

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

VANESSA SILVESTRE INNOCENTI GIORGI

L-carnitina e ácidos graxos ômega-3 previnem danos meióticos em oócitos
bovinos maturados *in vitro* com fluido folicular de mulheres inférteis com
endometriose

Ribeirão Preto

2018

VANESSA SILVESTRE INNOCENTI GIORGI

**L-carnitina e ácidos graxos ômega-3 previnem danos meióticos em
oócitos bovinos maturados *in vitro* com fluido folicular de mulheres inférteis
com endometriose**

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Ciências
Médicas.

Área de Concentração: Ginecologia e
Obstetrícia (opção: Biologia da Reprodução)

Orientadora: Prof^a Dr^a Paula Andrea de
Albuquerque Salles Navarro

Ribeirão Preto

2018

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.

Giorgi, Vanessa Silvestre Innocenti

L-carnitina e ácidos graxos ômega-3 previnem danos meióticos em oócitos bovinos maturados *in vitro* com fluido folicular de mulheres inférteis com endometriose, 2018.

134 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia

Orientador: Navarro, Paula A de Albuquerque Sales.

Versão Original

1. Endometriose. 2. Infertilidade feminina. 3. Fluido folicular. 4. Qualidade oocitária. 5. L-carnitina. 6. Ômega-3. 7. Ácido docosahexaenóico. 8. Ácido eicosapentaenoico. 9. Antioxidante. 10. β -oxidação.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: GIORGI, V. S. I.

Título: L-carnitina e ácidos graxos ômega-3 previnem danos meióticos em oócitos bovinos maturados *in vitro* com fluido folicular de mulheres inférteis com endometriose.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Ciências
Médicas.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

À minha família, com amor, admiração e gratidão por toda compreensão, carinho, apoio, presença e incansável apoio ao longo do período de elaboração deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Gosto de pensar que essa é a parte em que devo tentar cometer o menor número de esquecimentos possíveis, por dois motivos: 1º: nenhuma tese é perfeita, sempre há vírgulas faltando, erros ortográficos, margens fora dos padrões, etc. E 2º: é bem provável que os meus leitores mais especiais (a minha família) se atenham apenas a esta seção (e é bem compreensível). Então, vou caprichar.

Há quase sete anos atrás iniciei a minha aventura na dedicação exclusiva a pós-graduação. Longe da família, amigos e namorado comecei a me aprofundar ao mundo da infertilidade e da endometriose repleto de interrogações. E se não bastasse a complexidade, surgiu o estresse oxidativo, os antioxidantes e a beta-oxidação! E por tudo isso e muito mais, tenho muito a agradecer ao doutorado, fase da minha vida que me mostrou minhas fragilidades e me ensinou a superá-las. Entretanto, nada seria possível nesta caminhada, se ela fosse solitária, e foram muitas as pessoas que me ajudaram nesta empreitada.

Inicialmente, gostaria de agradecer às pacientes doadoras de fluido folicular. Sempre muito interessadas e simpáticas, ouviam muito atentas o que eu tinha para falar (e pedir). Cada amostra de fluido folicular doada foi armazenada com muito carinho e boas intenções. Com esperança, aguardo que um dia, todo esse estudo seja aplicável clinicamente.

Durante o recrutamento das pacientes, contei com uma equipe enorme e sempre disposta. Agradeço imensamente à equipe de enfermagem: Auxi, Marisa, Dri e Sandra e a todos os residentes que passaram pelo Lab de GO e me auxiliaram com dúvidas clínicas e realizaram as punções foliculares. Doutores Stael, Nani, Erci, Anderson, Well, que quando me viam de roupinha azul e caixa de isopor nas mãos, já diziam “- Sem meio, primeiro folículo do primeiro ovário”. Obrigada por toda a gentileza e carinho.

À equipe de embriologia, Cris, Roberta, Camila e Thalita, que pelo *pass through* recebiam um tubinho com a designação “esse é da Vanessa”, e se animavam junto comigo quando tinha óvulo ou células. Muito obrigada, meninas, vocês são incríveis!

Às queridas andrologistas, Marilda e Fabi, que me ensinaram o que é espermograma e me apoiaram em muitos momentos importantes. Obrigada, queridas!

Às meninas da dosagem hormonal, Albina e Tati, pela simpatia e cordialidade em todos os momentos.

À Cidinha, que mudou o laboratório de cultivo e me fez ver como era difícil trabalhar sem o apoio dela. Cidinha, obrigada por cada ovário aspirado, por cada bronca e risada, e por todos os dias que você NÃO estava de férias. Sua contribuição foi inestimável.

Agradeço ao Ricardo Pereira por todas as coletas de ovários no abatedouro de Sertãozinho.

Às queridas Cris Brent, Océlia e Gisele, pela confiança, bom convívio e conselhos. Obrigada pelo profissionalismo e risadas.

Inestimável agradecimento à Bete Milani, que sempre com muita simpatia, me ajudou em todos os “pepinos” no confocal. Obrigada pela paciência e por todo o conhecimento.

À Cris Padovan, que me faz rir nas situações mais inusitadas. Obrigada pelo apoio enquanto estive com os experimentos no Multiusuário, obrigada pela amizade!

Aos demais funcionários do Multiusuário, Lilian, Ronaldo, Paula e Estela, por me acolherem durante um mês de experimentos fora do HC.

À Dr^a Juliana Meola que, gentilmente, cedeu seu laboratório recém montado para a continuação dos meus experimentos enquanto o Lab GO estava fechado em reforma. Obrigada por ser um exemplo de profissional e amiga, tenho você no fundo do meu coração.

Ao Dr^o Rui Ferriani pelo apoio científico e financeiro. Obrigada por ser uma pessoa inspiradora, e por sempre ter contribuído com a minha formação na pós-graduação.

Aos docentes do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia (especialmente os docentes do Lab de GO: Ana Carolina Sá, Rosana, Rui) pela cordialidade, conhecimentos e boa convivência.

Aos funcionários do oitavo andar do HC, Suélen, Ilza, Gabi, Rosana, Reinaldo, Ricardo e Suleimy, obrigada por todos os socorros e orientações, sempre com muita simpatia e empenho.

A todos os envolvidos na pós-graduação em Ginecologia e Obstetrícia da FMRP-USP, à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Código de Financiamento 001) e à FAEPA (Fundação de Amparo ao Ensino, Pesquisa e Assistência do HC-FMRP) pelo suporte, bolsa e incentivo financeiro.

Às alunas e ex-alunas do cultivo, por todos ensinamentos, protocolos, dúvidas compartilhadas, ovários aspirados... obrigada sempre pela boa convivência e bom senso.

Às alunas e ex-alunas do grupo de endometriose (especialmente Michi, Carol Mantovani, Lili, Bruna Gazeto, Elisa)...obrigada, meninas, por todos os prontuários revisados, artigos compartilhados. Uma pós-graduação não se faz sozinha, e é muito bom ter pessoas como vocês na minha jornada, exemplos de profissionalismo, competência e generosidade. Vocês estão no meu coração!

Aos alunos e ex-alunos do grupo de pesquisa da Dr^a Paula Navarro, Paulinha, Dú, Thalita, Fer Veronese, Iara, Ricardo Pimentel, Marcela, Malu, Aline, Mayra,, Jhenifer, pelo bom convívio, amizade e generosidade.

Aos pós-graduandos e ex-pós-graduandos do Laboratório de GO, pela amizade e pelo incentivo diário.

Agradeço também, aos amigos de fora da PG (amigos(as) de infância, amigos(as) da faculdade, e amigas do antigo lab), que mesmo de longe sempre me apoiaram e escutaram as minhas incertezas.

À minha orientadora, Dr^a Paula Navarro, que ao longo desses 7 anos teve um árduo trabalho em me ensinar sobre pesquisa, e por me aconselhar em diversas situações pessoais. Paula, você é uma pessoa iluminada e sou eternamente grata por todos os ensinamentos e exemplos.

À minha avó Edméa (*in memoriam*), por todas as preces aos anjos da guarda e à Santa Filomena. A sr^a faz falta!

Ao meu grande amor, Thiago, que sempre ilumina meus pensamentos e meus dias. Obrigada por todo o carinho, compreensão e paciência nessa longa caminhada... obrigada pelo maior presente de nossas vidas, agora somos 3! Te amo.

Às melhores irmãs do mundo, Anna Paula e Bruna, obrigada por serem minhas melhores amigas, por serem meus exemplos de vida, por serem meu ponto de equilíbrio. Amo muito vocês.

