%) do que na presença de 10% (56.25%) de FP, sugerindo um efeito dose-dependente do FP de mulheres com endometriose na ocorrência de danos meióticos oocitários. Demonstrou-se que o FP de mulheres inférteis com EI/II comprometeu a maturação nuclear oocitária durante a MIV, de modo dose-dependente, promovendo anormalidades meióticas em oócitos em metáfase II. Nossos resultados contribuem para a compreensão dos mecanismos etiopatogênicos da infertilidade relacionada à EI/II e abrem perspectivas para o estudo de novas abordagens terapêuticas visando melhorar a fertilidade natural destas pacientes.

Palavra-chave: infertilidade feminina; endometriose mínima e leve; fluido peritoneal; qualidade oocitária; fuso meiótico.

Abstract

JIANINI, B.T.G.M. Peritoneal fluid from infertile women with minimal/mild endometriosis compromises the meiotic spindle of metaphase II bovine oocytes. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

The etiopathogenic mechanisms of endometriosis-related infertility are not well elucidated, especially in women with early stages of the disease (minimal and mild endometriosis), where significant anatomical abnormalities in the pelvic cavity are not observed. We question if alterations in the peritoneal microenvironment of infertile women with endometriosis might affect oocyte competence acquisition and in this way, compromise the natural fertility in these women. To be competent, the oocyte must be mature and have a morphologically normal and functional meiotic spindle, which ensure the fidelity of chromosome segregation during the divisions of meiosis. Thus, the aim of the present study was to compare the potencial impact of different concentrations (1% and 10%) of peritoneal fluid (PF) from fertile women without endometriosis and infertile women with minimal and mild endometriosis (EI/II) on spindle integrity and chromosomes alignment of bovine oocytes *in vitro* matured (IVM). We performed an experimental study, where PF samples were obtained from 12 women (six fertile women without endometriosis and six infertile women with minimal and mild endometriosis) submitted to laparoscopy, respectively for tubal ligation and investigation of infertility. Immature bovine oocytes were submitted to IVM in the absence of PF, in the presence of 1% and 10% PF from fertile women without endometriosis and in the presence of 1% and 10% PF from infertile women with EI/II. We performed 6 experiments of IVM and each PF sample was used in only one experiment. The oocytes were fixed, immunofluorescence staining and then, analyzed by confocal microscopy. The percentage of meiotically normal oocytes was significantly higher for oocytes that underwent IVM in the absence of PF (88.46%) and in the presence of 1% (78.57%) and 10% (84.62%) PF from fertile women without endometriosis than for oocytes that underwent IVM in the presence of 1% (62.50%) and 10% (56.25%) PF from infertile women with EI/II. Furthermore, in the endometriosis group, the percentage of meiotically normal oocytes was significantly higher for oocytes that underwent IVM in the presence of 1% (62.50%) than in the presence of 10% (56.25%) PF, suggesting a dose-dependent effect of PF from women with endometriosis on the occurrence of meiotic oocyte damage. The study have demonstrated that PF from infertile women with EI/II compromised the oocyte nuclear maturation during the IVM, in a dose-dependent manner, promoting meiotic abnormalities in metaphase II oocytes. Our results contribute to a better understanding of the etiopathogenic mechanisms of infertility related to EI/II and open perspectives in the design of new therapeutic approaches to improve the natural fertility of these infertile women.

Key words: female infertility; minimal and mild endometriosis; peritoneal fluid; oocyte quality; meiotic spindle.

Lista de figuras

Figura 1 – Esquema de preparo das diluições a fim de manter a concentração adequada de suplementação ao meio TCM após a adição de fluido peritoneal.....41

Figura 2 – Imagens de microscopia confocal de oócitos bovinos maturados *in vitro* na ausência de fluido peritoneal (No-FP), na presença de fluido peritoneal de mulheres férteis sem endometriose (C-PF) ou de mulheres inférteis com endometriose mínima e leve (EI/II-FP). (A) Oócito em metáfase II em visão sagital (analisável). (B) Oócito em metáfase II em visão polar (não analisável). Verde: fuso marcado com anticorpo anti- β -tubulina e anticorpo secundário conjugado com isotiocianato de fluoresceína; azul: cromossomos marcados com Hoechst 33342. Barra de escala = 5 μ m.....44

Figura 3 – Imagens de microscopia confocal de oócitos bovinos maturados *in vitro* na ausência de fluido peritoneal (No-FP), na presença de fluido peritoneal de mulheres férteis sem endometriose (C-FP) ou de mulheres inférteis com endometriose mínima e leve (EI/II-FP). (A) Oócito em MII normal mostrando cromossomos alinhados adequadamente na região central de um fuso meiótico em forma de barril. (B) Oócito em MII anormal com cromossomos desalinhados e fuso normal em forma de barril. (C) Oócito em MII anormal com cromossomos alinhados e fuso anormal (dimensão longitudinal reduzida). (D) Oócito em MII anormal com cromossomos desalinhados e fuso anormal. Verde: fuso marcado com anticorpo anti- β -tubulina e anticorpo secundário conjugado com isotiocianato de fluoresceína; azul: cromossomos marcados com Hoechst 33342. Barra de escala = 5 μ m.....45

Lista de tabelas

Tabela 1 – Estágios de maturação nuclear e porcentagem de oócitos em metáfase II normais e anormais maturados em meio sem adição de fluido peritoneal (No-FP), e com duas diferentes concentrações de fluido peritoneal de mulheres férteis sem endometriose (C-FP) e com endometriose mínima e leve (EI/II-FP).....50

Lista de abreviaturas

AP	Ativação partenogenética
ASRM	Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva
<i>CAT</i>	Catalase
CO ₂	Dióxido de carbono
COC	Complexo cumulus-oócito
CP	Corpúsculo polar
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTT	Ditiotreitol
EI/II	Endometriose mínima e leve
EIII/IV	Endometriose moderada e grave
EO	Estresse oxidativa
FITC	Fluorocromo isotiocianato
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FP	Fluido peritoneal
FSH	Hormônio folículo estimulante
<i>GSR</i>	Glutathione redutase
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IMC	Índice de massa corpórea
LH	Hormônio luteinizante
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MI	Metáfase I
MII	Metáfase II
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
MTSB XF	Fixador tampão estabilizador de microtúbulos

NaCl	Cloreto de sódio
NaN ₃	Azida sódica
PBS	Tampão fosfato-salino
SBE	Sociedade Brasileira de Endometriose e Ginecologia Minimamente Invasiva
SBF	Soro bovino fetal
SEM	Média $\pm$ erro padrão da média
TFM	Taxa de fecundidade mensal
TI	Telófase I
TNF	Fator de necrose tumoral
UI	Unidade internacional
USP	Universidade de São Paulo

Sumário

1. Introdução.....	24
2. Justificativa.....	31
3. Objetivos.....	34
4. Materiais e Métodos.....	36
4.1. Seleção de pacientes.....	37
4.2. Coleta e processamento do fluido peritoneal.....	38
4.3. Coleta de oócitos bovinos.....	38
4.4. Maturação <i>in vitro</i>	39
4.5. Fixação dos oócitos.....	41
4.6. Imunofluorescência.....	41
4.7. Classificação oocitária baseada na morfologia do fuso meiótico e no alinhamento cromossômico por microscopia confocal.....	42
4.8. Análise estatística.....	43
5. Resultados.....	46
6. Discussão.....	50
7. Conclusões.....	56
8. Referências Bibliográficas.....	58
 Anexos.....	 64
Anexo 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	65
Anexo 2 – Manuscrito.....	71

1. Introdução

A endometriose é considerada uma doença ginecológica comum, benigna, estrógeno dependente (MINICI et al., 2008), caracterizada pela presença de tecido endometrial (glândulas e/ou estroma) fora da cavidade uterina (GUPTA et al., 2006; FOURQUET et al., 2010). O principal local acometido pela doença é a cavidade pélvica, sendo mais comumente encontrada nos ovários, trompas de Falópio, fundo do saco de Douglas, intestino e bexiga (MACER E TAYLOR, 2012; ACIÉN E VELASCO, 2013). Alguns sintomas são característicos da endometriose, como dor pélvica, dismenorréia, dispareunia, irregularidade menstrual e infertilidade (MINICI et al., 2008), entretanto essa afecção pode apresentar-se, incompreensivelmente, de forma assintomática em algumas mulheres (20-25%) (BULLETTI et al., 2010). Estudos têm mostrado que os sintomas associados a endometriose causam um impacto negativo sobre diferentes aspectos na vida dessas mulheres (FOURQUET et al., 2010; MORADI et al., 2014). Além do sofrimento físico causado pelos diversos sintomas, a doença causa um impacto profundo e negativo na vida das mulheres, alterando seu rendimento profissional, sua relação familiar e afetiva, reduzindo sua qualidade de vida e principalmente sua auto-estima (LORENÇATTO et al., 2007). Além disso, em países desenvolvidos, a endometriose está entre as principais causas de hospitalização ginecológica, gerando altas taxas de internações hospitalares e procedimentos cirúrgicos (FOURQUET et al., 2010; SPIGOLON et al., 2012). Dessa forma, tanto pelo seu impacto físico, social e emocional sobre as mulheres (FOURQUET et al., 2010; MORADI et al., 2014), como pelo seu impacto sócio-econômico devido aos custos no diagnóstico e tratamento, esta doença pode ser considerada um problema atual de saúde pública (SIGNORILE; BALDI, 2010) e merece maior importância.

A endometriose é uma doença feminina. Estima-se que a doença esteja presente em 10-15% das mulheres em idade reprodutiva (AUGOULEA et al., 2012; MACER E TAYLOR, 2012). De acordo com Associação Brasileira de Endometriose e Ginecologia Minimamente

Invasiva (SBE), a doença afeta cerca de 176 milhões de mulheres no mundo, sendo 6 milhões apenas no Brasil (Sociedade Brasileira de Endometriose e Ginecologia Minimamente Invasiva). Nos últimos anos, o número de casos de mulheres com a doença vem aumentando possivelmente em razão do estilo de vida da mulher moderna (SOUZA et al., 2009). Atualmente, as mulheres assumiram uma dupla jornada de trabalho, ficando muitas vezes expostas a uma má alimentação e altos níveis de estresse, condições essas que podem prejudicar o funcionamento do sistema imunológico deixando-as susceptíveis ao aparecimento de novas doenças (SOUZA et al., 2009). Essa nova rotina das mulheres leva ainda ao adiamento da maternidade e menos filhos, expondo-as a um maior número de ciclos menstruais, o que pode contribuir para o aparecimento da endometriose (ABRÃO et al., 2007; SOUZA et al., 2009).

A Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (ASRM) classifica a endometriose em 4 estágios (I-mínima, II-leve, III-moderada e IV-grave), conforme a gravidade da doença. Essa classificação leva em conta a localização, extensão e profundidade dos implantes endometrióticos; presença e severidade de aderências; e ainda a presença de endometriomas. Endometriose mínima e leve (EI/II) são caracterizadas por implantes endometrióticos isolados e superficiais, sem a presença de aderências significativas, enquanto que endometriose moderada e grave (EIII/IV) são caracterizadas por múltiplos implantes endometrióticos superficiais e profundos, com presença de aderências densas e firmes e presença de endometriomas (Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996, 1997).

A endometriose têm sido muito associada a infertilidade (GUPTA et al., 2008; BULLETTI et al., 2010) e esta condição, segundo um consenso da ASRM, é definida como a falência de um casal em idade reprodutiva de conceber uma gravidez depois de no mínimo 12 meses de coito regular, sem contracepção (MEDICINE, 2013). A literatura afirma que a taxa

de fecundidade mensal (TFM) de casais normais varia entre 0,15 a 0,20, enquanto que a TFM de casais com endometriose varia entre 0,02 a 0,10 (BULLETTI et al., 2010; MACER E TAYLOR, 2012). Epidemiologicamente, a incidência da endometriose em mulheres inférteis gira em torno de 25-50% e a incidência da infertilidade em mulheres com a doença gira em torno de 30-50% (BULLETTI et al., 2010; MACER E TAYLOR, 2012).

Apesar de estudos apoiarem o conceito de diminuição de fecundidade em mulheres portadoras de endometriose (GARRIDO et al., 2002; BULLETTI et al., 2010) e muitos mecanismos tenham sido propostos para explicar a presença da infertilidade nessas mulheres, a relação entre a doença e infertilidade ainda não está clara (GUPTA et al., 2008). Nos estágios avançados na doença (endometriose moderada e grave), essa relação tem sido associada as aderências pélvicas severas, que causam uma diversidade de alterações anatômicas no trato reprodutivo e dessa forma podem atrapalhar a captura e transporte do óvulo. No entanto, nos estágios iniciais da doença (endometriose mínima e leve), essa relação não é muito visível, uma vez que as aderências pélvicas não são suficientemente severas para causar alterações anatômicas expressivas (CARVALHO et al., 2012). Diante disso, poderia-se conferir maior atenção à endometriose mínima e leve a fim de desvendar os mecanismos pelos quais esta poderia comprometer a fecundidade natural, o que propiciaria o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento da infertilidade.

Um estudo canadense avaliou a probabilidade de gestação de mulheres inférteis com EI/II após a realização da laparoscopia com ou sem tratamento cirúrgico das lesões endometrióticas e concluiu que aquelas mulheres submetidas a laparoscopia com remoção das lesões tiveram uma melhora significativa em sua fertilidade natural, quando comparadas àquelas que foram submetidas apenas a laparoscopia, sem remoção das lesões (MARCOUX et al., 1997). Esses achados confrontam com os achados de um estudo italiano que não conseguiu demonstrar qualquer benefício significativo da remoção das lesões endometrióticas

na melhora da fertilidade natural de mulheres inférteis com EI/II (PARAZZINI et al., 1999). No entanto, apesar de resultados conflitantes entre os estudos, as taxas de fecundidade de mulheres inférteis com EI/II continuam sendo menores (0,019 e 0,024) quando comparadas as de mulheres férteis normais (0,15 a 0,20) (MARCOUX et al., 1997; PARAZZINI et al., 1999;). Além disso, outro estudo evidenciou que a probabilidade de gestação natural de mulheres inférteis com EI/II é significativamente menor quando comparadas a de mulheres inférteis sem causa aparente, durante um período de 3 anos (36% versus 55%, respectivamente), sugerindo que a endometriose mesmo em estágios iniciais, tem relação com a infertilidade (AKANDE et al., 2004).

Até o momento, os mecanismos responsáveis pela diminuição da fertilidade em mulheres com EI/II ainda são muito controversos e cheios de incertezas. No entanto, é provável que os efeitos da doença não sejam apenas devido a alterações da anatomia pélvica normal, mas decorrentes de um efeito negativo direto sobre o desenvolvimento do folículo, do oócito, do embrião (BARNHART et al., 2002) e também de defeitos endometriais (BRIZED et al., 1995; PELLICER et al., 1995; KUMBARK et al., 2008).

De acordo com um pequeno estudo que avaliou resultados de fertilização *in vitro* (FIV) em programas de ovoduação, as taxas de gravidez são semelhantes em mulheres com endometriose e mulheres com outra causa de infertilidade submetidas a FIV com oócito de doadoras sem a doença, sugerindo um papel importante da qualidade oocitária na infertilidade apresentada por essas mulheres (SIMÓN et al., 1994; GARRIDO et al., 2000; PELLICER et al., 2001).

A qualidade oocitária depende de uma adequada aquisição da maturação citoplasmática e nuclear (FERREIRA et al., 2009), sendo que a última dependente da presença de um fuso celular normal. O fuso celular meiótico de oócitos em metáfase II (MII) é uma estrutura temporária e dinâmica, em forma de barril, composta por microtúbulos

formados por dímeros de tubulina que se polimerizam e despolimerizam nos diversos estágios do ciclo celular, sendo relevante para assegurar a segregação cromossômica durante o processo meiótico (CHOI et al., 2007; BARCELOS et al., 2008, 2009). O fuso é bastante sensível a ações de diversos fatores, entre eles o estresse oxidativo (EO) (HU et al., 2001; EICHENLAUB-RITTER et al., 2002; MULLEN et al., 2004), capaz de causar anomalias meióticas, instabilidade cromossômica, indução de apoptose e comprometimento do desenvolvimento embrionário pré-implantação (NAVARRO et al., 2004, 2006).

Alguns autores têm associado a endometriose ao EO (AGARWAL et al., 2003; SZCZEPANSKA et al., 2003; GUPTA et al., 2008), estando sua origem possivelmente relacionada a uma resposta inflamatória aos implantes endometriais ectópicos (MURPHY et al., 1998). Esses implantes ectópicos causariam a liberação de citocinas inflamatórias e ativação de macrófagos, levando a produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio. O aumento nessa produção, provocaria um maior consumo de antioxidantes pelo nosso organismo na tentativa de manterem os níveis de espécies reativas dentro dos limites fisiológicos. No entanto, quando ocorre uma alteração no balanço oxidante/antioxidante do nosso organismo, seja por maior produção e/ou inadequação da capacidade antioxidante, é estabelecido o EO (ANDRADE et al., 2010), podendo este estar envolvido na etiopatogênese da infertilidade relacionada à endometriose (CAMPOS PETEAN et al., 2008; GUPTA et al., 2008; ANDRADE et al., 2010; PRIETO et al., 2012).

O fluido peritoneal (FP) é uma solução encontrada na cavidade vesicouterina ou *cul-de-sac* e banha toda a cavidade pélvica, útero, trompas de Falópio e ovário (BEDAIWY; FALCONE, 2003), podendo refletir o status oxidativo deste microambiente. Acredita-se que o FP seja o principal fator de controle do microambiente peritoneal que influencia o desenvolvimento e progressão da endometriose (HARADA et al., 2001). Diferentes estudos avaliando os níveis de constituintes do fluido peritoneal, apontam a existência de alterações

em mulheres com a doença (GUPTA et al., 2008; BEDAIWY; FALCONE, 2003). Segundo Bulletti et al (2010), mulheres com endometriose possuem um maior volume de FP, com altas concentrações de macrófagos ativados, prostaglandinas, interleucina-1, fator de necrose tumoral (TNF) e proteases (BULLETTI et al., 2010). Além disso, estudos também evidenciam a presença de EO no FP de mulheres com endometriose (AUGOULEA et al., 2012; GUPTA et al., 2008), inclusive nos estágios iniciais da doença (MIER-CABRERA et al., 2011).

Estudo de Mansour et al (2009, 2010) demonstraram que o FP de mulheres com endometriose promove anomalias nos microtúbulos e cromossomos de oócitos maduros de camundongos, e estas foram reduzidas por meio da suplementação no meio de cultivo com L-carnitina, um antioxidante, sugerindo que substâncias presentes no FP de mulheres com a doença promovem comprometimento da qualidade oocitária e subsequente qualidade embrionária, tendo o EO como provável mediador (MANSOUR et al., 2009, 2010). No entanto, Mansour et al (2009, 2010) avaliaram exclusivamente o impacto do FP de mulheres com endometriose sobre os oócitos maduros, não investigando seu potencial impacto sobre a foliculogênese e/ou maturação oocitária (MANSOUR et al., 2009, 2010).

Considerando que os ovários humanos estão em íntimo contato com o FP, supomos que possa haver influência do mesmo sobre os oócitos, não apenas após a ovulação, mas também durante todo o processo de foliculogênese e/ou maturação oocitária. Até o presente, nenhum estudo avaliou o efeito do FP de mulheres inférteis com EI/II durante a foliculogênese, investigando seu papel na maturação e qualidade oocitária.

2. Justificativa

A endometriose é uma doença caracterizada pela presença de tecido endometrial (glândulas e/ou estroma) fora da cavidade uterina (GUPTA et al., 2006; FOURQUET et al., 2010). Estima-se que a doença esteja presente em 10-15% das mulheres em idade reprodutiva (AUGOULEA et al., 2012; MACER E TAYLOR, 2012). Entre suas manifestações clínicas mais freqüentes, destaca-se a infertilidade, presente em 30 a 50% das suas portadoras (BULLETTI et al., 2010; MACER E TAYLOR, 2012).

Apesar de muitos mecanismos terem sido propostos para explicar a presença da infertilidade em mulheres com endometriose, a relação entre a doença e infertilidade ainda não está clara (GUPTA et al., 2008), especialmente nos estágios iniciais da doença, em que não são observadas alterações anatômicas expressivas (CARVALHO et al., 2012).

Alguns autores têm associado a endometriose ao EO (AGARWAL et al., 2003; SZCZEPANSKA et al., 2003; GUPTA et al., 2008), sendo este capaz de causar anomalias meióticas oocitárias (NAVARRO et al., 2004, 2006). Nesse sentido, estudos têm evidenciado um aumento de marcadores inflamatórios e de EO no FP de mulheres com endometriose (AUGOULEA et al., 2012; GUPTA et al., 2008), inclusive nos estágios iniciais da doença (MIER-CABRERA et al., 2011).

Questiona-se se a piora da qualidade oocitária seja um dos principais fatores relacionados à infertilidade nestas mulheres (BARCELOS et al., 2009; DA BROI et al., 2014; GIORGI et al., 2015). Todavia, diante do número reduzido de oócitos humanos disponíveis para a pesquisa, a experimentação com animais torna-se relevante para a investigação dos mecanismos etiopatogênicos da infertilidade relacionada à endometriose. O modelo experimental bovino neste estudo se justifica pela similaridade no tamanho e morfologia dos ovários humano e bovino, por ambas as espécies serem monovulatórias e policíclicas e por ser um material abundante, barato, e de fácil manipulação (MALHI et al., 2005).

Embora haja estudos evidenciando um potencial papel deletério do FP de mulheres

com endometriose sobre a qualidade oocitária de oócitos maduros de camundongos (MANSOUR et al., 2009, 2010), não encontramos até o momento nenhum estudo que tenha avaliado o potencial impacto do FP de mulheres inférteis com EI/II durante a foliculogênese, investigando seu papel na maturação e qualidade oocitária.

O fluido peritoneal (FP) é uma solução encontrada na cavidade vesicouterina ou *cul-de-sac* e banha toda a cavidade pélvica, útero, trompas de Falópio e ovário (BEDAIWY; FALCONE, 2003), podendo refletir o status oxidativo deste microambiente. Considerando que os ovários humanos estão em íntimo contato com o FP, supomos que possa haver influência do mesmo sobre os oócitos, não apenas após a ovulação, mas também durante todo o processo de foliculogênese e/ou maturação oocitária.

A observação de maior incidência de anomalias meióticas em oócitos submetidos a maturação *in vitro* (MIV) com FP de mulheres inférteis com EI/II poderia contribuir com a elucidação dos mecanismos envolvidos na etiopatogênese da infertilidade relacionada a estes estágios da doença.

3. Objetivos

Comparar o potencial impacto das concentrações 1% e 10% de fluido peritoneal de mulheres férteis sem endometriose e de mulheres inférteis com endometriose mínima/leve sobre o grau de maturidade nuclear e a integridade do fuso celular e distribuição cromossômica de oócitos bovinos maturados *in vitro* dentro de cada grupo (controle e endometriose mínima/leve).

Comparar o potencial impacto das concentrações 1% e 10% de fluido peritoneal de mulheres férteis sem endometriose e de mulheres inférteis com endometriose mínima/leve sobre o grau de maturidade nuclear e a integridade do fuso celular e distribuição cromossômica de oócitos bovinos maturados *in vitro* entre os grupos sem fluido peritoneal, controle e endometriose mínima/leve.

4. Materiais e métodos

Realizou-se um estudo experimental junto ao Setor de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas, FMRP-USP (protocolo 12201/2008), e pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal, FMRP-USP (protocolo 169/2008).

Entre 2008 e 2010, amostras de FP foram obtidas de mulheres submetidas à videolaparoscopia no setor de Reprodução Humana, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, FMRP-USP. Entre 2009 e 2011 foram realizados os experimentos de MIV, e em seguida os oócitos foram fixados para subsequente realização da imunofluorescência.

As pacientes que preencheram os critérios de elegibilidade e manifestaram o desejo de participar do projeto, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1) previamente à inclusão no estudo.

4.1. Seleção de pacientes

O grupo endometriose consistiu em mulheres com infertilidade associada exclusivamente a presença de EI/II [com ciclo ovulatório normal, presença de permeabilidade tubária e parceiros com parâmetros seminais normais (COOPER et al., 2009)]; essas mulheres foram submetidas à videolaparoscopia para investigação da infertilidade, diagnosticadas e classificadas de acordo com os critérios da Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (1997), por um cirurgião experiente. O grupo controle consistiu em mulheres férteis sem endometriose; essas mulheres foram submetidas a videolaparoscopia para a realização de laqueadura tubária.

Os critérios de não elegibilidade foram: idade ≥ 38 anos, índice de massa corpórea (IMC) ≥ 30 kg/m², concentração sérica do hormônio folículo estimulante (FSH) no terceiro dia do ciclo menstrual ≥ 10 mUI/mL; anovulação crônica, presença de hidrossalpinge ou de

doenças crônicas (tais como *diabetes mellitus* ou qualquer outra endocrinopatia), doença cardiovascular, dislipidemia, lúpus eritematoso sistêmico ou qualquer outra doença reumatológica, infecção pelo vírus HIV ou qualquer infecção ativa, tabagismo e uso de vitaminas, medicações hormonais ou antiinflamatórios hormonais ou não hormonais durante os 6 meses anteriores à inclusão neste estudo. Os critérios de não elegibilidade visaram evitar como fatores de confusão situações relacionadas ao EO e/ou à piora da qualidade oocitária.

Não houve diferença significativa entre os grupos controle e endometriose em relação a média de idade (30.6 ± 1.43 e 29.0 ± 1.31 anos, respectivamente) ou IMC (23.9 ± 0.90 e 24.4 ± 0.73 kg/m², respectivamente). Os dados foram apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (SEM).

4.2. Coleta e processamento do fluido peritoneal

As amostras de FP de cada doadora foram obtidas durante a realização da videolaparoscopia para investigação de infertilidade ou realização de laqueadura tubária. Cada amostra foi coletada em tubo estéril individual, sem a presença de meio de cultura, a partir do fundo de saco posterior sob visualização direta para evitar contaminação com sangue (amostras com contaminação sanguínea foram excluídas do estudo). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 300 g por 10 minutos para separar as células remanescentes, e o sobrenadante foi estocado a -80°C, em tubo individual, para uso futuro.

4.3. Coleta dos oócitos bovinos

Ovários bovinos foram coletados logo após o abate em frigorífico local e transportados em um recipiente térmico contendo solução fisiológica (0,9% NaCl) a 35-38,5°C. No laboratório, os ovários foram borrifados com álcool 70%, lavados em solução fisiológica pré-aquecida à 38,5°C contendo 0,05 g/L de sulfato de estreptomicina e mantidos nesta mesma

solução, em banho-maria, até o final da aspiração dos complexos *cumulus*-oócito (COCs). Os COCs imaturos foram aspirados de folículos com tamanho entre 2 mm a 8 mm de diâmetro, utilizando-se agulhas de 18 mm acopladas a seringas de 10 mL e o conteúdo foi depositado em um cálice cônico estéril mantido a 38,5°C. Após o término da aspiração dos folículos, o conteúdo aspirado permaneceu em repouso durante 10 minutos para deposição dos COCs.

Após a sedimentação, os COCs foram selecionados sob estereomicroscópio em placas de Petri de 100 mm contendo o meio de lavagem Talp Hepes (Invitrogen, Gibco Laboratories Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA). Para o cultivo *in vitro*, somente os COCs morfológicamente saudáveis, ou seja, com citoplasma homogêneo e com pelo menos três camadas de células do *cumulus oophorus*, foram selecionados (ADONA; LEAL, 2004; FERREIRA et al., 2009).

4.4. Maturação *in vitro*

O meio de MIV utilizado foi o TCM-199 contendo sais de Earle e bicarbonato (Invitrogen, Gibco Laboratories Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA), suplementado com 0,4 mM de piruvato de sódio, 0,5 µg/mL de gentamicina, 5 µg/mL de FSH, 5 mg/mL de LH, 1 µg/mL de estradiol e 10% de soro bovino fetal (SBF) (FCS; Gibco) (FERREIRA et al., 2009).

Imediatamente após a seleção, os COCs foram randomicamente divididos em cinco diferentes condições de cultivo: na ausência de FP (No-FP); na presença de 1% e 10% de fluido peritoneal de pacientes controle (C-FP); e na presença de 1% e 10% de fluido peritoneal de pacientes com EI/II (EI/II-FP). A fim de manter a concentração adequada de suplementação ao meio TCM após a adição de fluido FP, eliminando-se, assim, o efeito da diluição dos suplementos, optou-se por preparar um TCM 10% mais concentrado, ao qual, de acordo com cada diluição, foi adicionado FP e/ou meio TCM puro, conforme esquema

apresentado na figura 1.

O cultivo foi realizado em gotas de 400 μL de meio (aproximadamente, 20 oócitos por gota), a 38,5°C, 95% de umidade e 5% de CO_2 em ar (HASHIMOTO et al., 2002; ADONA; LEAL, 2004; FERREIRA et al., 2009) por um período de 22-24 horas, em placas NUNC® de 4 poços, em um sistema de cultivo sem óleo mineral.