À melhor mãe do mundo, Ivone. Obrigada por confiar em mim, por me apoiar nas horas mais difíceis, por me acalantar com beijos e guloseimas, por ser meu exemplo de vida, por nunca me esconder as dificuldades do mundo. Mãe, aqui estou terminando o doutorado, e este título é SEU. Obrigada por não ter desistido daquela

criança que chorava e não queria ir para escola. Te amo muito muito. Prometo me esforçar muito para ser 1% da mãe que você é.

Ao melhor pai do mundo, Fábio. Obrigada por ser o cara que resolve tudo e faz qualquer situação ficar mais fácil. Obrigada pelos socorros de urgência. Obrigada pelo carinho, pelo suporte e, principalmente, pelos conselhos. Você é um exemplo para mim, mostrando que faculdade e títulos acadêmicos não resumem inteligência e caráter. Obrigada por cuidar de mim. Te amo muito.

Meu muiiito obrigada a todos!!

EPÍGRAFE

Por vezes, sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

GIORGI, Vanessa Silvestre Innocenti. **L-carnitina e ácidos graxos ômega-3 previnem danos meióticos em oócitos bovinos maturados *in vitro* com fluido folicular de mulheres inférteis com endometriose**. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

No presente estudo avaliamos o impacto da adição de fluido folicular (FF) de mulheres inférteis sem e com endometriose em estágios iniciais (I/II) e avançados [(III/IV) sem e com endometrioma] ao meio de maturação *in vitro* (MIV) sobre as taxas de normalidade meiótica de oócitos bovinos. Avaliamos se a L-carnitina (LC) e os ácidos graxos ômega-3 [n3, ácidos docosahexaenóico (DHA) e eicosapentaenóico (EPA)] são capazes de prevenir os danos meióticos em oócitos bovinos induzidos por FF de mulheres inférteis com endometriose I/II e III/IV durante a MIV. Para isso, realizamos um estudo experimental utilizando modelo bovino. Trinta e duas amostras de FF foram colhidas de 24 mulheres inférteis com endometriose (8 com I/II, 8 com III/IV sem endometrioma e 8 III/IV com endometrioma no ciclo) e 8 sem endometriose (controle) que foram submetidas à estimulação ovariana controlada para realização de injeção intracitoplasmática de espermatozoide. Complexos *cumulus*-oócitos (CCOs) imaturos de bovinos foram submetidos à MIV divididos em 9 grupos: sem FF (sem-FF), com 1% de FF de mulheres inférteis sem endometriose (FFControle) e com endometriose (FFEI/II, FFEIII/IV e FFEendometrioma) suplementados ou não com LC (0,6mg/mL) e ácidos graxos ômega-3 (0,4 nM de DHA e 0,6 nM de EPA) (FFControle+LC+n3, FFEI/II+LC+n3, FFEIII/IV+LC+n3 e FFEendometrioma+LC+n3). Após 22-24h de MIV, os oócitos foram denudados, fixados e armazenados para realização de imunofluorescência para visualização do fuso meiótico e cromossomos por microscopia confocal. As taxas de metáfase II (MII) e de MII normais foram comparadas entre os 9 grupos utilizando o teste do qui-quadrado ($p < 0,05$). Um total de 1686 CCOs imaturos foram submetidos à MIV, e 1401 oócitos foram visualizados por microscopia confocal. A adição de FF de mulheres com endometriose ao meio de MIV reduziu a taxa de MII normais (FFEI/II: 62,2%, FFEIII/IV: 70,2% e FFEendometrioma: 72,7%) comparado aos grupos sem-FF (87,2%) e FFControle (87,2%). O grupo FFEendometrioma (69,3%) apresentou a menor taxa de MII comparado a todos os demais grupos (sem-FF: 91,9%, FFControle: 89,2%, FFControle+LC+n3: 89,2%, FFEI/II: 85,4%, FFEI/II+LC+n3: 85,3%, FFEIII/IV: 80,7%, FFEIII/IV+LC+n3: 90,8%, FFEendometrioma+LC+n3: 86,4%). O grupo FFEIII/IV apresentou menor taxa de MII comparado ao grupo sem-FF. No grupo com FFControle, a adição de LC+n3 não alterou as taxas de MII (89,2% vs 89,2) e de MII normais (87,2% vs 82,5%). No grupo FFEI/II, a adição de LC+n3 aumentou a taxa de MII normais (84,5% vs 62,2%). No grupo FFEIII/IV a adição de LC+n3 aumentou a taxa de MII normais (70,2% vs 84,1%) e de MII (90,8%), que passou a ser semelhante a dos grupos sem-FF e FFControle. No grupo FFEendometrioma a adição de LC+n3 aumentou a taxa de MII normais (86,4%), comparado ao grupo FFEendometrioma (69,3%), a qual foi similar a dos grupos sem-FF e FFControle. Portanto, o FF de mulheres com endometriose prejudica o fuso meiótico e o alinhamento cromossômico de oócitos bovinos, independentemente, do estágio da doença. Entretanto, o avanço da endometriose e a presença de endometrioma parecem ter um impacto ainda mais negativo na qualidade oocitária, prejudicando também a maturação nuclear. A adição de LC+n3 previne os danos meióticos oocitários provocados pelo FF de mulheres com endometriose em estágios iniciais e avançados. Dessa forma, sugerimos que inflamação, o estresse oxidativo e a desregulação da β -oxidação são fatores envolvidos na alteração da qualidade oocitária e, conseqüente, piora da fertilidade natural de mulheres com endometriose.

Palavras-chave: Endometriose. Infertilidade feminina. Fluido folicular. Qualidade oocitária. L-carnitina. Ômega-3. Ácido docosahexaenóico. Ácido eicosapentaenóico. Antioxidante. β -oxidação.

ABSTRACT

GIORGI, Vanessa Silvestre Innocenti. **L-carnitine and omega-3 fatty acids prevent meiotic damages in bovine oocytes matured *in vitro* with follicular fluid from infertile women with endometriosis**. Thesis (Doctoral Degree in Medical Sciences) – Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil, 2018.

In the present study, we evaluated the impact of the addition of follicular fluid (FF) from infertile women without and with endometriosis in the early (I/II) and advanced stages [(III/IV) with and without endometrioma] to the *in vitro* maturation (IVM) medium on the meiotic normality rates of bovine oocytes. We evaluated whether L-carnitine (LC) and omega-3 fatty acids [n3, docosahexaenoic (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA)] were able to prevent bovine meiotic oocyte damage induced by FF from infertile women with endometriosis in stages I/II and III/IV during IVM. For this, we performed an experimental study using bovine model. Thirty-two FF samples were collected from 24 infertile women with endometriosis (8 with I/II, 8 with III/IV without endometrioma and 8 III/IV with endometrioma in the cycle) and 8 without endometriosis (control) who underwent to controlled ovarian stimulation for intracytoplasmic sperm injection. Immature cumulus oocytes complexes (COCs) of bovines were submitted to IVM divided into 9 groups: without FF (No-FF), with 1% FF of infertile women without endometriosis (FFControl) and with endometriosis (FFEI/II, FFEIII/IV and FFEendometrioma) supplemented or not with LC (0.6 mg/mL) and omega-3 fatty acids (0.4 nM DHA and 0.6 nM EPA) (FFControl+LC+n3, FFEI/II+LC+n3, FFEIII/IV+LC+n3 and FFEendometrioma+LC+n3). After 22-24h of IVM, the oocytes were denuded, fixed and stored for subsequent immunofluorescence to visualize the meiotic spindle and chromosomes by confocal microscopy. The metaphase II (MII) and normal MII rates were compared between the 9 groups using the chi-square test ($p < 0.05$). A total of 1686 immature COCs were submitted to IVM, and 1401 oocytes were visualized by confocal microscopy. Addition of FF from women with endometriosis to the IVM medium decreased the rate of normal MII (FFEI/II: 62.2%, FFEIII/IV: 70.2% and FFEendometrioma: 72.7%) compared to the No-FF (87.2%) and FFControl (87.2%) groups. The FFEendometrioma group (69.3%) presented the lowest rate of MII compared to all other groups (No-FF: 91.9%, FFControl: 89.2%, FFControl+LC+n3: 89.2%, FFEI/II: 85.4%, FFEI/II+LC+n3: 85.3%, FFEIII/IV: 80.7%, FFEIII/IV+LC+n3: 90.8%, FFEendometrioma+LC+n3: 86.4%). The FFEIII/IV group had a lower MII rate compared to the No-FF group. In the group with FFControl, the addition of LC+n3 did not change the rates of MII (89.2% vs 89.2%) and normal MII (87.2% vs 82.5%). In the FFEI/II group, the addition of LC+n3 increased the normal MII rate (84.5% vs 62.2%). In the FFEIII/IV group, the addition of LC+n3 increased the normal MII rate (70.2% vs 84.1%) and MII (90.8%), which was similar to that of the No-FF and FFControl. In the FFEendometrioma group, the addition of LC+n3 increased the normal MII rate (69.3% vs 86.4%) which was similar to No-FF and FFControl groups. Therefore, the FF of women with endometriosis impairs the meiotic spindle and the chromosomal alignment of bovine oocytes, regardless of the stage of the disease. However, the progression of endometriosis and the presence of endometrioma appear to have an even more negative impact on oocyte quality, and also impairs nuclear maturation. The addition of LC+n3 prevents meiotic oocyte damages induced by FF from women with endometriosis in the early and advanced stages. Thus, we suggest that inflammation, oxidative stress and deregulation of β -oxidation are factors involved in the alteration of oocyte quality and, consequently, worsening of the natural fertility of women with endometriosis.