Foram realizadas seis replicatas, cada uma com os cinco grupos descritos acima (No-FP, 1% C-FP, 10% C-FP, 1% EI/II-FP and 10% EI/II-FP) utilizando as duas concentrações de FP de pacientes férteis sem endometriose e de pacientes inférteis com EI/II. Cada amostra de FP foi utilizada em apenas uma replicata.

Figura 1 – Esquema de preparo das diluições a fim de manter a concentração adequada de suplementação ao meio TCM após a adição de fluido peritoneal.

4.5. Fixação dos oócitos

Após a MIV, os oócitos foram desnudados (separados das células do *cummulus oophurus*) mecanicamente por pipetagem, em meio tamponado Talp Hepes, utilizando placas de vidro escavadas. Ocorrido o desnudamento, os oócitos foram colocados em uma solução fixadora MTSB XF, composta por 1X de Tampão Estabilizador (0,1M de Pipes, 5mM de $MgCl_2$ e 2,5mM de EGTA), 50% de Óxido de Deutério, 0,01% de Aprotinina de pulmão bovino, 1 mM de DTT, 1 μ M de Taxol, 0,5% de Triton-X, 2% de Formaldeído e água de MilliQ, aquecida previamente por 30 minutos em estufa à 38,5°C, e deixados por mais 30 minutos em estufa à 38,5°C para estabilização de microtúbulos (LIU; JU; YANG, 1998; FERREIRA et al., 2009). Após isso, os oócitos permaneceram nesta solução a 4°C até o processamento da imunofluorescência e confecção das lâminas.

4.6. Imunofluorescência

Os oócitos previamente fixados foram lavados extensivamente em meio de lavagem tampão fosfato (PBS suplementado com 0,02% NaN_3 , 0,01% Triton X-100, 0,2% leite seco sem gordura, 2% soro de cabra, 2% de albumina sérica bovina e 0,1 M de glicina) e bloqueados durante uma noite (*overnight*) a 4°C. Passado esse período, foram incubados *overnight* a 4°C com anticorpo monoclonal murino anti- β -tubulina (diluição 1:1000). Após nova lavagem, os oócitos foram incubados com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (diluição 1:500, Zymed Laboratories, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) a 38,5°C por 2h. Os oócitos foram novamente submetidos a mais uma lavagem e, então, foram marcados com Hoechst 33342 (10 mg/mL), em meio de montagem Vectashield (H-1000, Vector, Burlingame, CA, EUA), à temperatura ambiente, sobre uma lâmina de vidro coberta por uma lamínula.

As lâminas foram estocadas a 4°C até a observação em microscópio confocal de alta performance (Confocal Leica TCS SP5, Leica Microsystems, Mannheim, Alemanha) utilizando aumento óptico de 40X e os lasers Diodo 405 UV e HeNe 543. O intervalo máximo entre a confecção das lâminas e a leitura das mesmas foram de 10 dias.

4.7. Classificação oocitária baseada na morfologia do fuso meiótico e no alinhamento cromossômico por microscopia confocal

Os oócitos foram classificados de acordo com o estágio de maturação nuclear em que se encontravam: metáfase I (MI), telófase I (TI), metáfase II (MII), ou ativados partenogeneticamente (AP – caracterizada pela extrusão espontânea de um segundo CP sem ter ocorrido fertilização). Oócitos em MII foram subdivididos em analisáveis e não analisáveis. Oócitos foram considerados analisáveis quando o fuso meiótico era visualizado em uma posição lateral ou sagital (Figura IA), permitindo uma avaliação global do fuso e do arranjo cromossômico, e considerados não analisáveis quando o fuso era visualizado em uma posição polar (Figura IB) (JU et al., 2005), impedindo uma avaliação global do fuso e apenas permitindo uma visão do arranjo cromossômico. Na posição polar, embora os cromossomos possam estar alinhados, o fuso oocitário não é observado, e assim, o mesmo pode estar anormal (LIU et al., 2013; DA BROU et al., 2014). Dessa forma, para evitar subestimar o número de oócitos anormais, os oócitos em posição polar foram excluídos da análise.

Oócitos considerados como analisáveis foram ainda classificados como normais quando apresentaram fuso meiótico em forma de barril com microtúbulos organizados de um polo a outro, cromossomos alinhados na placa metafásica no equador do fuso e presença de um corpúsculo polar (Figura IIA) (CP); ou considerados como anormais quando apresentaram fuso meiótico alterado (dimensão longitudinal reduzida, microtúbulos desorganizados ou

ausentes) e/ou configuração cromossômica alterada (dispersos ou deslocados do plano da placa metafásica) (Figura IIB-D).

4.8. Análise estatística

Os dados foram analisados usando modelo linear generalizado (PROC GENMOD) pelo software SAS 2003 (2002–2003, SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA). A Distribuição de Poisson foi utilizada para as variáveis de contagem (número total de oócitos fixados, número de oócitos em MI, TI, MII e AP) e a distribuição gama para as porcentagens (porcentagem de oócitos normais e anormais em MII). Os grupos foram comparados utilizando o Teste X^2 , com o nível de significância em $P < 0.01$.

Figura 2 – Imagens de microscopia confocal de oócitos bovinos maturados *in vitro* na ausência de fluido peritoneal (No-FP), na presença de FP de mulheres férteis sem endometriose (C-PF) ou de mulheres inférteis com endometriose mínima e leve (EI/II-FP). **(A)** Oócito em metáfase II em visão sagital (analisável). **(B)** Oócito em metáfase II em visão polar (não analisável). Verde: fuso marcado com anticorpo anti- β -tubulina e anticorpo secundário conjugado com isotiocianato de fluoresceína; azul: cromossomos marcados com Hoechst 33342. Barra de escala = 5 μ m.

Figura 3 – Imagens de microscopia confocal de oócitos bovinos maturados *in vitro* na ausência de fluido peritoneal (No-FP), presença de FP de mulheres férteis sem endometriose (C-FP) ou de mulheres inférteis com endometriose mínima e leve (EI/II-FP). (A) Oócito em MII normal mostrando cromossomos alinhados adequadamente na região central de um fuso meiótico em forma de barril. (B) Oócito em MII anormal com cromossomos desalinhados e fuso normal em forma de barril. (C) Oócito em MII anormal com cromossomos alinhados e fuso anormal (dimensão longitudinal reduzida). (D) Oócito em MII anormal com cromossomos desalinhados e fuso anormal. Verde: fuso marcado com anticorpo anti- β -tubulina e anticorpo secundário conjugado com isotiocianato de fluoresceína; azul: cromossomos marcados com Hoechst 33342. Barra de escala = 5 μ m.

5. Resultados

Um total de 241 oócitos foram visualizados por microscopia confocal [35 oócitos estavam em MI (14,52%), 2 em TI (0,83%), 200 em MII (82,99%) e 4 sofreram AP (1,66%)]. Dos 200 oócitos em MII, 112 foram considerados analisáveis (visão sagital ou lateral) e 88 foram considerados não analisáveis (visão polar) (Tabela I).

No grupo sem fluido peritoneal (No-FP), um total de 48 oócitos foram avaliados; 41 (85,42%) estavam em MII e destes, 26 (63,41%) foram considerados analisáveis. Dos oócitos em MII analisáveis, 23 (88,46%) foram considerados normais e 3 (11,54%) anormais (Tabela I). Dentre os oócitos anormais, 1 (33,33%) apresentou apenas fuso anormal, e 2 (66,67%) apresentaram tanto fuso anormal como desalinhamento cromossômico.

No grupo controle com concentração de 1% de FP, um total de 57 oócitos foram avaliados; 44 (77,19%) estavam em MII e destes, 28 (63,63%) foram considerados analisáveis. Dos oócitos em MII analisáveis, 22 (78,57%) foram considerados normais e 6 (21,43%) anormais (Tabela I). Dentre os oócitos anormais, 3 (50,00%) apresentaram apenas fuso anormal, e 3 (50,00%) apresentaram tanto fuso anormal como desalinhamento cromossômico.

No grupo controle com concentração de 10% de FP, um total de 63 oócitos foram avaliados; 55 (87,30%) estavam em MII e destes, 26 (47,27%) foram considerados analisáveis. Dos oócitos em MII analisáveis, 22 (84,62%) foram considerados normais e 4 (15,38%) anormais (Tabela I). Dentre os oócitos anormais, 3 (75,00%) apresentaram apenas fuso anormal, e 1 (25,00%) apresentou apenas desalinhamento cromossômico.

No grupo endometriose com concentração de 1% de FP, um total de 43 oócitos foram avaliados; 35 (81,40%) estavam em MII e destes, 16 (45,71%) foram considerados analisáveis. Dos oócitos em MII analisáveis, 10 (62,50%) foram considerados normais e 6 (37,50%) anormais (Tabela I). Dentre os oócitos anormais, 1 (16,66%) apresentou apenas

fuso anormal, 1 (16,66%) apresentou apenas desalinhamento cromossômico, e 4 (66,68%) apresentaram tanto fuso anormal como desalinhamento cromossômico.

No grupo endometriose com concentração de 10% de FP, um total de 30 oócitos foram avaliados; 25 (83,33%) estavam em MII e destes, 16 (64,00%) foram considerados analisáveis. Dos MII analisáveis, 9 (56,25%) foram considerados normais e 7 (43,75%) anormais (Tabela I). Dentre os oócitos anormais, 1 (14,29%) apresentou apenas fuso anormal, e 6 (85,71%) apresentaram tanto fuso anormal como desalinhamento cromossômico.

A porcentagem de oócitos meioticamente normais foi similar para oócitos submetidos a MIV na ausência de FP (88,46%) assim como para aqueles oócitos submetidos a MIV na presença de 1% (78,57%) e 10% (84,62%) de FP de mulheres férteis (C-FP) (Tabela I).

A porcentagem de oócitos meioticamente normais foi significativamente maior para oócitos submetidos a MIV na ausência de FP (88,46%) e na presença de 1% (78,57%) e 10% (84,62%) de FP de mulheres férteis (C-FP) do que aqueles oócitos submetidos a MIV na presença de 1% (62,50%) e 10% (56,25%) de FP de mulheres inférteis com endometriose mínima e leve (EI/II-FP) (Tabela I).

No grupo controle, a porcentagem de oócitos meioticamente normais foi similar para oócitos submetidos a MIV na presença de 1% (78,57%) e 10% (84,61%) de FP.

No grupo endometriose, a porcentagem de oócitos meioticamente normais foi significativamente maior para oócitos submetidos a MIV na presença de 1% (62,50%) quando na presença 10% (56,25%) de FP.

Tabela I: Estágios de maturação nuclear e porcentagem de oócitos em metáfase II normais e anormais maturados em meio sem adição de fluido peritoneal (No-FP), e com duas diferentes concentrações de fluido peritoneal de mulheres férteis sem endometriose (C-FP) e mulheres inférteis com endometriose mínima e leve (EI/II-FP).

Grupo	Concentração de FP (%)	Número total de oócitos visualizados (n)	MI n (%)	TI n (%)	AP n (%)	MII			
						Número total de MII n (%)	Analísáveis n (%)	Normal n (%)	Anormal n (%)
No-FP	0	48	5 (10,42)	1 (2,08)	1 (2,08)	41 (85,42)	26 (63,41)	23 (88,46) ^a	3 (11,54)
C-FP	1	57	9 (15,79)	1 (1,75)	3 (5,27)	44 (77,19)	28 (63,63)	22 (78,57) ^a	6 (21,43)
	10	63	8 (12,70)	0	0	55 (87,30)	26 (47,27)	22 (84,62) ^a	4 (15,38)
EI/II-FP	1	43	8 (18,60)	0	0	35 (81,40)	16 (45,71)	10 (62,50) ^b	6 (37,50)
	10	30	5 (16,67)	0	0	25 (83,33)	16 (64,00)	9 (56,25) ^c	7 (43,75)

Nota: No-PF, oócitos submetidos a MIV em meio sem adição de FP; C-FP, oócitos submetidos a MIV em meio suplementado com FP de mulheres férteis sem endometriose; EI/II-FP, oócitos submetidos a MIV em meio suplementado com FP de mulheres inférteis com endometriose mínima e leve; Analísáveis, oócitos com fuso fixado em visão sagital ou lateral; MI, metáfase I; TI, telófase I; MII, metáfase II; AP, ativação partenogenética espontânea (extrusão do segundo corpúsculo polar na ausência de fertilização). Dados são resultados de 6 replicatas. Letras diferentes na mesma coluna indicam uma diferença significativa, $P < 0.01$, usando distribuição de Poisson, gama e o teste qui-quadrado.

6. Discussão

A endometriose é uma doença caracterizada pela presença de tecido endometrial (glândulas e/ou estroma) fora da cavidade uterina (GUPTA et al., 2006; FOURQUET et al., 2010). Entre suas manifestações clínicas mais frequentes, destaca-se a infertilidade, presente em 30 a 50% das suas portadoras (BULLETTI et al., 2010; MACER E TAYLOR, 2012). Os mecanismos envolvidos na etiopatogênes da infertilidade relacionada a endometriose, principalmente nos casos de doença mínima e leve, ainda não estão claros (HOLOCH; LESSEY, 2010). Alguns estudos têm apoiado o conceito de diminuição de fecundidade em mulheres portadoras de endometriose (GARRIDO et al., 2002; BULLETTI et al., 2010), sugerindo um papel importante da qualidade oocitária na infertilidade apresentada por essas mulheres (SIMÓN et al., 1994; GARRIDO et al., 2000; PELLICER et al., 2001).

Embora haja trabalhos relatando o efeito do FP de mulheres com endometriose sobre a qualidade oocitária em oócitos maduros (MANSOUR et al., 2009, 2010), não se encontrou nenhum estudo que tenha avaliado o efeito do FP de mulheres inférteis com EI/II durante a foliculogênese, investigando seu papel na maturação e qualidade oocitária. Assim, o objetivo do nosso estudo foi comparar o potencial impacto das concentrações 1% e 10% de FP provenientes de mulheres férteis sem endometriose (grupo controle) e de mulheres inférteis com EI/II na maturação e qualidade oocitária, analisada pela normalidade do fuso celular e a distribuição cromossômica, durante a MIV de oócitos bovinos.

Sabe-se que a MIV, por si só, pode promover aumento significativo da ocorrência de anormalidades meióticas oocitárias (LI et al., 2006). Todavia, a mesma metodologia de MIV foi aplicada para os dois diferentes grupos (mulheres férteis sem endometriose e mulheres inférteis com EI/II), de modo que as diferenças encontradas são decorrentes de diferenças nos constituintes do FP e não devido ao processo de MIV.