Keywords: Endometriosis. Female infertility. Follicular fluid. Oocyte quality. L-carnitine. Omega-3. Docosahexaenoic acid. Eicosapentaenoic acid. Antioxidant. β -oxidation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: β -oxidação mitocondrial de ácidos graxos e sua regulação.....	42
Figura 2: Estrutura química da molécula de L-carnitina (nome IUPAC: 3-Hidroxi-4-trimetilamonio-butanoato; fórmula molecular: C ₇ H ₁₅ NO ₃ ; massa molar: 161,199 g/mol).....	44
Figura 3: Estrutura química das moléculas de ácidos graxos ômega-3: A-) Ácido eicosapentaenoico (EPA) e B-) Ácido docosahexaenóico (DHA).....	47
Figura 4: Vias metabólicas de síntese de ácidos graxos ômega-3 e ômega-6.....	48
Figura 5: Síntese e ações de mediadores lipídicos produzidos a partir dos ácidos araquidônico (AA), eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenóico (DHA).....	48
Figura 6: Estágios de maturação nuclear de oócitos bovinos maturados in vitro e analisados por microscopia confocal. A-) Metáfase I; B) Telófase I; C-) Metáfase II; D-) Ativação Partenogenética(TelófaseII).....	61
Figura 7: Posição de visualização do fuso meiótico de oócitos bovinos em metáfase II maturados in vitro e visualizados por microscopia confocal. A-) Polar (fuso não analisável), B-)Sagital(analisável).....	62
Figura 8: Classificação de oócitos bovinos maturados in vitro, em metáfase II analisáveis, de acordo com a organização do fuso meiótico e alinhamento cromossômico analisados por microscopia confocal. A-), B-) e C-) representam anormais e D-) normal.....	63
Figura 9: Desenho experimental.....	65
Figura 10: Fluxograma ilustrando recrutamento, inclusão e seguimento de mulheres inférteis doadoras de fluido folicular.....	69
Figura 11: Alterações meióticas oocitárias mais significativas encontradas em cada grupo: A-) Metáfase II normal no grupo FFControle; B-) Metáfase I no grupo FFEndometrioma; C-) a F-) Metáfase II anormal nos grupos FFEI/II, FFEIII/IV, FFEendometrioma e FFEendometrioma+LC+n3, respectivamente	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Variáveis clínicas e resposta à estimulação ovariana controlada das mulheres inférteis doadoras de fluido folicular sem endometriose (controle), com endometriose em estágios iniciais (EI/II) e em estágios avançados sem endometrioma (EIII/IV) e com endometrioma (Eendometrioma).....70

Tabela 2: Estágios de maturação nuclear, e porcentagem de oócitos em MII normais maturados *in vitro* em meio sem adição de FF (sem-FF), com adição de 1% de FF de pacientes inférteis sem endometriose (FFControle), com endometriose leve (FFEI/II), com endometriose moderada/grave sem endometrioma (FFEIII/IV) ou com endometriose moderada/grave com endometrioma (FFEndometrioma), suplementado com 0,6mg/mL de L-Carnitina, 0,4 nM de ácido docosahexaenóico e 0,6 nM de ácido eicosapentaenóico (LC+n3) visualizados por microscopia confocal.....73

LISTA DE ABREVIATURAS

8OHdG	8-hidróxi-2'-deoxiguanosina
AA	Ácido Araquidônico
ACO	Anticoncepcional Combinado Oral
ADP	Adenosina Difosfato
AL	Ácido Linoléico
ALA	Ácido α -linolênico
AP	Ativação Partenogenética
ASRM	Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva
ATP	Adenosina Trifosfato
CAT	Capacidade Antioxidante Total
CCO	Complexo Cumulus Oócito
CFA	Contagem de Folículos Antrais
CoA	Coenzima A
COX-2	Cicloxygenase-2
CP	Corpúsculo Polar
CPT1	Carnitina Palmitoil Transferase I
CPT2	Carnitina Palmitoil Transferase II
DGLA	Ácido di-homo- γ -linolênico
DHA	Ácido Docosahexaenóico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DPA	Ácido Docosapentaenóico
EO	Estresse Oxidativo
EOC	Estimulação Ovariana Controlada
EPA	Ácido Eicosapentaenóico
ERO	Espécie Reativa do Oxigênio
ETA	Ácido Eicosatetraenóico
FF	Fluido Folicular
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FOX ₁	Total de Hidroperóxidos
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GLA	Ácido γ -linolênico

GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
GSH	Glutathiona Reduzida
HC	Hospital das Clínicas
hCG	Gonadotrofina Coriônica Humana
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
ICSI	Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoide
IMC	Índice de Massa Corpórea
LC	L-carnitina
LOX	Lipoxigenase
LT	Leucotrieno
MDA	Malondialdeído
MI	Metáfase I
MII	Metáfase II
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
NAC	N-acetil-cisteína
OCTN	Transportador Catônico Orgânico
PBS	Tampão Fosfato Salino
PG	Prostaglandina
PUFA	Ácido Graxo Poli-insaturado
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	Reação quantitativa em cadeia da polimerase
SBF	Soro Bovino Fetal
SDA	Ácido Estearidônico
SOD	Superóxido Dismutase
TCA	Ciclo do Ácido Tricarboxílico
THA	Ácido Tetracosahexaenóico
TI	Telófase I
TPA	Ácido Tetracosapentaenóico
TRA	Técnicas de Reprodução Assistida
VLPSC	Videolaparoscopia
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	27
2. REVISÃO DA LITERATURA	33
2.1. Endometriose, estresse oxidativo e infertilidade	34
2.2. Fluido Folicular.....	37
2.3. Competência oocitária e fuso meiótico.....	39
2.4. β -oxidação e qualidade oocitária.....	41
2.5. L-carnitina	44
2.6. Ácidos graxos ω -3.....	46
3. OBJETIVOS	50
3.1. Objetivo geral	51
3.2. Objetivos específicos.....	51
4. MATERIAS E MÉTODOS	52
4.1. Seleção de pacientes doadoras de fluido folicular	53
4.1.1. Critérios de inclusão.....	53
4.2. Captação oocitária, coleta e processamento de amostras de fluido folicular.....	54
4.3. Estimulação Ovariana Controlada	55
4.4. Coleta de ovários bovinos, recuperação e classificação dos complexos cumulus-oócito.....	56
4.5. Maturação in vitro	56
4.6. Preparo das soluções de L-carnitina e dos ácidos graxos ω -3..	58
4.6.1 L-carnitina.....	58
4.6.2 Ácidos graxos ω -3.....	58
4.7. Imunofluorescência para visualização de microtúbulos e cromossomos.....	59
4.8. Classificação oocitária baseada na morfologia do fuso meiótico e no alinhamento cromossômico por microscopia confocal.....	59
4.9. Obtenção da variável primária.....	63
4.10. Obtenção de variáveis secundárias.....	64
4.11. Obtenção das variáveis clínicas secundárias.....	64
4.12. Desenho experimental.....	65

4.13. Análise estatística.....	65
4.14. Cálculo Amostral.....	66
5. RESULTADOS.....	67
5.1. Recrutamento de pacientes doadoras de FF	68
5.2. Dados clínicos doadoras de FF.....	69
5.3. Maturação in vitro e microscopia confocal.....	70
6. DISCUSSÃO.....	75
7. CONCLUSÕES.....	83
BIBLIOGRAFIA	85
APÊNDICE A: Caracterização das pacientes doadoras de fluidos foliculares utilizados em cada replicata de maturação in vitro de oócitos bovinos.....	102
APÊNDICE B: Dados de estágios de maturação nuclear, e porcentagem de oócitos em MII normais de acordo com as oito replicatas de maturação in vitro de oócitos bovinos realizadas.....	103
MANUSCRITO	104

1. INTRODUÇÃO

A endometriose é uma doença ginecológica, inflamatória e estrógeno dependente, caracterizada pela presença e pelo crescimento de tecido endometrial (glândulas e estroma) fora da cavidade uterina (KENNEDY *et al.*, 2005). Dor pélvica, dismenorreia, dispareunia e infertilidade são alguns dos sintomas frequentes da endometriose que, por outro lado, pode ser assintomática (KENNEDY *et al.*, 2005; BELLELIS *et al.*, 2010; SINGH *et al.*, 2014).