De acordo com os resultados do nosso estudo, não foi encontrada diferença significativa no número de oócitos em estágio de MI, TI, AP e MII entre os grupos, o que

demonstra não haver comprometimento da maturação nuclear de oócitos maturados *in vitro* na presença de FP de mulheres inférteis com EI/II.

A porcentagem de oócitos meioticamente normais foi similar para oócitos submetidos a MIV na ausência de FP e na presença de FP de mulheres férteis (1% e 10%), sugerindo que o FP de mulheres férteis nas duas concentrações testadas não compromete a porcentagem de oócitos em metáfase II com fuso meiótico e distribuição cromossômica normais. Este resultado era esperado, uma vez que durante a seleção das pacientes, tivemos o cuidado de excluir fatores possivelmente relacionados ao comprometimento da qualidade oocitária e/ou EO. Estes achados sugerem que as concentrações testadas *a priori* não são suprafisiológicas. Considerando-se que os ovários são banhados pelo FP, mas que os folículos em desenvolvimento não estão em contato íntimo com o fluido durante a foliculogênese, estando protegidos mecanicamente pela túnica albugínea e epitélio germinativo, um dos desafios seria encontrar concentrações do FP de mulheres férteis que não comprometessem a maturação oocitária, bem como sua normalidade, o que pôde ser observado com as duas concentrações testadas (1% e 10%).

No entanto, quando os oócitos foram submetidos a MIV na presença de FP de mulheres inférteis com EI/II (1% e 10%), a porcentagem de oócitos meioticamente normais foi significativamente menor do que aqueles submetidos a MIV na ausência de FP e na presença de FP de mulheres férteis (1% e 10%), sugerindo que o FP de mulheres inférteis com endometriose em estágios iniciais pode promover anomalias meióticas nos oócitos durante o processo de MIV, e assim prejudicar a qualidade oocitária. Em contraste com o grupo controle, no grupo endometriose, a porcentagem de oócitos meioticamente normais foi significativamente maior na concentração de 1% de FP quando comparada com a concentração de 10% de FP, sugerindo um efeito dose-dependente do FP de mulheres com EI/II sobre a ocorrência de danos meióticos oocitários. Uma vez que concentrações menores (abaixo de

1%) não foram testadas, não é possível garantir que 1% seja a concentração mais baixa de FP de mulheres com EI/II capaz de comprometer o fuso meiótico e a distribuição cromossômica durante o processo de MIV.

Nossos resultados corroboram os estudos de Mansour et al (2009, 2010), ao evidenciarmos o impacto deletério do FP de mulheres com endometriose na promoção de anomalias meióticas oocitárias. No entanto, metodologicamente, nosso estudo diferiu do estudo de Mansour et al (2009, 2010) em três aspectos: em nosso trabalho foram incluídas somente pacientes com estágios iniciais da doença, enquanto que Mansour et al (2009, 2010) não descreveram o estágio da endometriose presente nas mulheres incluídas em seus estudos; todas as mulheres com endometriose que fizeram parte do nosso estudo apresentavam infertilidade, enquanto que Mansour et al (2009, 2010) não especificaram se as mulheres com endometriose apresentavam infertilidade; e por último nós avaliamos o efeito do FP de mulheres com endometriose em oócitos maturados *in vitro*, enquanto que Mansour et al (2009, 2010) avaliaram seu efeito apenas em oócitos já maduros, não sendo possível avaliar o impacto do FP de mulheres com endometriose sobre o processo de maturação oocitária.

Marcadores de EO tem sido observados no FP de mulheres inférteis com endometriose (GUPTA et al., 2008; AUGOULEA et al., 2012), inclusive nos estágios iniciais da doença (MIER-CABRERA et al., 2011). Mansour et al (2009, 2010) demonstraram que o FP de mulheres com endometriose promove anomalias meióticas oocitárias, e essas foram reduzidas por meio da suplementação no meio de cultivo com L-carnitina, um antioxidante, sugerindo que substâncias presentes no FP de mulheres com a doença promovem um comprometimento da qualidade oocitária e subsequente qualidade embrionária, tendo o EO como provável mediador (MANSOUR et al., 2009, 2010). Como previamente apontado, o EO é capaz de causar anomalias meióticas, instabilidade cromossômica, indução de apoptose e comprometimento do desenvolvimento embrionário pré-implantação (NAVARRO et al.,

2004, 2006). Considerando que os ovários humanos estão em íntimo contato com o FP, supomos que possa haver influência do mesmo sobre os oócitos, não apenas após a ovulação, mas também durante todo o processo de foliculogênese e/ou maturação oocitária. Dessa forma, hipotetizamos que o mesmo pode refletir o EO presente neste microambiente de mulheres inférteis com endometriose, mesmo que em estágios iniciais.

Reforçando nossa hipótese, um estudo conduzido por nosso grupo, usando modelo experimental bovino, comparou o potencial impacto do FP de mulheres férteis e mulheres inférteis com e sem EI/II sobre a expressão de genes relacionados as principais enzimas antioxidantes em oócitos maturados *in vitro*. O estudo mostrou que o FP de mulheres inférteis com EI/II promove uma redução significativa na expressão dos genes *GSR* e *CAT* em oócitos bovinos, sugerindo um maior consumo dessas enzimas antioxidantes na tentativa de prevenir os danos oocitários durante a MIV (MALVEZZI, 2011).

O atual estudo trouxe contribuições inéditas para o esclarecimento da etiopatogênese da infertilidade relacionada à endometriose em estágios iniciais, no entanto, contamos com algumas limitações. Uma delas foi a utilização de oócitos bovinos. Optamos por utilizar este modelo animal devido a similaridade em tamanho e morfologia dos ovários humanos e bovinos, e também porque ambas as espécies são mono-ovulatórias e policíclicas. Além disso, oócitos bovinos são abundantes, apresentam baixo custo e são facilmente manipulados (MALHI et al., 2005). Estudos com modelos animais podem não necessariamente ser extrapolados para os seres humanos e estudos com oócitos de mulheres inférteis com EI/II maturados *in vivo* são importantes para confirmar nossos resultados. No entanto, considerando o número reduzido de oócitos humanos destinados à pesquisa, e o fato da análise por imunofluorescência ser um método invasivo que necessita de fixação da amostra, o uso de modelo animal tornou-se uma importante alternativa neste estudo. Outra limitação foi devido aos rigorosos critérios de seleção de doadores de FP; consequentemente, o estudo teve um

tamanho amostral pequeno (6 casos e 6 controles); dessa forma, novas investigações utilizando uma maior número de pacientes são necessárias para confirmar nossos resultados. Caso os presentes achados sejam confirmados em estudos com maiores casuísticas, nossos dados poderão contribuir para confirmar que o FP de pacientes com EI/II causa danos ao fuso meiótico e à distribuição cromossômica de oócitos durante a foliculogênese e/ou maturação oocitária.

Em resumo, nós evidenciamos pela primeira vez que o FP de mulheres inférteis com EI/II promove um efeito deletério sobre o fuso meiótico e a distribuição cromossômica de oócitos bovinos em metáfase II, submetidos à MIV na presença de duas diferentes concentrações (1% e 10%). Estes achados abrem perspectivas para o entendimento dos mecanismos patogênicos da infertilidade relacionada à doença em estágios iniciais, sugerindo que alterações no microambiente peritoneal de mulheres inférteis com EI/II sejam passíveis de comprometer a maturação e qualidade oocitária. Um melhor conhecimento dos mecanismos etiopatogênicos da infertilidade relacionada à endometriose inicial poderão ajudar na concepção de novas abordagens terapêuticas para melhorar a fertilidade natural destas mulheres.

7. Conclusões

As duas concentrações (1% e 10%) de FP de mulheres férteis sem endometriose não promoveram atraso ou bloqueio no processo de maturação oocitária em oócitos bovinos submetidos a MIV. Tampouco promoveram aumento na porcentagem de anormalidades meióticas nos oócitos em metáfase II.

As duas concentrações (1% e 10%) de FP de mulheres inférteis com EI/II também não promoveram atraso ou bloqueio no processo de maturação oocitária em oócitos bovinos submetidos a MIV. Todavia, observou-se um efeito deletério concentração dependente do FP de mulheres inférteis com EI/II sobre o fuso meiótico e a distribuição cromossômica de oócitos bovinos em MII, submetidos a MIV na presença de FP. Uma vez que concentrações menores (abaixo de 1%) de FP não foram testadas, não é possível garantir que 1% seja a concentração mais baixa de FP de mulheres com EI/II capaz de comprometer o fuso meiótico e a distribuição cromossômica durante o processo de MIV.

Estes achados sugerem um papel deletério do FP de mulheres inférteis com EI/II sobre a qualidade oocitária, o que poderia estar envolvido na diminuição da fertilidade natural de mulheres portadoras de infertilidade relacionada à endometriose em estágios iniciais.

Futuros estudos, com maiores casuísticas, que analisem possíveis componentes alterados no FP de mulheres inférteis com endometriose, são de grande importância para se tentar elucidar potenciais fatores promotores dos danos meióticos oocitários encontrados no presente estudo, em decorrência da adição de FP de mulheres com a doença ao meio de maturação. O melhor entendimento dos mecanismos etiopatogênicos da infertilidade relacionada à endometriose em estágios iniciais poderão ajudar na concepção de novas abordagens terapêuticas para melhorar a fertilidade natural destas mulheres inférteis.

8. Referências Bibliográficas

ABRÃO, M.S.; PODGAEC, S.; JUNIOR, J.A.D. Endometriose, a mulher moderna e o Brasil. **Prática Hospitalar**, p. 73-77, 2007.

ACÍEN, P.; VELASCO, I. Endometriosis: A disease that remains enigmatic. **ISRN Obstetrics and Gynecology**, 2013.

ADONA, P.R.; LEAL, C.L.V. Meiotic inhibition with different cyclin-dependent kinase inhibitors in bovine oocytes and its effects on maturation and embryo development. **Zygote**, v. 12, n. 3, p. 197-204, 2004.

AGARWAL, A.; SALEH, R.A.; BEDAIWY, M.A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertil Steril**, v.79, n.4, p. 829-43, 2003.

AKANDE, V.A. et al. Differences in time to natural conception between women with unexplained infertility and infertile women with minor endometriosis. **Hum Reprod**, v. 19, n. 1, p. 96-103, 2004.

ANDRADE, A.Z. et al. Serum markers of oxidative stress in infertile women with endometriosis. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 32, n. 6, p. 279-85, 2010.

AUGOULEA, A. et al. Pathogenesis of endometriosis: the role of genetics, inflammation and oxidative stress. **Arch Gynecol Obstet**, v. 286, n. 1, p. 99-103, 2012.

BARCELOS, I.D. et al. Anomalias meióticas de oócitos de pacientes com endometriose submetidas à estimulação ovariana. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 30, n. 8, p. 413-9, 2008.

BARCELOS, I.D. et al. Comparative analysis of the spindle and chromosome configurations of in vitro-matured oocytes from patients with endometriosis and from control subjects: a pilot study. **Fertil Steril**, v. 92, n. 5, p. 1749-52, 2009.

BARNHART, K.; DUNSMOOR-SU, R.; COUTIFARIS, C. Effect of endometriosis on in vitro fertilization. **Fertil Steril**, v. 77, n. 6, p. 1148-55, 2002.

BEDAIWY, M.A.; FALCONE, T. Peritoneal fluid environment in endometriosis. Clinicopathological implications. **Minerva Ginecol**, v. 55, n. 4, p. 333-45, 2003.

BRIZEK, C.L. et al. Increased incidence of aberrant morphological phenotypes in human embryogenesis-an association with endometriosis. **J Assist Reprod Genet**, v. 12, n. 2, p. 106-12, 1995.

BULLETTI, C. et al. Endometriosis and infertility. **J Assist Reprod Genet**, v. 27, n. 8, p. 441-7, 2010.

CAMPOS PETEAN, C. et al. Lipid peroxidation and vitamin E in serum and follicular fluid of infertile women with peritoneal endometriosis submitted to controlled ovarian hyperstimulation: a pilot study. **Fertil Steril**, v. 90, n. 6, p. 2080-5, 2008.

CARVALHO, L.F. et al. Minimal and mild endometriosis negatively impact on pregnancy outcome. **Rev Assoc Med Bras**, v. 58, n. 5, p. 607-14, 2012.

CHOI, W.J. et al. Oxidative stress and tumor necrosis factor-alpha-induced alterations in metaphase II mouse oocyte spindle structure. **Fertil Steril**, v.88, p. 1220-31, 2007.

COOPER, T. G. et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. **Human Reproduction Update**, v. 00, n. 0, p. 1-15, 2009.

DA BROI, M.G. et al. Follicular fluid from infertile women with mild endometriosis may compromise the meiotic spindles of bovine metaphase II oocytes. **Hum Reprod**, v. 29, n. 2, p. 315-23, 2014.

EICHENLAUB-RITTER, U.; SHEN, Y.; TINNEBERG, H.R. Manipulation of the oocyte: possible damage to the spindle apparatus. **Reprod Biomed Online**, v. 5, n. 2, p. 117-24, 2002.

FERREIRA, E.M. et al. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I reversibly arrests meiosis without increasing meiotic abnormalities after in vitro maturation. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 145, n. 1, p. 76-80, 2009.

FOURQUET, J. et al. Patient's report on how endometriosis affects health, work, and daily life. **Fertil and Steril**, v. 93, n. 7, p. 2424-28, 2010.

GARRIDO, N. et al. Follicular hormonal environment and embryo quality in women with endometriosis. **Hum Reprod Update**, v. 6, n. 1, p. 67-74, 2000.

GARRIDO, N. et al. The endometrium versus embryonic quality in endometriosis-related infertility. **Hum Reprod Update**, v. 8, n. 1, p. 95-103, 2002.

GIORGI V.S.I. et al. N-acetyl-cysteine and L-carnitine prevent meiotic oocyte damage induced by follicular fluid from infertile women with endometriosis. **Reproductive Sciences**, 2015.

GUPTA, S. et al. Role of oxidative stress in endometriosis. **Reprod Biomed Online**, v. 13, n. 1, p. 126-34, 2006.

GUPTA, S. et al. Pathogenic mechanisms in endometriosis-associated infertility. **Fertil Steril**, v. 90, n. 2, p. 247-57, 2008.

HARADA, T. et al. Role of cytokines in endometriosis. **Fertil Steril**, v.76, n.1, 2001.

HASHIMOTO, S. et al. Bovine immature oocytes acquire developmental competence during meiotic arrest in vitro. **Biol Reprod**, v. 66, n. 6, p. 1696-701, 2002.

HOLOCH, K.J.; LESSEY, B.A. Endometriosis and infertility. **Clin Obstet Gynecol**, v. 53, n. 2, p. 429-38, 2010.