Estudos populacionais estimam uma prevalência de 0,8-6% de endometriose na população global (MOEN; SCHEI, 1997; ABBAS *et al.*, 2012; FULDEORE; SOLIMAN, 2017). Entretanto, a prevalência da endometriose aumenta para 25-50% na população de mulheres inférteis, e entre as mulheres com endometriose, aproximadamente, 30-50% apresentam problemas com infertilidade (MISSMER *et al.*, 2004). Um estudo avaliando uma grande coorte de mulheres em idade reprodutiva (<35 anos), reportou um risco de infertilidade duas vezes maior em mulheres com endometriose comparado àquelas mulheres sem a doença (MEULEMAN *et al.*, 2009).

Entretanto, a endometriose é uma doença heterogênea com lesões peritoneais variando de um simples implante peritoneal superficial de 1 mm até a presença de grandes endometriomas e obliteração do fundo de saco de Douglas (ASRM, 1997), e ainda mais raro, endometriose fora da cavidade pélvica (CHAMIÉ *et al.*, 2018). A Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (ASRM), visando padronizar os estágios da endometriose, propôs um sistema de classificação baseado na localização (peritônio, ovários), tamanho e profundidade das lesões de endometriose, presença de obliteração do fundo de saco de Douglas e presença e tipos de aderências afetando ovários e tubas uterinas (ASRM, 1997). Uma pontuação é designada para cada tipo de achado, e então, a endometriose é classificada como mínima (estágio I – pontuação de 1-5), leve (estágio II – pontuação de 6-15), moderada (estágio III – pontuação de 16-40) e grave (estágio IV – pontuação de >40) (ASRM, 1997).

Fica claro que mulheres que apresentam estágios mais avançados da endometriose (III/IV) podem apresentar um comprometimento anatômico da cavidade pélvica dificultando a ovulação, a captação do óvulo pelas fímbrias das tubas uterinas, a fertilização, o transporte tubário do embrião e, possivelmente, a implantação embrionária (DE ZIEGLER; BORGHESE; CHAPRON, 2010), justificando a infertilidade.

Estudo utilizando modelo primata não-humano (babuínos), avaliou o impacto dos quatro estágios de endometriose sobre a fertilidade natural após acasalamentos ao longo de vários ciclos sexuais (D'HOOGHE *et al.*, 1996) e reportaram que a taxa de fecundidade por ciclo foi maior nas fêmeas livres de endometriose (controle) e com EI (22%) comparado ao grupo de fêmeas com EII, EIII e EIV (12%) (D'HOOGHE *et al.*, 1996). O grupo controle e EI apresentaram maior taxa de gestação por ciclo (19% e 24,4%, respectivamente) do que os grupos EII (9,6%), EIII (7,5%) e EIV (12,5%) (D'HOOGHE *et al.*, 1996). Esses dados sugerem que o avanço da endometriose apresenta impacto negativo sobre a fertilidade natural.

A presença de endometrioma também parece prejudicar a fertilidade feminina. O endometrioma é considerado um “pseudocisto” formado, na maioria dos casos, pela invaginação do córtex ovariano (BROSENS *et al.*, 2013). Cerca de 20-40% das mulheres com endometriose apresentam endometrioma (REDWINE, 1999; VERCELLINI *et al.*, 2003), que pode criar um ambiente citotóxico ao desenvolvimento folicular (PAFFONI *et al.*, 2018), diminuindo o número de folículos maduros no córtex ovariano adjacente (MANESCHI *et al.*, 1993; KITAJIMA *et al.*, 2011).

Entretanto, mesmo nos estágios iniciais da doença (I/II), quando não se observa um comprometimento anatômico da cavidade pélvica, já é observada uma diminuição da taxa da fecundidade mensal comparada com mulheres inférteis sem causa aparente (BÉRUBÉ *et al.*, 1998; PARAZZINI, 1999) evidenciando uma relação causal entre infertilidade e endometriose mesmo nos estágios iniciais.

É no ambiente folicular que ocorre a maturação e o desenvolvimento oocitário. O estresse oxidativo (EO) presente no ambiente peritoneal de mulheres com endometriose pode refletir no compartimento sistêmico do organismo e afetar o ambiente folicular, comprometendo a qualidade oocitária e, conseqüentemente, o potencial reprodutivo dessas pacientes (DA BROI; NAVARRO, 2016). O EO ocorre quando há um desequilíbrio entre espécies reativas e antioxidantes. Espécies reativas do oxigênio (EROs) são produtos intermediários do metabolismo celular normal (LOUSSE *et al.*, 2012). Para se auto protegerem dos efeitos deletérios das EROs, as células desenvolveram um sistema antioxidante para limitar e inativar as EROs, além de reparar os danos oxidativos estabelecidos (LOUSSE *et al.*, 2012).

O EO pode danificar diversas proteínas intracelulares (STADTMAN, 1992; BERLETT; STADTMAN, 1997) importantes para a organização do fuso celular

(ANTONIO *et al.*, 2000; FUNABIKI; MURRAY, 2000; ABRIEU *et al.*, 2001) podendo promover lesões no material genético e induzir o inadequado alinhamento cromossômico (BECKMAN; AMES, 1998; LIMOLI *et al.*, 1998). As anomalias meióticas podem, por sua vez, contribuir para a falência do desenvolvimento celular por meio de diferentes vias, que vão desde a incapacidade do oócito em completar a maturação, tornando-se incapaz de ser fertilizado, até a ocorrência de erros que não impossibilitem a fertilização, mas comprometam o desenvolvimento embrionário pré e/ou pós-implantação, bem como a viabilidade futura do conceito (PAVLOK; LUCAS-HAHN; NIEMANN, 1992; LONERGAN *et al.*, 1994; ARMSTRONG, 2001).

Programas de doação de óvulos indicam que a qualidade oocitária é um fator relevante no sucesso das Técnicas de Reprodução Assistida (TRA) em mulheres com endometriose (GARCIA-VELASCO; ARICI, 1999; GARRIDO *et al.*, 2000). Simón e colaboradores (1994) observaram taxas de implantação e de gestação semelhantes em mulheres com e sem endometriose que receberam oócitos de doadoras sem a doença (SIMÓN *et al.*, 1994). Entretanto, as taxas de implantação foram menores em mulheres sem a doença que receberam oócitos de mulheres com endometriose (SIMÓN *et al.*, 1994).

Oócitos humanos são extremamente raros e seu uso em estudos invasivos geralmente não é viável porque impede sua utilização nas TRA. Desta forma, estudos avaliando células do *cumulus* ou fluido folicular (FF) podem auxiliar no entendimento da aquisição da competência oocitária (DA BROI *et al.*, 2018a).

Estudo prévio de nosso grupo reportou que a adição de FF de mulheres inférteis com endometriose leve ao meio de maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos compromete a qualidade dos óvulos bovinos (avaliada por meio do alinhamento cromossômico e organização do fuso meiótico) quando comparado à adição de FF de mulheres inférteis sem endometriose (DA BROI *et al.*, 2014). Os antioxidantes L-carnitina (LC) e N-acetil-cisteína (NAC) preveniram esses danos meióticos oocitários, indicando que o EO está envolvido na etiopatogênese da infertilidade relacionada à endometriose, entretanto, a LC foi superior à NAC e preveniu completamente esses danos (GIORGI *et al.*, 2016).

A LC, além de sua função antioxidante, apresenta papel fundamental na geração de energia pela célula, pois sua principal função biológica é transportar ácidos graxos de cadeia longa do citosol para as mitocôndrias onde ocorre a β -oxidação, um processo que resulta na esterificação da LC para formar derivados de

acil-Carnitina, produzindo energia na forma de adenosina trifosfato (ATP) (EVANS; FORNASINI, 2003). A β -oxidação é essencial para a retomada da meiose oocitária e maturação nuclear em camundongos (DOWNS; MOSEY; KLINGER, 2009; PACZKOWSKI *et al.*, 2013; VALSANGKAR; DOWNS, 2013), suínos e bovinos (PACZKOWSKI *et al.*, 2013).

Ácidos graxos podem ser captados do FF pelas células da granulosa ou estarem armazenados intracelularmente no oócito em gotas lipídicas na forma de triacilglicerídeos e em fosfolipídios de membrana (DUNNING; RUSSEL; ROBKER, 2014), sendo que a oxidação de uma molécula de ácido graxo (ácido palmítico) gera, aproximadamente, 106 ATPs comparado aos 30 ATPs gerados pela oxidação de uma molécula de glicose (DUNNING; RUSSEL; ROBKER, 2014).

Apesar de resultados conflitantes (CHAVARRO *et al.*, 2007; CHAVARRO *et al.*, 2007; WAKEFIELD *et al.*, 2008; JUNGHEIM *et al.*, 2011), estudos em animais e humanos sugerem que uma dieta rica em ácidos graxos ômega-3 tem um impacto positivo na fertilidade, possivelmente devido a efeitos sobre a qualidade oocitária e a implantação embrionária (HAMMICHE *et al.*, 2011; NEHRA *et al.*, 2012; MORAN *et al.*, 2016). Estudo utilizando indução de endometriose em modelo murino, observou que a administração de ômega-3 previne a formação de lesões císticas de endometriose peritoneal (TOMIO *et al.*, 2013). E estudo *in vitro*, sugeriu que ômega-3 suprime a sobrevivência de células de lesão de endometriose, possivelmente por controlar o EO e a inflamação (GAZVANI *et al.*, 2001). Dois importantes ácidos graxos ômega-3 são: o ácido docosahexaenóico (DHA) e o ácido eicosapentaenóico (EPA).

Há dois estudos avaliando a adição de ômega-3 ao meio de MIV de oócitos bovinos (OSEIKRIA *et al.*, 2016; NIKOLOFF *et al.*, 2017). Oseikria e colaboradores (2016) mostraram que, em baixas concentrações, DHA aumenta a competência oocitária avaliada pelo aumento das taxas de clivagem e de formação de blastocistos após ativação partenogênética. Nikoloff e colaboradores (2017) mostraram que a adição de EPA melhora a qualidade oocitária observada pelo aumento da expansão das células do cumulus.

Não há na literatura estudos avaliando o impacto do estágio da endometriose sobre a qualidade oocitária e a possível prevenção de danos oocitários com a administração combinada de LC, DHA e EPA.

Dessa forma, hipotetizamos que: I-) os estágios avançados da endometriose (III/IV) têm impacto mais negativo sobre a qualidade oocitária do que os estágios iniciais (I/II) da doença; II-) em mulheres com endometriose em estágios avançados (III/IV), a presença de endometrioma no ciclo prejudica ainda mais a qualidade oocitária; e III-) LC e ácidos graxos ômega-3 previnem danos meióticos oocitários em mulheres inférteis com endometriose;

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Endometriose, estresse oxidativo e infertilidade

A endometriose, como já mencionado anteriormente, é definida como a presença de tecido endometrial fora da cavidade uterina e pode ser assintomática ou estar associada à dor (que manifesta-se como dismenorreia, dispareunia profunda, disquesia e disúria) e à infertilidade (KENNEDY *et al.*, 2005). É uma doença conhecida como estrógeno dependente visto que, em geral, a endometriose manifesta-se durante os anos reprodutivos da mulher (com um pico entre 25 e 35 anos) (PARAZZINI *et al.*, 2017).

Em meados de 1800, endometriose peritoneal, extraperitoneal, infiltração profunda, endometrioma ovariano e adenomiose foram agrupados sob o nome "adenomioma" (BENAGIANO; BROSENS, 2011). Somente na década de 1920 a adenomiose e a endometriose tornaram-se entidades separadas (BENAGIANO; BROSENS; LIPPI, 2014). Em 1925, Sampson criou o termo "endometriose" para relatar a presença de ilhas de mucosa uterina na cavidade peritoneal (BENAGIANO; BROSENS, 2006).

Há controvérsias sobre a origem dos tipos de endometriose (NISOLLE; DONNEZ, 1997), e portanto, são inúmeras as teorias que tentam explicar a origem da doença. A teoria da metaplasia celômica propõe que células mesoteliais celômicas do tecido peritoneal normal ou da superfície ovariana sofram metaplasia e se transformem em tecido endometrial ectópico (IWANOFF, 1898). As teorias dos remanescentes embrionários dos ductos de Muller, propõem que células embrionárias provenientes desses ductos embrionários, quando ativadas por algum mecanismo desconhecido, originam células semelhantes às do endométrio original (VON RECKLINGHAUSEN, 1895; RUSSELL, 1899). A teoria da metástase benigna explica a endometriose a partir da disseminação linfática e/ou venosa de células endometriais (HALBAN, 1924; SAMPSON, 1927). E ainda uma outra teoria propõe que células tronco originadas da medula óssea se diferenciam em células endometriais (SASSON; TAYLOR, 2008).

Sampson é o autor da teoria, atualmente, mais bem aceita sobre a etiopatogênese da endometriose, a teoria da menstruação retrógrada e implantação (SAMPSON, 1927). Essa teoria postula que células provenientes da descamação do endométrio, durante a menstruação, sofrem um refluxo pelas tubas uterinas até a cavidade pélvica onde se estabilizam e sobrevivem (SAMPSON, 1927). No entanto,

menstruação retrógrada acomete a maioria das mulheres com tubas p rvias, mas a endometriose se desenvolve somente em 10-15% delas (LOUSSE *et al.*, 2012), enfatizando o papel de outros fatores na patogênese da endometriose (BURNEY; GIUDICE, 2012).

Também são várias as teorias que tentam explicar a forma o do endometrioma. Uma delas postula que células endometriais da parede pélvica se aderem   superfície do ovário, o córtex ovariano invagina e o fluido de cor “chocolate” t pico   formado pelo acúmulo de restos menstruais resultantes do sangramento dos implantes de endometriose ativos (VIGAN  *et al.*, 2013). Uma segunda teoria postula que devido aos implantes endometriais, o ovário adere ao ligamento largo, essa aderência induz inflama o que leva a ovula o nesse local, e então, as células endometriais invadem o corpo lúteo recém-formado constituindo um pseudo-cisto (VERCELLINI *et al.*, 2009). E ainda, uma outra teoria apoia a teoria da metaplasia cel mica e diz que o mesotélio do ovário se invaginaria no córtex ovariano e que a metaplasia dessas células originariam o endometrioma (DONNEZ *et al.*, 1996).

O cont do presente no interior do endometrioma   caracterizado por um acúmulo de ferro e seus derivados, tornando o ambiente tóxico e hostil   foliculogênese (SANCHEZ *et al.*, 2014). Através da rea o de Fenton, o ferro livre pode gerar EROs provocando danos a macromoléculas essenciais [ cido desoxirribonucleico (DNA), proteínas e lipídios] para o funcionamento celular (JOMOVA; VALKO, 2011) e qualidade oocitária.

Independentemente do tipo de lesão e da origem das células endometriais ectópicas, alguns mecanismos parecem contribuir para o desenvolvimento da doença, como: número e quantidade de fluxos menstruais, altera es da sinaliza o do estrog nio, resistência a progesterona, inflama o exacerbada e EO (BURNEY; GIUDICE, 2012; VERCELLINI *et al.*, 2014; DONNEZ *et al.*, 2016; PATEL *et al.*, 2018).

Em mulheres, com endometriose há um aumento da ativa o de macrófagos na cavidade peritoneal (GAZVANI; TEMPLETON, 2002), gerando um ambiente hostil, que interfere na atividade normal de outras células peritoneais, favorecendo o desenvolvimento de implantes de endometriose (LOUSSE *et al.*, 2012) e contribuindo para a forma o de adesões peritoneais e angiog nese (TANBO; FEDORCSAK, 2017). Os macrófagos na cavidade peritoneal de mulheres com

endometriose acumulam ferro, provavelmente, como resultado da presença excessiva de sangue na pelve (VAN LANGENDONCKT; CASANAS-ROUX; DONNEZ, 2002). O ferro livre (não conjugado à proteínas) estimula a geração de EROs, promovendo o EO, que por sua vez favorece a progressão da endometriose via dano peritoneal, exposição do tecido conjuntivo, neoangiogênese e proliferação celular endometrial aumentada (LOUSSE *et al.*, 2012; VERCELLINI *et al.*, 2014).

Estudos sugerem que EO esteja relacionado com a patogênese da infertilidade relacionada à endometriose (AGARWAL; GUPTA; SHARMA, 2005; DA BROI; NAVARRO, 2016; SCUTIERO *et al.*, 2017). No soro, mulheres inférteis com endometriose apresentam diminuição da atividade da superóxido dismutase (SOD) (PRIETO *et al.*, 2012) e da capacidade antioxidante total (CAT) (DA BROI *et al.*, 2016; NASIRI *et al.*, 2017; DA BROI *et al.*, 2018b), e aumento dos níveis de malondialdeído (MDA) (NASIRI *et al.*, 2017) e de total de hidroperóxidos (FOX₁) (DA BROI *et al.*, 2018b) comparado a mulheres sem a doença. E no FF, há um aumento de peróxidos lipídicos (NASIRI *et al.*, 2017), EROs, MDA, óxido nítrico (SINGH *et al.*, 2013b) e de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8OHdG) (DA BROI *et al.*, 2016; DA BROI *et al.*, 2018b), e uma diminuição da CAT, SOD, da catalase, glutathiona peroxidase, glutathiona redutase e vitaminas A, C e E (PRIETO *et al.*, 2012; SINGH *et al.*, 2013b; NASIRI *et al.*, 2017) comparado a mulheres sem a doença.