HU, Y. et al. Effects of low O₂ and ageing on spindles and chromosomes in mouse oocytes from pre-antral follicle culture. **Hum Reprod**, v. 16, n. 4, p. 737-48, 2001.

JU, J.C. et al. Heat shock reduces developmental competence and alters spindle configuration of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 64, n. 8, p. 1677-89, 2005.

KUMBAK, B. et al. In vitro fertilization in normoresponder patients with endometriomas: comparison with basal simple ovarian cysts. **Gynecol Obstet Invest**, v. 65, n. 3, p. 212-6, 2008.

LI, Y. et al. Confocal microscopic analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes matured in vitro. **Fertil Steril**, v. 85, n. 4, p. 827-32, 2006.

LORENÇATTO, C. et al. Avaliação de dor e depressão em mulheres com endometriose após intervenção multiprofissional em grupo. **Revista de Associação Médica Brasileira**, v. 53, n. 5, p. 344-8, 2007.

LIU, L.; JU, J.C.; YANG, X. Differential inactivation of maturation-promoting factor and mitogen-activated protein kinase following parthenogenetic activation of bovine oocytes. **Biol Reprod**, v. 59, n. 3, p. 537-45, 1998.

LIU, F. Et al. The expression and role of oxidative stress markers in the serum and follicular fluid of patients with endometriosis. **Clin Exp Obstet Gynecol**, v. 40, n. 3, p. 372-6, 2013.

MACER, M.L.; TAYLOR, H.S. Endometriosis and infertility: a review of the pathogenesis and treatment of endometriosis-associated infertility. **Obstet Gynecol Clin N Am**, v. 39, n. 4, p. 535-49, 2012.

MALHI, P.S.; ADAMS, G.P.; SINGH, J. Bovine model for the study of reproductive aging in women: follicular, luteal, and endocrine characteristics. **Biol Reprod**, v. 73, n. 1, p. 45-53, 2005.

MALVEZZI, H. **O fluido peritoneal de mulheres inférteis com e sem endometriose pélvica mínima/leve reduz a expressão dos genes *GSR* e *CAT* em oócitos bovinos**. 2011. 129 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

MANSOUR, G. et al. L-carnitine supplementation reduces oocyte cytoskeleton damage and embryo apoptosis induced by incubation in peritoneal fluid from patients with endometriosis. **Fertil Steril**, v. 91, n. 5, p. 2079-86, 2009.

MANSOUR, G. et al. Endometriosis-induced alterations in mouse metaphase II oocyte microtubules and chromosomal alignment: a possible cause of infertility. **Fertil Steril**, v. 94, n. 5, p. 1894-9, 2010.

MARCOUX, S.; MAHEUX, R.; BERUBE, S. Laparoscopic surgery in infertile women with minimal or mild endometriosis. Canadian Collaborative Group on Endometriosis. **N Engl J Med**, v. 337, n. 4, p. 217-22, 1997.

MEDICINE, P. C. O. A. S. F. R. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. **Fertil Steril**, v. 99, n. 1, p. 63, 2013.

MIER-CABRERA, J. Quantitative and qualitative peritoneal immune profiles, T-cell apoptosis and oxidative stress-associated characteristics in women with minimal and mild endometriosis. **BJOG**, v. 118, v. 1, p. 6-16, 2011.

- MINICI, F. et al. Endometriosis and human infertility: a new investigation into the role of eutopic endometrium. **Hum Reprod**, v. 23, n. 3, p. 530-7, 2008.
- MORADI, M. et al. Impact of endometriosis on women's lives: a qualitative study. **BMC Womens Health**, v. 14, p. 123, 2014.
- MULLEN, S.F. et al. The effect of osmotic stress on the metaphase II spindle of human oocytes, and the relevance to cryopreservation. **Hum Reprod**, v. 19, n. 5, p. 1148-54, 2004.
- MURPHY, A.A. et al. Lysophosphatidyl choline, a chemotactic factor for monocytes/T-lymphocytes is elevated in endometriosis. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 83, n. 6, p. 2110-13, 1998.
- NAVARRO, P.A.; LIU, L.; KEEFE, D.L. In vivo effects of arsenite on meiosis, preimplantation development, and apoptosis in the mouse. **Biol Reprod**, v. 70, n. 4, p. 980-5, 2004.
- NAVARRO, P.A. et al. Arsenite induces aberrations in meiosis that can be prevented by coadministration of N-acetylcysteine in mice. **Fertil Steril**, v. 85, p. 1187-94, 2006.
- 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**, v. 14, n. 5, p. 1332-4, 1999.
- PELLICER, A. et al. Exploring the mechanism(s) of endometriosis-related infertility: an analysis of embryo development and implantation in assisted reproduction. **Hum Reprod**, v. 10, p. 91-7, 1995.
- PELLICER, A. et al. Endometrial quality in infertile women with endometriosis. **Ann N Y Acad Sci**, v. 943, p. 122-30, 2001.
- PRIETO, L. et al. Analysis of follicular fluid and serum markers of oxidative stress in women with infertility related to endometriosis. **Fertil Steril**, v. 98, n. 1, p. 126-30, 2012.
- Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. **Fertil Steril**, v. 67, n. 5, p. 817-21, 1997.
- SBE. Aspectos preventivos da endometriose. Disponível em <<http://www.sbandometriose.com.br>>. Acesso em: 26 de out. 2015.
- SIGNORILE, P.G.; BALDI, A. Endometriosis: new concepts in the pathogenesis. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 42, n. 6, p. 778-80, 2010.
- SIMÓN, C. et al. Outcome of patients with endometriosis in assisted reproduction: results from in-vitro fertilization and oocyte donation. **Hum Reprod**, v. 9, n. 4, p. 725-9, 1994.
- SOUZA, M.; SANCHES, L.C.; GARBELINI, M.C.L. A reprodução assistida aplicada em casos de infertilidade associados à endometriose. **Encontro de Bioética do Paraná**, 2009.

SPIGOLON, D.L.; AMARAL, V.F.; BARRA C.M.C.M. Endometriose: impacto econômico e suas perspectivas. **Femina**, v. 40, n. 3, p. 129-34, 2012.

SZCZEPANSKA, M. et al. Oxidative stress may be a piece in the endometriosis puzzle. **Fertil Steril**, v. 79, n. 6, p. 1288-93, 2003.

Anexos

Anexo 1 – Termos de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Fluido Peritoneal - Grupo Controle – FERTILIDADE COMPROVADA)

1. NOME DA PESQUISA: “Avaliação do potencial impacto dos fluidos folicular e peritoneal de pacientes inférteis com endometriose na gênese de anomalias meióticas oocitárias e no desenvolvimento embrionário, utilizando modelo experimental bovino”
2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Prof. Dra. Paula Andrea de A. Salles Navarro

Você está sendo convidada a participar da pesquisa intitulada “Avaliação do potencial impacto dos fluidos folicular e peritoneal de pacientes inférteis com endometriose na gênese de anomalias meióticas oocitárias e no desenvolvimento embrionário, utilizando modelo experimental bovino”

Sabemos que o estresse oxidativo (que aparece quando ocorre um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e a produção de espécies reativas) compromete a fertilidade masculina. Temos suspeita de que o estresse oxidativo possa comprometer também a fertilidade feminina, porém até o presente momento encontramos poucos dados sobre este assunto, os quais, muitas vezes, são contraditórios. A endometriose é uma causa bastante comum de dificuldade para engravidar (denominada infertilidade) e estuda-se a possibilidade do estresse oxidativo participar da ocorrência desta freqüente doença, podendo, inclusive, contribuir para a infertilidade associada à mesma. Temos indícios de que o estresse oxidativo possa prejudicar a qualidade dos óvulos, levando à redução das chances de gravidez, mesmo quando se realizam procedimentos de reprodução assistida. Nas mulheres inférteis com endometriose, questiona-se se um dos motivos responsáveis pela maior dificuldade em engravidar seja a inadequada qualidade dos óvulos (oócitos), que poderão produzir embriões também de má qualidade e, conseqüentemente, gerar uma gestação menos viável. Um estudo usando óvulos de camundongos, publicado recentemente, sugeriu que o fluido peritoneal (líquido contido na cavidade pélvica, onde ficam os órgãos internos femininos, a bexiga e a parte baixa do intestino) de mulheres com endometriose pode comprometer a qualidade dos óvulos e embriões.

Assim, a avaliação do efeito do fluido peritoneal de mulheres inférteis com endometriose sobre a qualidade dos óvulos e embriões poderia auxiliar a descoberta de alguns dos mecanismos envolvidos na causa da infertilidade, o que ajudaria na identificação de tratamentos futuros. Contudo, para podermos dizer se o efeito do fluido peritoneal de mulheres

inférteis com endometriose é diferente daquele de de mulheres férteis (que já tiveram filho), precisamos de um grupo tido como controle, ou seja, fluido peritoneal de mulheres férteis submetidas à laqueadura, no qual você estaria incluída.

Para estudarmos o possível efeito prejudicial do fluido peritoneal de mulheres com endometriose e compará-lo com o que ocorre em mulheres sem a doença, propomos avaliar o efeito da adição de fluido peritoneal no cultivo *in vitro* de óvulos e embriões bovinos (de vacas). Assim, para a realização dessa pesquisa, será necessária a doação de uma amostra de fluido peritoneal coletada durante a videolaparoscopia que você será submetida para a realização da ligadura das suas trompas. Este procedimento é rápido e isento de riscos adicionais à sua saúde. A coleta de fluido peritoneal durante a realização da sua videolaparoscopia diagnóstica não promoverá aumento do tempo da cirurgia ou do risco cirúrgico, sendo, portanto, isenta de efeitos colaterais previsíveis.

Desta forma, você está sendo convidada para participar deste estudo na posição de paciente do grupo controle, ou seja, cujo fluido peritoneal seja considerado como padrão de normalidade, para fins de comparação com os fluidos das pacientes com endometriose. Sua colaboração, portanto, no fornecimento de amostra de fluido peritoneal será imprescindível para um melhor conhecimento do efeito do fluido peritoneal de pacientes com dificuldade para engravidar sem endometriose, sobre os oócitos e embriões (utilizando um modelo animal para esta avaliação, ou seja, utilizando óvulos e embriões de vaca). Estes dados serão comparados aos de mulheres com dificuldade para engravidar devido à endometriose. Este conhecimento no futuro poderá ser usado no sentido de propiciar um tratamento mais eficaz da infertilidade associada a endometriose. Contudo, ressaltamos que você não terá nenhum tipo de benefício imediato participando do presente estudo.

É importante ressaltarmos que este estudo não trará nenhuma despesa para você. Todo o material obtido será utilizado exclusivamente para cultivo de óvulos e embriões bovinos. Também devemos ressaltar que a sua participação no presente estudo não implicará na realização de nenhum procedimento complementar durante a sua videolaparoscopia.

Fui informada de que o fluido peritoneal será coletado durante a minha videolaparoscopia, sem promover aumento dos riscos operatórios. Fui informada também de que o fluido peritoneal coletado durante a minha videolaparoscopia será utilizado para cultivo de óvulos e embriões bovinos. Desta forma, autorizo a coleta e utilização do fluido peritoneal obtido durante laparoscopia diagnóstica de rotina exclusivamente no presente estudo.

3. **INFORMAÇÕES ADICIONAIS:** Todas as dúvidas com relação ao estudo que, porventura, possam ocorrer durante o seu tratamento para engravidar, serão prontamente esclarecidas pelos pesquisadores responsáveis pelo presente estudo. Você tem a liberdade de retirar o seu consentimento e de deixar de participar do estudo, a qualquer momento, sem que isto traga qualquer prejuízo à continuidade do seu tratamento. Asseguramos o total sigilo em relação aos nomes dos integrantes deste estudo, bem como garantimos que será mantido o caráter confidencial de toda informação relacionada a sua privacidade. Temos o compromisso de que serão prestadas informações atualizadas durante todo o estudo, ainda que isto possa afetar a sua vontade de continuar dele participando. Asseguramos o compromisso de que você será devidamente acompanhada e assistida durante todo o período de participação neste projeto, bem como de que será garantida a continuidade do seu tratamento, após a conclusão dos trabalhos da pesquisa.

Eu, _____, RG nº: _____ abaixo assinada, declaro que fui informada e estou inteiramente de acordo com o exposto acima e aceito livremente participar do estudo em questão, fornecendo amostras fluido peritoneal. Autorizo a pesquisadora abaixo mencionada a utilizá-las para a pesquisa : “Avaliação do potencial impacto dos fluidos folicular e peritoneal de pacientes inférteis com endometriose na gênese de anomalias meióticas oocitárias e no desenvolvimento embrionário, utilizando modelo experimental bovino”, estando ciente que terei a liberdade de retirar o meu consentimento e de deixar de participar do estudo a qualquer momento, sem que isto traga qualquer prejuízo à continuidade do meu tratamento.

Ribeirão Preto _____ / _____ / _____

Assinatura- Paciente

Assinatura do Pesquisador

4. **PESQUISADORAS RESPONSÁVEIS:**

Prof. Dra. Paula Andrea de A. Salles Navarro – CRM: 84930 – SP

Telefone de contato: 16-3602-2231

Endereço: Av. Bandeirantes, 3900 - 1º andar (Hospital das Clínicas-Setor de Reprodução Humana), Ribeirão Preto – SP. CEP: 14049-900.

Bruna Talita Gazeto Melo Jianini

Pós-graduanda do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia – FMRP-USP

Telefone de contato: 16-3637-9673

Endereço: Av. Bandeirantes, 3900 - 1º andar (Hospital das Clínicas-Setor de Reprodução Humana), Ribeirão Preto – SP. CEP: 14049-900.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(Fluido Peritoneal - GRUPO ENDOMETRIOSE)

1. NOME DA PESQUISA: “Avaliação do potencial impacto dos fluidos folicular e peritoneal de pacientes inférteis com endometriose na gênese de anomalias meióticas oocitárias e no desenvolvimento embrionário, utilizando modelo experimental bovino”
2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Prof. Dra. Paula Andrea de A. Salles Navarro

Você está sendo convidada a participar da pesquisa intitulada “Avaliação do potencial impacto dos fluidos folicular e peritoneal de pacientes inférteis com endometriose na gênese de anomalias meióticas oocitárias e no desenvolvimento embrionário, utilizando modelo experimental bovino”

Sabemos que o estresse oxidativo (que aparece quando ocorre um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e a produção de espécies reativas) compromete a fertilidade masculina. Temos suspeita de que o estresse oxidativo possa comprometer também a fertilidade feminina, porém até o presente momento encontramos poucos dados sobre este assunto, os quais, muitas vezes, são contraditórios. A endometriose é uma causa bastante comum de dificuldade para engravidar (denominada infertilidade) e estuda-se a possibilidade do estresse oxidativo participar da ocorrência desta freqüente doença, podendo, inclusive, contribuir para a infertilidade associada à mesma. Temos indícios de que o estresse oxidativo possa prejudicar a qualidade dos óvulos, levando à redução das chances de gravidez, mesmo quando se realizam procedimentos de reprodução assistida. Nas mulheres inférteis com endometriose, questiona-se se um dos motivos responsáveis pela maior dificuldade em engravidar seja a inadequada qualidade dos óvulos (oócitos), que poderão produzir embriões também de má qualidade e, conseqüentemente, gerar uma gestação menos viável. Um estudo usando óvulos de camundongos, publicado recentemente, sugeriu que o fluido peritoneal (líquido contido na cavidade pélvica, onde ficam os órgãos internos femininos, a bexiga e a parte baixa do intestino) de mulheres com endometriose pode comprometer a qualidade dos óvulos e embriões.