Alterações do ambiente folicular pelo EO na endometriose podem prejudicar a qualidade oocitária por causar danos diretos ao DNA (DA BROI *et al.*, 2016), prejudicar a organização do fuso meiótico (DA BROI *et al.*, 2014; GOUD *et al.*, 2014) e o funcionamento mitocondrial (XU *et al.*, 2015), e ainda alterar a zona pelúcida (GOUD *et al.*, 2014).

2.2. Fluido Folicular

O FF é uma solução ligeiramente viscosa, cor de palha e de pH próximo a 7,0 encontrado no interior de folículos ovarianos a partir da fase antral inicial entre as camadas das células da granulosa (EDWARDS, 1974). Essa solução é derivada do plasma sanguíneo e de produtos secretados pelo oócito, células da granulosa e da teca (RODGERS; IRVING-RODGERS, 2010).

Através da rede de capilares tecais, o plasma sanguíneo forma um exsudato entre as camadas de células da granulosa, por isso a semelhança na composição do FF e plasma (RODGERS; IRVING-RODGERS, 2010). Com relação a componentes de baixo peso molecular, o FF e plasma são extremamente semelhantes, entretanto, eles diferem com relação a proteínas de tamanho maior que 100kDa, sendo estas menos concentradas no FF (GOSDEN *et al.*, 1988). Isso acontece, pois a barreira hemato-folicular, localizada na lâmina basal do folículo e nos capilares tecais, impede a passagem de compostos maiores que 100kDa do plasma para o FF (SHALGI *et al.*, 1973; ZHOU *et al.*, 2007). Essa barreira também dificulta a passagem de grandes moléculas produzidas pelo oócito e células da granulosa do FF para o sangue, estabilizando assim um potencial gradiente osmótico (RODGERS; IRVING-RODGERS, 2010), que possibilita o crescimento do folículo ovariano humano até 23 mm podendo apresentar até 5 mL de FF (BÄCHLER *et al.*, 2014).

A composição do FF varia de acordo com o crescimento folicular e reflete processos fisiológicos e patológicos (EDWARDS, 1974), sendo considerado um instrumento para determinação de biomarcadores da qualidade oocitária (REVELLI *et al.*, 2009; DUMESIC *et al.*, 2015). O FF também controla o fim da meiose (SIRARD; RICHARD; MAYES, 1998), e auxilia na atração (EISENBACH, 1999), motilidade (MBIZVO; BURKMAN; ALEXANDER, 1990) e reação acrossômica (DE JONGE *et al.*, 1993) dos espermatozoides.

Alguns estudos reportam alterações em marcadores inflamatórios (XU *et al.*, 2006; FALCONER *et al.*, 2009; LAMAITA *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2012; SINGH *et al.*, 2013a; CHOI *et al.*, 2015; SINGH *et al.*, 2016; SANTANAM, ZONERAICH; PARTHASARATHY, 2017; WU *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2017), hormonais (PELLICER *et al.*, 1998; SMITH *et al.*, 2002; WUNDER *et al.*, 2005; FALCONER *et al.*, 2009) e relacionados ao EO (PRIETO *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2013; SINGH *et al.*, 2013b; CHOI *et al.*, 2015; DA BROI *et al.*, 2016; DE LIMA *et al.*, 2017; NASIRI *et al.*,

2017; DA BROU *et al.*, 2018b) no FF de mulheres com endometriose comparado àquelas mulheres sem a doença. Outros estudos comparam a composição do FF de mulheres com endometriose em estágios iniciais *versus* endometriose avançada (PELLICER *et al.*, 1998; CUNHA-FILHO *et al.*, 2003; SANTANAM, ZONERAICH; PARTHASARATHY, 2017; ZHANG *et al.*, 2017). E, também há estudos avaliando o impacto da presença de endometrioma na composição do FF de mulheres com endometrioma unilateral (OPØIEN *et al.*, 2013; SANCHEZ; PAPALEO, *et al.*, 2014; BENAGLIA *et al.*, 2015; NAKAGAWA *et al.*, 2016; GIACOMINI *et al.*, 2017).

2.3. Competência oocitária e fuso meiótico celular

O fuso meiótico de oócitos humanos em metáfase II (MII) é uma estrutura em forma de barril, temporária e dinâmica, composta por microtúbulos formados por dímeros de tubulina que se polimerizam e despolimerizam nos diversos estágios do ciclo celular (CHOI *et al.*, 2007) e associada ao córtex oocitário e sua rede de microfilamentos subcorticais (KIM *et al.*, 1998; WANG; KEEFE, 2002; MANDELBAUM *et al.*, 2004), sendo essencial para garantir a fidelidade da segregação cromossômica durante a meiose (VOLARCIK *et al.*, 1998; VAN BLERKOM; DAVIS, 2001; DE SANTIS *et al.*, 2005). Desta forma, a fecundação e o desenvolvimento embrionário dependem da integridade morfológica e funcional desta estrutura celular.

Além disso, o fuso é extremamente sensível à ação de diversos fatores (HU *et al.*, 2001; EICHENLAUB-RITTER; SHEN; TINNEBERG, 2002; MULLEN *et al.*, 2004), entre os quais o EO, passível de promover anomalias meióticas, instabilidade cromossômica, aumento da apoptose e comprometimento do desenvolvimento embrionário pré-implantação (LIU *et al.*, 2003; NAVARRO; LIU; KEEFE, 2004; NAVARRO *et al.*, 2006). Estudos avaliando os potenciais mecanismos envolvidos na gênese das alterações do fuso celular relacionadas ao EO, evidenciaram que o mesmo pode danificar diversas proteínas intracelulares (STADTMAN, 1992; BERLETT; STADTMAN, 1997), algumas das quais, importantes para a organização do fuso celular (ANTONIO *et al.*, 2000; FUNABIKI; MURRAY, 2000; ABRIEU *et al.*, 2001) podendo promover lesões no DNA e induzir o inadequado alinhamento cromossômico (BECKMAN; AMES, 1998; LIMOLI *et al.*, 1998).

As anomalias meióticas podem, por sua vez, contribuir para a falência do desenvolvimento celular por meio de diferentes vias, que vão desde a inabilidade do oócito em completar a maturação, tornando-se incapaz de ser fertilizado, até a ocorrência de erros que não impossibilitem a fertilização, mas comprometam o desenvolvimento embrionário pré e/ou pós-implantação, bem como a viabilidade futura do conceito (PAVLOK; LUCAS-HAHN; NIEMANN, 1992; LONERGAN *et al.*, 1994; ARMSTRONG, 2001; MIAO *et al.*, 2018).

Um estudo de Mansour e colaboradores (2009) demonstrou que o fluido peritoneal de mulheres com endometriose pode promover anomalias nos microtúbulos e cromossomos de oócitos de camundongos, além de aumento da

apoptose embrionária (MANSOUR *et al.*, 2009). Estas anomalias foram reduzidas após suplementação do meio de cultivo com LC, um antioxidante, sugerindo que substâncias presentes no fluido peritoneal de portadoras desta doença promovem comprometimento da qualidade oocitária e embrionária, tendo o EO como provável mediador (MANSOUR *et al.*, 2009).

Estudos evidenciaram que o FF de pacientes com endometriose apresenta aumento dos níveis de espécies reativas e diminuição da CAT (PRIETO *et al.*, 2012; SINGH *et al.*, 2013b). O aumento de EROs no FF pode afetar a qualidade e o desenvolvimento embrionário (DAS *et al.*, 2006; YALÇINKAYA *et al.*, 2013). Estudos de nosso grupo mostraram que o FF de mulheres inférteis com endometriose leve compromete expressivamente o fuso meiótico de oócitos bovinos maturados *in vitro*, mesmo na menor concentração testada (1%) (DA BROU *et al.*, 2014; GIORGI *et al.*, 2016); sendo o EO um fator envolvido, visto que a adição de antioxidantes preveniram esses danos, ao menos parcialmente (GIORGI *et al.*, 2016).

2.4. β -oxidação e qualidade oocitária

Qualidade oocitária pode ser definida como a competência do oócito retomar a meiose (quebra da vesícula germinativa) atingindo o estágio de MII, acumular ácidos ribonucleicos (RNAs), proteínas, lipídios e reorganizar as organelas de seu citoplasma, ou seja, ter condições para ser fertilizado por um espermatozoide e ter recursos suficientes para prover o desenvolvimento embrionário até a implantação.

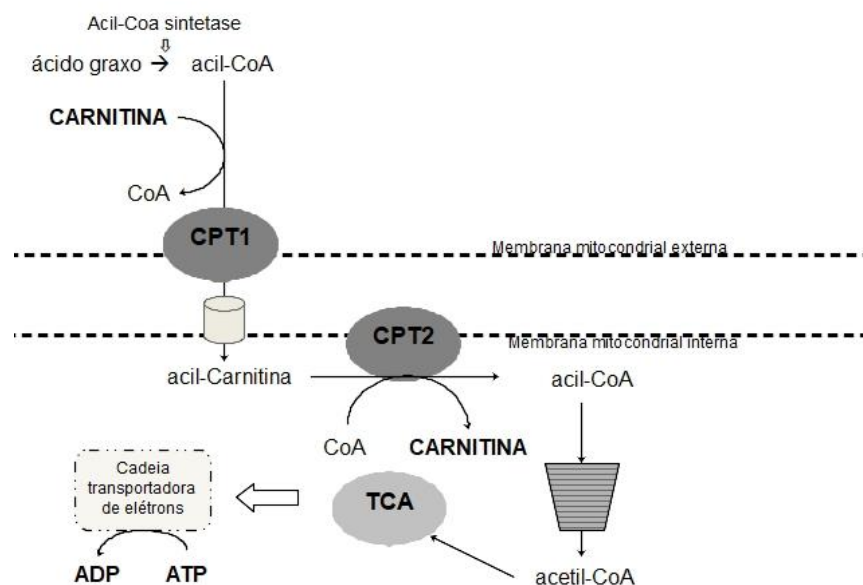
Durante a maturação oocitária, o oócito cresce e gradualmente adquire competência de ser fertilizado e de se desenvolver em um embrião e, subsequentemente, um feto (DUNNING *et al.*, 2010). Qualidade oocitária e competência de desenvolvimento estão intimamente associadas com metabolismo e taxa metabólica do complexo *cumulus* oócito (CCO) (BIGGERS, WHITTINGHAM, DONAHUE, 1967; DOWNS; HUNZICKER-DUNN, 1995; SUGIURA; PENDOLA; EPPIG, 2005; PREIS; SEIDEL; GARDNER, 2007; THOMPSON; LANE; GILCHRIST, 2007). Lipídios são potenciais recursos de ATP através da β -oxidação de ácidos graxos nas mitocôndrias (DUNNING *et al.*, 2010), sendo que a oxidação de um ácido palmítico ($C_{16}H_{32}O_2$) gera 106 ATPs e de uma glicose ($C_6H_{12}O_6$) gera, aproximadamente, 30 ATPs (DUNNING; RUSSEL; ROBKER, *et al.*, 2014).

No FF, os ácidos graxos podem estar livres (ligados ou não a proteínas) ou estarem no interior de lipoproteínas. Dessa forma, os ácidos graxos presentes no FF podem entrar no CCO de duas formas: I-) podem atravessar diretamente a bicamada lipídica; ou II-) podem ser carreados por uma proteína transportadora que ativa receptores específicos na membrana plasmática permitindo a entrada no interior da célula (células da granulosa e/ou oócito) (DUNNING; RUSSEL; ROBKER, *et al.*, 2014).

Além das fontes extracelulares, ácidos graxos na forma de triacilglicerol podem ser armazenados em membranas celulares e no interior das células do *cumulus* e oócitos em gotas lipídicas no citosol (DUNNING; RUSSEL; ROBKER *et al.*, 2014). Essas gotas lipídicas são circundadas por uma monocamada de fosfolipídios coberta por uma capa de proteínas da família perilipina (que regula o tamanho das gotas e que limita a ação de lipases) permitindo a atividade lipolítica mediante condições metabólicas e hormonais (DUNNING; RUSSEL; ROBKER *et al.*, 2014).

A primeira etapa para ocorrer a β -oxidação é a entrada de ácidos graxos na matriz mitocondrial (local onde se encontram as enzimas específicas para essa via metabólica), entretanto, ácidos graxos de cadeia longa presentes no citosol não conseguem atravessar a membrana mitocondrial (SCHULZ, 1991). Portanto, esses compostos são ativados pela enzima acil-Coenzima A(CoA) sintetase, gerando acil-CoA (FRITZ; MARQUIS, 1965; SCHULZ, 1991; EVANS; FORNASINI, 2003). Então, acil-carnitina é formada a partir da transesterificação de acil-CoA e pela enzima carnitina palmitoil transferase I (CPT1) presente na membrana externa da mitocôndria (FRITZ; MARQUIS, 1965; SCHULZ, 1991; EVANS; FORNASINI, 2003). A enzima acil-carnitina translocase age transferindo o complexo acil-carnitina para a enzima carnitina palmitoil transferase II (CPT2), presente na membrana interna da mitocôndria, que então regenera a carnitina e acil-CoA (FRITZ; MARQUIS, 1965; SCHULZ, 1991; EVANS; FORNASINI, 2003). A acil-Coa entra na β -oxidação gerando ATP (FRITZ; MARQUIS, 1965; SCHULZ, 1991; EVANS; FORNASINI, 2003). A Figura 1 ilustra o processo de β -oxidação mitocondrial.

Figura 1: β -oxidação mitocondrial de ácidos graxos e sua regulação



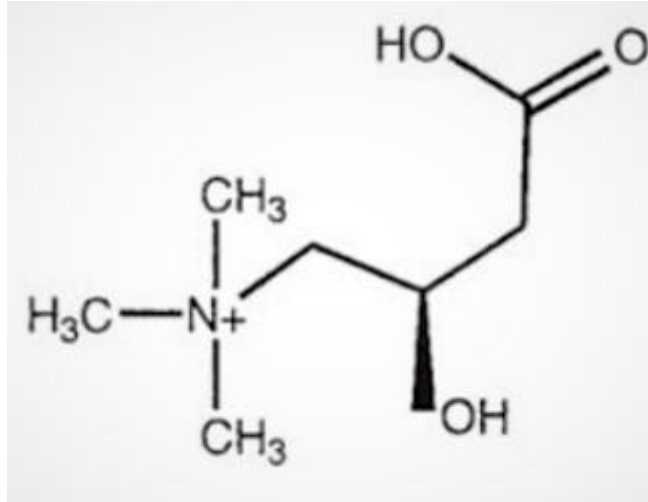
O transporte de ácidos graxos de cadeia longa (acil-CoA) para a matriz mitocondrial é catalisada pela CPT1, que requer a presença de carnitina para formar acil-carnitina. Dentro da mitocôndria, a CPT2 restaura a acil-CoA que entra na β -oxidação gerando acetil-CoA que, por sua vez, gera ATP através do TCA e da cadeia transportadora de elétrons. Nota: ADP: Adenosina Difosfato, ATP: Adenosina Trifosfato; CPT1: Carnitina Palmitoil Transferase I; CPT2: Carnitina Palmitoil Transferase II; CoA: Coenzima A; TCA: Ciclo do Ácido Tricarboxílico.. imagem adaptada de (DUNNING; ROBKER, 2012).

Dunning e colaboradores (2010) avaliaram a β -oxidação em CCOs através da quantificação de $^3\text{H}_2\text{O}$ no meio de cultivo *in vitro* gerado a partir da oxidação de [3H]palmitato e pela expressão de mRNA *Cptb1* durante a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário *in vivo* utilizando modelo murino (DUNNING *et al.*, 2010). O estudo mostrou que a expressão de *Cptb1* aumenta seguindo a administração de gonadotrofina coriônica humana (hCG), que induz a maturação oocitária e a ovulação, e os níveis de $^3\text{H}_2\text{O}$ também aumentam em CCOs maturados *in vitro* comparados àqueles imaturos (DUNNING *et al.*, 2010). A importância do metabolismo de lipídios para a competência oocitária e o desenvolvimento embrionário foi demonstrada pela taxa de desenvolvimento embrionário *in vitro* utilizando um inibidor (etomoxir - inibe CPT1) ou um ativador (LC) da β -oxidação (DUNNING *et al.*, 2010). O etomoxir prejudicou o desenvolvimento de blastocistos e a LC ativou a β -oxidação e melhorou a taxa de formação de blastocistos (DUNNING *et al.*, 2010).