Assim, a avaliação do efeito do fluido peritoneal de mulheres inférteis com endometriose sobre a qualidade dos óvulos e embriões poderia auxiliar a descoberta de alguns dos mecanismos envolvidos na causa da infertilidade, o que ajudaria na identificação de tratamentos futuros. Contudo, ressaltamos que você não terá nenhum tipo de benefício imediato participando do presente estudo.

Para estudarmos o possível efeito prejudicial do fluido peritoneal de mulheres com endometriose e compará-lo com o que ocorre em mulheres sem a doença, propomos avaliar o efeito da adição de fluido peritoneal no cultivo *in vitro* de óvulos e embriões bovinos (de vacas). Assim, para a realização dessa pesquisa, será necessária a doação de uma amostra de fluido peritoneal coletada durante a videolaparoscopia que você será submetida. Este procedimento é rápido e isento de riscos adicionais à sua saúde. A coleta de fluido peritoneal durante a realização da sua videolaparoscopia diagnóstica não promoverá aumento do tempo da cirurgia ou do risco cirúrgico, sendo, portanto, isenta de efeitos colaterais previsíveis.

Desta forma, você está sendo convidada para participar deste estudo na posição de paciente do grupo de estudo, ou seja, com endometriose. Sua colaboração, portanto, no fornecimento de amostra de fluido peritoneal será imprescindível para um melhor conhecimento do efeito do fluido peritoneal de mulheres com endometriose sobre os oócitos e embriões (utilizando um modelo animal para esta avaliação, ou seja, utilizando óvulos e embriões de vaca, cultivados com o seu fluido peritoneal). Este conhecimento no futuro poderá ser usado no sentido de propiciar um tratamento mais eficaz da infertilidade associada a esta doença. Contudo, ressaltamos que você não terá nenhum tipo de benefício imediato participando do presente estudo.

É importante ressaltarmos que este estudo não trará nenhuma despesa para você. Todo o material obtido será utilizado exclusivamente para cultivo de óvulos e embriões bovinos. Também devemos ressaltar que a sua participação no presente estudo não implicará na realização de nenhum procedimento complementar durante a sua videolaparoscopia.

Fui informada de que o fluido peritoneal será coletado durante a minha videolaparoscopia, sem promover aumento dos riscos operatórios. Fui informada também de que o fluido peritoneal coletado durante a minha videolaparoscopia será utilizado para cultivo de óvulos e embriões bovinos. Desta forma, autorizo a coleta e utilização do fluido peritoneal obtido durante laparoscopia diagnóstica de rotina exclusivamente no presente estudo.

3. **INFORMAÇÕES ADICIONAIS:** Todas as dúvidas com relação ao estudo que, porventura, possam ocorrer durante o seu tratamento para engravidar, serão prontamente esclarecidas pelos pesquisadores responsáveis pelo presente estudo. Você tem a liberdade de retirar o seu consentimento e de deixar de participar do estudo, a qualquer momento, sem que isto traga qualquer prejuízo à continuidade do seu tratamento. Asseguramos o total sigilo em relação aos nomes dos integrantes deste estudo, bem como garantimos que será mantido o caráter confidencial de toda informação relacionada a sua privacidade. Temos o compromisso

de que serão prestadas informações atualizadas durante todo o estudo, ainda que isto possa afetar a sua vontade de continuar dele participando. Asseguramos o compromisso de que você será devidamente acompanhada e assistida durante todo o período de participação neste projeto, bem como de que será garantida a continuidade do seu tratamento, após a conclusão dos trabalhos da pesquisa.

Eu, _____, RG nº: _____ abaixo assinada, declaro que fui informada e estou inteiramente de acordo com o exposto acima e aceito livremente participar do estudo em questão, fornecendo amostras fluido peritoneal. Autorizo a pesquisadora abaixo mencionada a utilizá-las para a pesquisa : “Avaliação do potencial impacto dos fluidos folicular e peritoneal de pacientes inférteis com endometriose na gênese de anomalias meióticas oocitárias e no desenvolvimento embrionário, utilizando modelo experimental bovino”, estando ciente que terei a liberdade de retirar o meu consentimento e de deixar de participar do estudo a qualquer momento, sem que isto traga qualquer prejuízo à continuidade do meu tratamento.

Ribeirão Preto _____ / _____ / _____

Assinatura- Paciente

Assinatura do Pesquisador

4. PESQUISADORAS RESPONSÁVEIS:

Prof. Dra. Paula Andrea de A. Salles Navarro – CRM: 84930 – SP

Telefone de contato: 16-3602-2231

Endereço: Av. Bandeirantes, 3900 - 1º andar (Hospital das Clínicas- Setor de Reprodução Humana), Ribeirão Preto – SP. CEP: 14049-900.

Bruna Talita Gazeto Melo Jianini

Pós-graduanda do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia – FMRP-USP

Telefone de contato: 16-3637-9673

Endereço: Av. Bandeirantes, 3900 - 1º andar (Hospital das Clínicas- Setor de Reprodução Humana), Ribeirão Preto – SP. CEP: 14049-900.

Anexo 2 – Manuscrito

Peritoneal fluid from infertile women with minimal/mild endometriosis compromises the meiotic spindle of metaphase II bovine oocytes

B.T.G.M. Jianini^{1*}, V.S.I. Giorgi¹, M.G. Da Broi¹, C.C.P. de Paz², J.C.R. e Silva¹, R.A.

Ferriani^{1,3}, P.A.A.S. Navarro^{1,3}.

¹ Human Reproduction Division, Department of Gynecology and Obstetrics, Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

² Department of Genetics, Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

³ National Institute of Hormones and Woman's Health, CNPq, Porto Alegre, RS, Brazil

Institution: Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Corresponding author:

Bruna Talita Gazeto Melo Jianini

Avenida Bandeirantes, 3900 - Ribeirao Preto, SP, Brazil

CEP: 14049-900; Tel: +55 16 3602 2821; Fax: +55 16 3633 1028

E-mail: brunagazeto@hotmail.com

Abstract

Study question: What is the potential impact of peritoneal fluid (PF) from infertile women with minimal/mild endometriosis (EI/II) on the oocyte nuclear maturation, evaluated by meiotic spindle and chromosome distribution?

Summary answer: PF from infertile women with EI/II compromises the meiotic spindle and chromosome distribution of *in vitro*-matured bovine oocytes.

What is known already: Controversial studies have suggested that impaired oocyte quality may be involved in the pathogenesis of endometriosis-related infertility. Furthermore, some studies have demonstrated alterations in the composition of PF from women with endometriosis, without specifically evaluating infertile women in early stages of the disease.

Study design, size, duration: We performed an experimental study, using a bovine model. Samples of PF were obtained between 2008 and 2010 from 12 women who underwent videolaparoscopy at our university: 6 infertile women with EI/II and 6 fertile women without endometriosis (control group). Between 2009 and 2011, samples of PF were used in six *in vitro* maturation (IVM) experiments, and after that 241 oocytes were observed and analyzed by confocal microscopy.

Participants/materials, setting, methods: Immature bovine oocytes underwent IVM in the absence of PF (No-PF) and in the presence of two concentrations (1% and 10%) of PF from fertile women in the control group (C-PF) and from infertile women with EI/II (EI/II-PF). Six replicates were performed, each one using PF from a control patient and a patient with EI/II. Each PF sample was used in only one experiment. After 22-24 h of IVM, oocytes were denuded and fixed for subsequent immunofluorescence staining for the visualization of microtubules and chromosomes by confocal microscopy.

Main results and the role of chance: The percentage of meiotically normal oocytes was significantly higher for oocytes that underwent IVM in the absence of PF (No-PF; 88.46%)

and in the presence of 1% (78.57%) and 10% (84.61%) C-PF than in oocytes that underwent IVM in the presence of 1% (62.50%) and 10% (56.25%) EI/II-PF ($P < 0.01$). In the EI/II group, the percentage of meiotically normal oocytes was significantly higher for oocytes that underwent IVM in the presence of 1% PF (62.50%) than in oocytes that underwent IVM in the presence of 10% PF (56.25%) ($P < 0.01$), suggesting a concentration-dependent effect.

Limitations, reasons for caution: Due to the strict selection criteria for PF donors, this study had a small sample size (6 controls and 6 cases). In addition, data obtained from studies using animal models may not necessarily be extrapolated to humans; thus, studies evaluating *in vivo*-matured oocytes from infertile women with EI/II will be important for confirming our results.

Wider implications of the findings: For the first time, we demonstrated that PF from infertile women with EI/II compromises oocyte nuclear maturation during IVM. The PF is in close contact with the ovaries during the folliculogenesis; therefore, our results contribute to the understanding of the etiopathogenic mechanisms of infertility related to EI/II and open perspectives for the study of new approaches in the management of infertility in women with mild endometriosis.

Study funding/competing interest(s): This study was supported by the Higher Education Personnel Training Coordination (Capes), Brazil; the Foundation to Support Education, Research and Care, University Hospital, Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo (FAEPA), Brazil; and the National Institute of Science and Technology in Hormones and Women's Health. The authors have no conflicts of interest to disclose.

Key words: female infertility / minimal and mild endometriosis / peritoneal fluid / oocyte quality / meiotic spindle

Introduction

Endometriosis is considered a common benign, estrogen-dependent gynecological disease (Minici *et al.*, 2008) characterized by the presence of endometrial tissue (glands and/or stroma) outside of the uterine cavity (Gupta *et al.*, 2006). It is associated with pelvic pain, dysmenorrhea and infertility (Minici *et al.*, 2008), although 20-25% of patients are asymptomatic (Bulletti *et al.*, 2010). It is estimated that endometriosis is present in 10-15% of women of reproductive age, and among them, 30-50% are infertile; furthermore, 25-50% of infertile women have the disease (Bulletti *et al.*, 2010; Macer *et al.*, 2012).

The relationship between endometriosis and infertility is still unclear (Gupa *et al.*, 2008). In advanced stages of the disease (moderate and severe endometriosis), this relationship has been associated with severe pelvic adhesions, which cause a variety of anatomical abnormalities in the reproductive tract and thus may impair ovum capture and transport. However, in early stages of the disease (minimal and mild endometriosis), this relationship is not very visible, since the pelvic adhesions are not sufficiently severe to cause anatomical alterations (Carvalho *et al.*, 2012). Natural fertility is impaired in women with endometriosis, even during early stages of the disease (Berubé *et al.*, 1998; Akande *et al.*, 2004). One classic study showed that infertile women with minimal or mild endometriosis who underwent surgical treatment by laparoscopy had a significant improvement in natural fertility compared with women who underwent diagnostic laparoscopy only (Marcoux *et al.*, 1997), suggesting that endometriosis even in early stages, is related to infertility. However, these women continue to have lower cumulative pregnancy rates during the 36 weeks after surgical treatment when compared with fertile couples (37.5% versus 90%, respectively) (Marcoux *et al.*, 1997; Gnoth *et al.*, 2003). To date, the mechanisms responsible for the decrease in fertility in women with early stage of disease have not been completely elucidated. The effect of endometriosis not only could be due to alterations in the normal

pelvic anatomy, but also to an effect on the development of the follicle, oocyte and/or embryo (Barnhart *et al.*, 2002) and also of endometrial defects (Brizek *et al.*, 1995; Pellicer *et al.*, 1995; Kumbak *et al.*, 2008). According to a small study that evaluated the results of *in vitro* fertilization (IVF) in oocyte donation programs, pregnancy rates in women with endometriosis are similar to those in women with another cause of infertility undergoing IVF with oocytes from donors without the disease, suggesting an important role of the quality of oocytes on the pathogenesis of infertility presented by these women (Simón *et al.*, 1994; Garrido *et al.*, 2000; Pellicer *et al.*, 2001).

Oocyte quality depends on appropriate cytoplasmic and nuclear maturation (Ferreira *et al.*, 2009), and the latter depends on the presence of a normal cell spindle. The meiotic cell spindle of human oocytes in metaphase II (MII) is a temporary and dynamic structure consisting of microtubules, which are relevant to ensuring chromosome segregation during the meiotic process (Barcelos *et al.*, 2008, 2009). The cell spindle of the oocyte is very sensitive to many factors, among them oxidative stress (OS) (Hu *et al.*, 2001; Eichenlaub-Ritter *et al.*, 2002; Mullen *et al.*, 2004), which results from a change in the balance of oxidants/antioxidants (Gupta *et al.*, 2006) and is able to cause meiotic abnormalities, chromosome instability, induction of apoptosis, and impairment of preimplantation embryo development (Navarro *et al.*, 2004, 2006); it may also be involved in the etiopathogenesis of endometriosis-related infertility (Campos Petean *et al.*, 2008; Gupta *et al.*, 2008).

Some authors have associated endometriosis with OS (Agarwal *et al.*, 2003; Szczepanska *et al.*, 2003; Gupta *et al.*, 2008), suggesting that its etiopathogenesis is possibly related to an inflammatory response to ectopic endometrial implants (Murphy *et al.*, 1998). PF is found in the vesicouterine cavity or cul-de-sac and bathes the whole pelvic cavity, uterus, fallopian tubes and ovaries (Bedaiwy and Falcone, 2003), and it may reflect the oxidative status of the microenvironment. Supporting this, studies have shown an increase in

inflammatory markers and in the OS in the PF of women with endometriosis (Augoulea *et al.*, 2012; Gupta *et al.*, 2008), even in the early stages of the disease (Mier-Cabrera *et al.*, 2011).

At the time of ovulation, PF has direct contact with the oocyte (Ma *et al.*, 2010). In addition, PF also bathes the ovaries and, when abnormal, may affect the folliculogenesis and/or oocyte maturation, compromising oocyte quality. However, no study to date has evaluated the effect of PF from infertile women with EI/II during folliculogenesis or investigated its role in oocyte maturation and oocyte quality. Thus, the aim of this study was to evaluate the cell spindle and the chromosome distribution of *in vitro*-matured oocytes in the presence of different concentrations of PF from infertile women with EI/II and to compare the results with those for a control group consisting of fertile women.

Patient selection

The endometriosis group consisted of women with infertility associated only with minimal and mild endometriosis (with normal ovulatory cycles, presence of tubal patency and partners with normal semen parameters); these women underwent videolaparoscopy, and endometriosis was diagnosed and classified according to the criteria of the American Society for Reproductive Medicine (ASRM) (Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996, 1997) by an experienced surgeon. The control group consisted of fertile women without endometriosis; these women underwent videolaparoscopy for tubal ligation.

Exclusion criteria were: age ≥ 38 years, body mass index (BMI) ≥ 30 kg/m², serum follicle stimulating hormone (FSH) concentration ≥ 10 mIU/ml on the third day of the menstrual cycle, chronic anovulation, presence of hydrosalpinx or chronic diseases such as diabetes mellitus or another endocrinopathy, cardiovascular disease, dyslipidemia, systemic lupus erythematosus or another rheumatologic disease, HIV infection or any active infection,

smoking habit and use of vitamins, hormonal medications or hormonal or non-hormonal anti-inflammatory agents during the 6 months prior to inclusion in this study. The exclusion criteria aimed to avoid situations as confounding factors related to OS and/or worsening of oocyte quality.

There was no significant difference between control and endometriosis groups regarding mean age (30.6 ± 1.43 and 29.0 ± 1.31 years, respectively) or body mass index (23.9 ± 0.90 and 24.4 ± 0.73 kg/m², respectively). Data are presented as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM).

Collection and processing of PF samples

Samples of PF from each donor were obtained during the course of laparoscopy for investigation of infertility or tubal ligation. Each sample was collected in individual sterile tubes, without culture medium, from the bottom of posterior sac under direct vision to avoid contamination with blood. Only samples of PF with no blood contamination were used. The PF samples were centrifuged at 300 g for 10 min to separate remnants of cells, and the supernatant was stored at -80°C, in individual tubes, for future use.

Oocyte collection

Bovine ovaries were collected soon after slaughter and transported in saline with added streptomycin sulfate at 35-38.5°C. In the laboratory, 2-8 mm follicles were aspirated, and only cumulus-oocyte complexes (COCs) with a homogeneous cytoplasm and at least three layers of cumulus oophorus cells were selected (Adona and Leal, 2004; Ferreira *et al.*, 2009).

***In vitro* maturation**

COCs were cultured in 400 µl droplets of IVM medium (~20 oocytes per droplet) at 38.5°C, 95% humidity, 5% CO₂ in air, for 22-24 h (Hashimoto *et al.*, 2002; Adona and Leal, 2004; Ferreira *et al.*, 2009) in a culture system without mineral oil. The IVM medium used was TCM-199 containing Earle's salts and bicarbonate (Invitrogen, Gibco Laboratories Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA), supplemented with 0.4mM sodium pyruvate, 0.5 µg/ml gentamicin, 5 µg/ml FSH, 5 mg/ml LH, 1 µg/ml estradiol and 10% fetal calf serum (FCS; Gibco). All culture media and reagents were purchased from Sigma Chemical Company (St Louis, MO, USA), except for those followed by a reference in parentheses.

Fixation and immunofluorescence staining for the visualization of microtubules and chromosomes

After IVM, oocytes were denuded (separated from the cumulus oophorus cells) mechanically by pipetting. The oocytes were fixed and left to stand for 30 min at 38.5°C in a microtubule-stabilizing buffer (Liu, Ju and Yang, 1998; Ferreira *et al.*, 2009). The oocytes were washed extensively and blocked overnight at 4°C in washing medium consisting of phosphate buffer saline (PBS) supplemented with 0.02% NaN₃, 0.01% Triton X-100, 0.2% non-fat dry milk, 2% goat serum, 2% bovine serum albumin and 0.1 M glycine. Then, the oocytes were incubated overnight at 4°C with mouse monoclonal anti-β-tubulina antibody (1:1000). The oocytes were washed, incubated with fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-mouse IgG (1:500; Zymed Laboratories, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) at 38.5°C for 2 h. The oocytes were again submitted to another washing and then stained for DNA with Hoechst 33342 (10 mg/ml) in Vectashield mounting medium (H-1000, Vector, Burlingame, CA, USA) on a glass slide and sealed. The samples were viewed under a high-performance confocal microscope (Confocal Leica TCS SP5, Leica Microsystems, Mannheim, Germany) using an optical magnification of 40X and UV lasers (Diode 405 and 543 HeNe).

Oocyte classification based on meiotic spindle morphology and chromosome configuration

The oocytes were classified in accordance with the nuclear maturation stage: metaphase I (MI), telophase I (TI), metaphase II (MII) or as parthenogenetically activated (PA; telophase II or with two polar bodies). Oocytes in MII were subdivided into analyzable and non-analyzable. Oocytes were termed analyzable when their spindles were present in a lateral or sagittal view (Fig. IA) and termed non-analyzable when their spindles were present in a polar view (Fig. IB) (Ju *et al.*, 2005). In a polar view, although the chromosomes can be aligned, the oocyte spindle is not observed and so may be abnormal (Liu *et al.*, 2013; Da Broi *et al.*, 2014). Thus, to avoid underestimating the number of abnormal oocytes, oocytes in a polar view were excluded from analysis (Da Broi *et al.*, 2014; Giorgi *et al.*, 2015).

Analyzable oocytes in MII were classified as normal when they exhibited a barrel-shaped meiotic spindle with microtubules organized from one pole to the other, chromosomes aligned on the metaphase plate at the equator of the spindle, and the presence of a polar body (Fig. IIA); or classified as abnormal when they exhibited an altered spindle (reduced longitudinal dimension, dispersed or disorganized microtubules or absent) and/or altered chromosome configuration (dispersed or displaced from the plane of the metaphase plate) (Fig. IIB-D). Parthenogenetic activation was characterized by the extrusion of a second polar body without any fertilization.

Experimental design

Immediately after selection, COCs were cultured on plates NUNC[®] 4 well plates for 22-24 h under five different conditions: in the absence of PF (No-PF); in the presence of 1% and 10% PF from a control patient (C-PF); and in the presence of 1% and 10% PF from a patient with minimal and mild endometriosis (EI/II-PF). Six IVM experiments were

performed, each one with five groups (No-PF, 1% C-PF, 10% C-PF, 1% EI/II-PF and 10% EI/II-PF) using the two concentrations of PF from a control patient without endometriosis and from a patient with EI/II. Each PF sample was used in only one experiment. After IVM, the oocytes were denuded by repeated pipetting in medium consisting of M199 containing Earle salts and bicarbonate (Invitrogen, Gibco Laboratories Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA), fixed and subjected to immunofluorescence staining.

Statistical analysis

Data were analyzed statistically using a generalized linear model (PROC GENMOD) and SAS 2003 software (2002–2003, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). A Poisson distribution was utilized for the numeral variables (total number of viewed oocytes, and numbers of oocytes in MI, TI, MII and PA) and a gamma distribution for the percentages (frequency of normal and abnormal oocytes in MII). Groups were compared using the chi-square test, with the level of significance set at $P < 0.05$.

Results

A total of 241 COCs were visualized by confocal microscopy [35 oocytes were in MI (14.52%), 2 in TI (0.83%), 200 in MII (82.99%) and 4 underwent PA (1.66%)]. Of the 200 MII oocytes, 112 were considered analyzable (i.e. fixed in a sagittal or lateral view) and 88 were considered non-analyzable (i.e. fixed in a polar view) (Table I).

In the group without peritoneal fluid (No-PF), a total of 48 oocytes were evaluated; 41 (85.42%) were in MII, and of these, 26 (63.41%) were considered analyzable. Of the analyzable oocytes in MII, 23 (88.46%) were normal and 3 (11.54%) abnormal (Table I).

In the control group with 1% concentration of PF, a total of 57 oocytes were evaluated; 44 (77.19%) were in MII, and of these, 28 (63.63%) were considered analyzable.

Of the analyzable oocytes in MII, 22 (78.57%) were normal and 6 (21.43%) abnormal (Table I).

In the control group with 10% concentration of PF, a total of 63 oocytes were evaluated; 55 (87.30%) were in MII, and of these, 26 (47.27%) were considered analyzable. Among the analyzable oocytes in MII, 22 (84.62%) were normal and 4 (15.38%) abnormal (Table I).

In the endometriosis group with 1% concentration of PF, a total of 43 oocytes were evaluated; 35 (81.40%) were in MII, and of these, 16 (45.71%) were considered analyzable. Of the analyzable oocytes in MII, 10 (62.50%) were normal and 6 (37.50%) abnormal (Table I).

In the endometriosis group with 10% concentration of PF, a total of 30 oocytes were evaluated; 25 (83.33%) were in MII, and of these, 16 (64.00%) were considered analyzable. Among the analyzable oocytes in MII, 9 (56.25%) were normal and 7 (43.75%) abnormal (Table I).

The percentage of meiotically normal oocytes was similar for oocytes that underwent IVM in the absence of PF (No-PF; 88.46%) as for those that underwent IVM in the presence of 1% (78.57%) and 10% (84.62%) PF from fertile women (C-PF) (Table I).

The percentage of meiotically normal oocytes was significantly higher for oocytes that underwent IVM in the absence of PF (No-PF; 88.46%) and in the presence of 1% (78.57%) and 10% (84.62%) PF from fertile women (C-PF) than for oocytes that underwent IVM in the presence of 1% (62.50%) and 10% (56.25%) PF from infertile women with minimal and mild endometriosis (EI/II-PF) ($P < 0.01$; Table I).

In the control group, the percentage of meiotically normal oocytes was similar for oocytes that underwent IVM in the presence of 1% (78.57%) and 10% (84.62%) PF (Table I).

In the endometriosis group, the percentage of meiotically normal oocytes was significantly higher for oocytes that underwent IVM in the presence of 1% (62.50%) than in the presence of 10% (56.25%) PF ($P < 0.01$; Table I).

Discussion

This study is the first in the literature to evaluate the effect of PF from infertile women with EI/II on maturation and oocyte quality, analyzed by normal spindle and chromosome distribution, during IVM of bovine oocytes, compared with PF from fertile women without endometriosis (control group).

The percentage of meiotically normal oocytes was similar for oocytes that underwent IVM in the absence of PF (No-PF) and in the presence of C-PF (1% and 10%), suggesting that PF from fertile women in the two tested concentrations does not affect the maturation or the percentage of mature oocytes with normal spindle and chromosome distribution after IVM. This result was expected, since during the selection of patients for the study, we were careful to exclude factors possibly related to oocyte quality impairment and/or OS. There was no significant difference between the effects of the two C-PF concentrations tested (1% and 10%) when analyzing the percentage of meiotically normal oocytes, suggesting the absence of a dose-dependent effect.

However, when the oocytes underwent IVM in the presence of EI/II-PF (1% and 10%), the percentage of meiotically normal oocytes was significant lower than in oocytes that underwent IVM in the the absence of PF (No-PF) and in the presence of C-PF (1% and 10%), suggesting that PF from infertile women with endometriosis in early stages may promote meiotic abnormalities in oocytes during IVM and so impair the oocyte quality. In contrast the control group, in the endometriosis group, the percentage of meiotically normal oocytes was significantly higher for the 1% concentration of PF compared with the 10% concentration of

PF, suggesting a dose-dependent effect of EI/II-PF on the occurrence of meiotic oocyte damage. Since lower concentrations (below 1%) were not tested, it is not possible to ensure that 1% is the lowest EI/II-PF concentration able to compromise oocyte spindle and chromosome distribution during IVM.

It is known that the IVM process, *per se*, can promote a significant increase in the occurrence of oocyte meiotic abnormalities (Barcelos *et al.*, 2009). However, this IVM methodology was applied to two different groups, therefore the differences observed are probably due to differences in constituents of the PF (obtained from infertile women with EI/II and from fertile women without endometriosis) and not due to the IVM process.

Mansour *et al.* (2009, 2010) have shown that PF from women with endometriosis promotes meiotic anomalies of the microtubules and chromosomes in mature murine oocytes. Our results corroborate the studies of Mansour *et al.* (2009, 2010); however, methodologically, our results differed from the study of Mansour *et al.* (2009, 2010) in three aspects: in our study only patients with early stages of the disease were included, while Mansour *et al.* (2009, 2010) did not describe the stage of endometriosis present in the women included in their study; all women with endometriosis who took part in our study had infertility, while Mansour *et al.* (2009, 2010) did not specify whether the women with endometriosis had infertility; and finally, we evaluated the effect of the PF from women with endometriosis during *in vitro* maturation of immature oocytes, whereas Mansour *et al.* (2009, 2010) evaluated its effect on *in vivo*-matured oocytes; thus, it was possible for them to evaluate the impact of the PF from women with endometriosis on the oocyte maturation process.

Markers of OS have been observed in the PF from infertile women with endometriosis (Gupta *et al.*, 2008; Augoulea *et al.*, 2012), even from those in early stages of the disease (Mier-Cabrera *et al.*, 2011). Mansour *et al.* (2009, 2010) demonstrated that oocyte meiotic

abnormalities in *in vivo*-matured oocytes caused by PF from women with endometriosis were reduced by supplementation of culture medium with L-carnitine, an antioxidant, suggesting that the oocyte meiotic damage is mediated by OS. As previously pointed out, OS is able to cause meiotic abnormalities, chromosome instability, apoptosis induction, and impairment of pre-implantation embryo development (Navarro *et al.*, 2004, 2006). Since human ovaries are in close contact with the PF, not just after ovulation, but also during the oocyte maturation process (Mansour *et al.*, 2010), we hypothesized that this may reflect the OS on this microenvironment and promote the genesis of meiotic oocyte anomalies in infertile women with the disease, and this should be evaluated in future studies.

Reinforcing our hypothesis, a study conducted by our group, using an experimental bovine model, compared the potential impact of the PF from fertile women, infertile women without endometriosis, and infertile women with EI/II on oocyte expression of genes related to the main antioxidant enzymes. The study showed that PF from infertile women with EI/II produced a significant reduction in transcripts from the *GSR* and *CAT* genes, suggesting the use of these antioxidants enzymes in the tentative to prevent oxidative damage of oocytes during IVM (unpublished data).

The current study had some limitations. One was the use of bovine oocytes. We chose to use this animal model due to the similarity in size and morphology of human and bovine ovaries, because both species are mono-ovulatory and polycyclic. Moreover, bovine oocytes are plentiful, low cost and easily handled (Malhi *et al.*, 2005). Studies using animal models may not necessarily be extrapolated to humans, and studies evaluating *in vivo*-matured oocytes from infertile women with EI/II will be important for confirming our results. However, considering the small number of human oocytes for available for research, and the fact that immunofluorescence analysis is an invasive method that requires fixing of the sample, the use of animal models has provided a useful alternative for this study. Another

limitation was due to the strict selection criteria for PF donors; hence, this study had a small sample size (6 cases and 6 controls); thus, further investigations using a large cohort of patients are needed to confirm these results. If our findings are confirmed in larger studies, our data will contribute to confirm that the PF from patients with EI/II causes damage to the oocyte meiotic spindle and the chromosome distribution.

In short, we obtained evidence for the first time that the PF from infertile women with EI/II promotes a deleterious effect on the meiotic spindle and the chromosome distribution of bovine oocytes undergoing IVM in the presence of two different PF concentrations. These findings open perspectives for the understanding of the pathogenic mechanisms of infertility related to EI/II, suggesting that alterations in the peritoneal microenvironment of infertile women with endometriosis in its early stages could compromise oocyte quality. A better understanding of the pathological mechanisms of infertility related to early endometriosis may help in the design of new therapeutic approaches to improve the natural fertility of these infertile women.

Author's roles

B.T.G.M.J. was responsible for the study design, selection of the patients, acquisition of data, methodology, interpretation of data and manuscript writing. V.S.I.G. made substantial contributions to the methodology, acquisition and interpretation of data. M.G.B. made substantial contributions to acquisition and interpretation of data and contributed to revising the manuscript. C.C.P.P. contributed to the statistical analysis and interpretation of data. J.C.R.S. contributed to the collection of peritoneal fluid and performed the surgical procedures. R.A.F. contributed to critically revising the manuscript for important intellectual content. P.A.A.S.N. contributed to the study conception and design, interpretation of data, critically revising the manuscript, giving final approval of the version to be published, and

coordinating of the project. All authors have approved the final version for the submission of the manuscript.

Acknowledgements

The authors thank the staff of the Human Reproduction Laboratory, University Hospital, Department of Gynecology and Obstetrics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo (FMRP-USP) for collection of PF, and the Multi-User Laboratory of Confocal Microscopy, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo (FMRP-USP), for technical support. The authors also thank Helena Malvezzi for her valuable assistance with the IVM experiments.

Funding

This study was supported by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Brazil; the Foundation to Support Education, Research and Care, University Hospital, Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo (FAEPA), Brazil; and the National Institute of Hormones and Women's Health, CNPq, Brazil.

Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

References

Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril* 1997;**67**: 817-821.

Adona PR, Leal CLV. Meiotic inhibition with different cyclin-dependent kinase inhibitors in bovine oocytes and its effects on maturation and embryo development. *Zygote* 2004;**12**: 197-204.

Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 2003;**79**: 829-843.

Akande VA, Hunt LP, Cahill DJ, Jenkins JM. Differences in time to natural conception between women with unexplained infertility and infertile women with minor endometriosis. *Hum Reprod* 2004;**19**: 96-103.

Augoulea A, Alexandrou A, Creatsa M, Vrachnis N, Lambrinoudaki I. Pathogenesis of endometriosis: the role of genetics, inflammation and oxidative stress. *Arch Gynecol Obstet* 2012;**286**: 99-103.

Barcelos ID, Vieira RC, Ferreira EM, Araújo MCP, Martins WP, Ferriani RA, Navarro PA. Anomalias meióticas de oócitos de pacientes com endometriose submetidas à estimulação ovariana. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2008;**30**: 413-419.

Barcelos ID, Vieira RC, Ferreira EM, Martins WP, Ferriani RA, Navarro PA. Comparative analysis of the spindle and chromosome configurations of in vitro-matured oocytes from patients with endometriosis and from control subjects: a pilot study. *Fertil Steril* 2009;**92**: 1749-1752.

Barnhart K, Dunsmoor-Su R, Coutifaris C. Effect of endometriosis on in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2002;**77**: 1148-1155.

Bedaiwy MA, Falcone T. Peritoneal fluid environment in endometriosis. Clinicopathological implications. *Minerva Ginecol* 2003;**55**: 333-345.

Brizek CL, Schlaff S, Pellegrini VA, Frank JB, Worrilow KC. Increased incidence of aberrant morphological phenotypes in human embryogenesis-an association with endometriosis. *J Assist Reprod Genet* 1995;**12**:106-12.

Bulletti C, Coccia ME, Battistoni S, Borini A. Endometriosis and infertility. *J Assist Reprod Genet* 2010;**27**: 441-447.

Campos Petean C, Ferriani RA, dos Reis RM, de Moura MD, Jordao AA Jr, Navarro PA. Lipid peroxidation and vitamin E in serum and follicular fluid of infertile women with peritoneal endometriosis submitted to controlled ovarian hyperstimulation: a pilot study. *Fertil Steril* 2008;**90**: 2080-2085.

Carvalho LFP, Below A, Abrão MS, Agarwal A. Minimal and mild endometriosis negatively impact on pregnancy outcome. *Rev Assoc Med Bras* 2012;**58**: 607-614.

Da Broi MG, Malvezzi H, Paz, CC, Ferriani RA, Navarro PA. Follicular fluid from infertile women with mild endometriosis may compromise the meiotic spindles of bovine metaphase II oocytes. *Hum Reprod* 2014;**29**: 315-323.

Eichenlaub-Ritter U, Shen Y, Tinneberg HR. Manipulation of the oocyte: possible damage to the spindle apparatus. *Reprod Biomed Online* 2002;**5**: 117-124.

Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Ferriani RA, Navarro PA. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I reversibly arrests meiosis without increasing meiotic abnormalities after in vitro maturation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009;**145**: 76-80.

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

Giorgi VSI, Da Broi MG, Paz CCP, Ferriani RA, Navarro PA. (2015) N-acetyl-cysteine and L-carnitine prevent meiotic oocyte damage induced by follicular fluid from infertile women with endometriosis. *Reproductive Sciences*. In press.

Gupta S, Agarwal A, Krajcir N, Alvarez JG. Role of oxidative stress in endometriosis. *Reprod Biomed Online* 2006;**13**: 126-134.

Gupta S, Goldberg JM, Aziz N, Goldberg E, Krajcir N, Agarwal A. Pathogenic mechanisms in endometriosis-associated infertility. *Fertil Steril* 2008;**90**: 247-257.

Hashimoto S, Minami N, Takakura R, Imai H. Bovine immature oocytes acquire developmental competence during meiotic arrest in vitro. *Biol Reprod* 2002;**66**: 1696-1701.

Hu Y, Betzendahl I, Cortvrindt R, Smits J, Eichenlaub-Ritter U. Effects of low O₂ and ageing on spindles and chromosomes in mouse oocytes from pre-antral follicle culture. *Hum Reprod* 2001;**16**: 737-748.

Ju JC, Jiang S, Tseng JK, Parks JE, Yang X. Heat shock reduces developmental competence and alters spindle configuration of bovine oocytes. *Theriogenology* 2005;**64**: 1677-1689.

Kumbak B, Kahraman S, Karlikaya G, Lacin S, Guney A. In vitro fertilization in normoresponder patients with endometriomas: comparison with basal simple ovarian cysts. *Gynecol Obstet Invest* 2008;**65**: 212-216.

Liu L, Ju JC, Yang X. Differential inactivation of maturation-promoting factor and mitogen-activated protein kinase following parthenogenetic activation of bovine oocytes. *Biol Reprod* 1998;**59**: 537-545.

Liu F, He L, Liu Y, Shi Y, Du H. The expression and role of oxidative stress markers in the serum and follicular fluid of patients with endometriosis. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2013;**40**: 372-376.

Ma CH, Yan LY, Qiao J, Sha W, Li L, Chen Y, Sun QY. Effects of tumor necrosis factor- α on porcine oocyte meiosis progression, spindle organization, and chromosome alignment. *Fertil Steril* 2010;**93**: 920-926.

Macer ML, Taylor HS. Endometriosis and infertility: a review of the pathogenesis and treatment of endometriosis-associated infertility. *Obstet Gynecol Clin N Am* 2012; **39**: 535-549.

Malhi PS, Adams GP, Singh J. Bovine model for the study of reproductive aging in women: follicular, luteal, and endocrine characteristics. *Biol Reprod* 2005;**73**: 45-53.

Mansour G, Abdelrazik H, Sharma RK, Radwan E, Falcone T, Agarwal A. L-carnitine supplementation reduces oocyte cytoskeleton damage and embryo apoptosis induced by incubation in peritoneal fluid from patients with endometriosis. *Fertil Steril* 2009;**91**: 2079-2086.

Mansour G, Sharma RK, Agarwal A, Falcone T. Endometriosis-induced alterations in mouse metaphase II oocyte microtubules and chromosomal alignment: a possible cause of infertility. *Fertil Steril* 2010;**94**: 1894-1899.

Marcoux S, Maheux R, Berube S. Laparoscopic surgery in infertile women with minimal or mild endometriosis. Canadian Collaborative Group on Endometriosis. *N Engl J Med* 1997;**337**: 217-222.

Mier-Cabrera J, Jiménez-Zamudio L, Garcia-Latorre E, Cruz-Orozco O, Hernández-Guerrero C. Quantitative and qualitative peritoneal immune profiles, T-cell apoptosis and oxidative stress-associated characteristics in women with minimal and mild endometriosis. *BJOG* 2011;**118**: 6-16.

Minici F, Tiberi F, Tropea A, Orlando M, Gangale MF, Romani F, Campo S, Bompiani A, Lanzone A, Apa R. Endometriosis and human infertility: a new investigation into the role of eutopic endometrium. *Hum Reprod* 2008;**23**: 530-537.

Mullen SF, Agca Y, Broermann DC, Jenkins CL, Johnson CA, Critser JK. The effect of osmotic stress on the metaphase II spindle of human oocytes, and the relevance to cryopreservation. *Hum Reprod* 2004;**19**: 1148-1154.

Murphy AA, Santanam N, Morales AJ, Parthasarathy S. Lysophosphatidyl choline, a chemotactic factor for monocytes/T-lymphocytes is elevated in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;**83**: 2110-2113.

Navarro PA, Liu L, Keefe DL. In vivo effects of arsenite on meiosis, preimplantation development, and apoptosis in the mouse. *Biol Reprod* 2004;**70**: 980-985.

Navarro PA, Liu L, Ferriani RA, Keefe DL. Arsenite induces aberrations in meiosis that can be prevented by coadministration of N-acetylcysteine in mice. *Fertil Steril* 2006;**85**: 1187-1194.

Pellicer A, Oliveira N, Ruiz A, Remohi J, Simon C. Exploring the mechanism(s) of endometriosis-related infertility: an analysis of embryo development and implantation in assisted reproduction. *Hum Reprod* 1995;**10**: 91-97.

Pellicer A, Navarro J, Bosch E, Garrido N, Garcia-Velasco JA, Remohi J, Simon C. Endometrial quality in infertile women with endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2001;**943**: 122-130.

Simón C, Gutierrez A, Vidal A, Santos MJ de los, Tarin JJ, Remohi J, Pellicer A. Outcome of patients with endometriosis in assisted reproduction: results from in-vitro fertilization and

oocyte donation. *Hum Reprod* 1994;**9**: 725-729.

Szczepanska M, Kozlik J, Skrzypczak J, Mikolajczyk M. Oxidative stress may be a piece in the endometriosis puzzle. *Fertil Steril* 2003;**79**: 1288-1293.

Table I: Stages of nuclear maturation and percentages of normal and abnormal MII oocytes matured in medium without PF (No-PF), with different concentrations of PF from fertile women without endometriosis (C-PF) and with minimal and mild endometriosis (EI/II-PF).

Group	PF concentration (%)	Total number of viewed oocytes (n)	MI n (%)	TI n (%)	PA n (%)	MII			
						Total number of MII n (%)	Analyzable n (%)	Normal n (%)	Abnormal n (%)
No-PF	0	48	5 (10.42)	1 (2.08)	1 (2.08)	41 (85.42)	26 (63.41)	23 (88.46) ^a	3 (11.54)
C-PF	1	57	9 (15.79)	1 (1.75)	3 (5.27)	44 (77.19)	28 (63.63)	22 (78.57) ^a	6 (21.43)
	10	63	8 (12.70)	0	0	55 (87.30)	26 (47.27)	22 (84.62) ^a	4 (15.38)
EI/II-PF	1	43	8 (18.60)	0	0	35 (81.40)	16 (45.71)	10 (62.50) ^b	6 (37.50)
	10	30	5 (16.67)	0	0	25 (83.33)	16 (64.00)	9 (56.25) ^c	7 (43.75)

Note: No-PF, oocytes that underwent IVM in medium containing no added peritoneal fluid; C-PF, oocytes that underwent IVM in medium supplemented with peritoneal fluid from fertile women without endometriosis; EI/II-PF, oocytes that underwent IVM in medium supplemented with peritoneal fluid from infertile women with minimal and mild endometriosis; Analyzable, oocytes with the spindle fixed in a sagittal or lateral view; MI, metaphase I; TI, telophase I; MII, metaphase II; PA, spontaneous parthenogenetic activation (extrusion of the second polar body in the absence of fertilization). Data are the results of 6 replicates. Different letters in the same column indicate a significant difference, $P < 0.01$, using Poisson, gamma distribution and the chi-square test.

Figure I: Confocal microscopy images of bovine oocytes matured *in vitro* in the presence of PF from fertile women without endometriosis (C-PF) or with minimal and mild endometriosis (EI/II-PF). (A) Metaphase II oocyte in a sagittal view. (B) Metaphase II oocyte in a polar view. Green: spindle stained with an anti- β -tubulin antibody and fluorescein isothiocyanate-conjugated secondary antibody; blue: chromosomes stained with Hoechst 33342. Scale bar = 5 μ m.

Figure II: Confocal microscopy images of bovine oocytes matured *in vitro* in the presence of PF from fertile women without endometriosis (C-PF) or with minimal and mild endometriosis (EI/II-PF). (A) Normal metaphase II oocyte showing properly aligned chromosomes in the central region of a normal barrel-shaped spindle. (B) Abnormal metaphase II oocyte with aligned chromosomes and an abnormal spindle. (C) Abnormal metaphase II oocyte with misaligned chromosomes and a normal barrel-shaped spindle (reduced longitudinal dimension). (D) Abnormal metaphase II oocyte with misaligned chromosomes and an abnormal spindle. Green: spindle stained with an anti- β -tubulin antibody and fluorescein isothiocyanate-conjugated secondary antibody; blue: chromosomes stained with Hoechst 33342. Scale bar = 5 μ m.