2.5. L-carnitina

A carnitina é uma amina quaternária (3-hidroxi-4-N-trimetilamino-butanoato) cuja fórmula molecular é $C_7H_{15}NO_3$ e peso molecular 161,199 g/mol (Figura 2). A síntese de carnitina no organismo ocorre a partir de dois aminoácidos essenciais, a lisina e a metionina, sendo indispensável a presença de ferro, ácido ascórbico, niacina e vitamina B6 (EVANS; FORNASINI, 2003), e LC também pode ser obtida a partir da alimentação, principalmente, através de carnes vermelhas.

Figura 2: Estrutura química da molécula de L-carnitina (nome IUPAC: 3-Hidroxi-4-trimetilamonio-butanoato; fórmula molecular: $C_7H_{15}NO_3$; massa molar: 161,199 g/mol).



O oócito e as células do *cumulus* não expressam enzimas relacionadas a todas as etapas da síntese de LC, entretanto, expressam todo o maquinário enzimático necessário para a β -oxidação (MONTJEAN *et al.*, 2012). Por ser uma molécula hidrossolúvel, a LC presente no FF ou adicionada ao meio de MIV deve entrar nas células do *cumulus* e oócitos através dos transportadores catiônicos orgânicos (OCTN – em inglês *Organic Cation Transporters*), localizados na superfície da membrana plasmática (TAMAI *et al.*, 1998).

Como antioxidante, a LC diminui os níveis de produtos da peroxidação lipídica e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (YAZAKI *et al.*, 2013). A suplementação oral com LC diminui os níveis de MDA, aumenta a atividade sérica das enzimas catalase, SOD e glutatona peroxidase em pacientes com doença arterial coronariana (LEE *et al.*, 2014).

Devido a sua função no metabolismo energético e sua propriedade antioxidante, a LC também tem sido utilizada durante a MIV oocitária. Em modelo experimental suíno, LC aumentou a taxa de formação de blastocistos após ativação partenogénica (AP), diminuiu apoptose em blastocistos, diminuiu níveis de EROs nos oócitos e aumentou os níveis de glutathiona reduzida (GSH) oocitário (WU *et al.*, 2011). Em outro estudo, também utilizando modelo suíno, a LC aumentou a taxa de maturação nuclear oocitária, aumentou a taxa de clivagem, assim como aumentou a densidade mitocondrial oocitária e diminuiu os níveis de EROs (SOMFAI *et al.*, 2011). Em modelo bovino, a LC aumentou a taxa de maturação nuclear oocitária e aumentou a taxa de formação de blastocistos (CHANKITISAKUL *et al.*, 2013; PHONGNIMITR *et al.*, 2013). E em modelo murino, a LC aumentou a taxa de maturação nuclear oocitária e melhorou a atividade e distribuição mitocondrial de oócitos (MOAWAD *et al.*, 2014).

Mansour e colaboradores (2009) avaliaram o efeito de LC em prevenir danos ao fuso celular de oócitos murinos em contato com fluido peritoneal de mulheres com endometriose. Este estudo mostrou que a LC foi capaz de prevenir os danos meióticos oocitários, além de diminuir apoptose embrionária (MANSOUR *et al.*, 2009).

2.6. Ácidos graxos ômega-3

Ácidos graxos são compostos orgânicos do tipo ácido carboxílico que podem ser classificados de acordo com sua estrutura molecular em saturados, monoinsaturados e poli-insaturados (PUFAs) e de acordo com a possibilidade de ser ou não sintetizado no organismo em, respectivamente, não-essencial e essencial (TVRZICKA *et al.*, 2011). Ácidos graxos são geralmente apresentados como uma fórmula esquemática (C:p n-x) que indica o número de carbonos (C), o número de insaturações (p) e a posição da primeira insaturação a partir do grupo metila terminal (x). Como exemplo, neste trabalho, utilizamos o ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5 n-3) e o ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6 n-3).

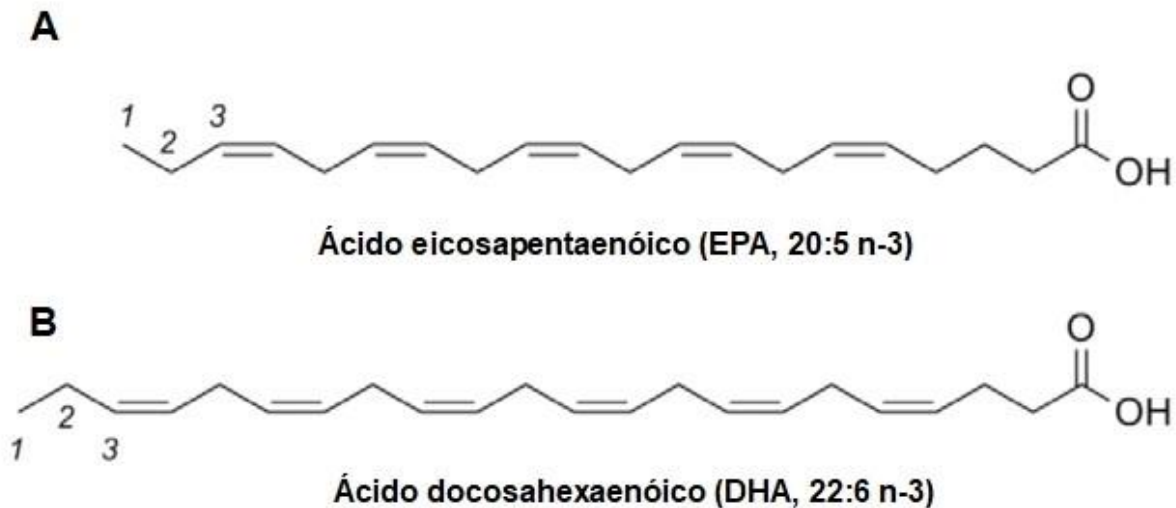
Os PUFAs são categorizados em: ômega-3, ômega-6 e ômega-9. PUFAs são essenciais para garantir uma adequada fluidez de membranas celulares (TVRZICKA *et al.*, 2011). As duplas ligações entre carbonos, em condições fisiológicas, preferencialmente, apresentam-se na configuração *cis*, ou seja, os dois hidrogênios da ligação covalente posicionam-se do mesmo lado, causando uma deflexão de 30° na molécula, o que a faz ocupar um maior espaço, diminuindo as forças de *van der Waals* e influenciando a fluidez e funcionamento das membranas biológicas (TVRZICKA *et al.*, 2011).

Intracelularmente, os ácidos graxos armazenados em fosfolipídios de membrana podem ser liberados com a ativação da enzima fosfolipase A2 mediada por proteínas quinase C dependentes de Ca^{2+} . O PUFA liberado do fosfolipídio pode ser metabolizado a eicosanóides ou docosanóides ou pode mediar reações, como por exemplo, estimular a expressão do maquinário oxidativo mitocondrial e promover a β -oxidação (FLACHS *et al.*, 2005).

EPA [nome IUPAC: Ácido (5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-eicosa- 5,8,11,14,17-pentenóico; fórmula molecular: $C_{20}H_{30}O_2$; massa molar: 302,451 g/mol] e o DHA [nome IUPAC: Ácido (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoico; fórmula molecular: $C_{22}H_{32}O_2$; massa molar: 328,488 g/mol] são representantes dos PUFAs ômega-3 (Figura 3). Nos mamíferos, a partir da ação de enzimas elongases e dessaturases é possível sintetizar EPA e DHA a partir de seu precursor ácido α -linolênico (ALA, 18:3 n-3) encontrado, principalmente, em sementes e folhas de algumas plantas (soja, linhaça, etc) e em seus óleos (TVRZICKA *et al.*, 2011). Entretanto, as enzimas necessária para a síntese de PUFAs ômega-3 são as

mesmas necessárias para a síntese de PUFAs ômega-6, sendo um processo bastante limitado, a conversão de ALA a EPA e DHA (WATHES; ABAYASEKARA; AITKEN, 2007).

Figura 3: Estrutura química das moléculas de ácidos graxos ômega-3: A-) Ácido eicosapentaenóico (EPA) e B-) Ácido docosahexaenóico (DHA)



Os PUFAs ômega-6 são sintetizados a partir do ácido linoleico (AL, 18:2 n-6). AL é convertido em ácido γ -linolênico (GLA, 18:3, n-6) pela ação da enzima Δ -6-dessaturase e GLA é alongado para formar ácido di-homo- γ -linolênico (DGLA, 20:3, n-6). DGLA pode também ser convertido a ácido araquidônico (AA, 20:4, n-6) pela ação da enzima Δ -5-dessaturase (Figura 4). AA é o precursor da série 2 de prostaglandinas (PGs) e a série 4 de leucotrienos (LTs), que apresentam alto potencial inflamatório (Figura 5).

E a síntese de ômega-3 segue a seguinte via: ALA é convertido em ácido estearidônico (SDA, 18:4 n-3) pela enzima Δ -6-dessaturase, que sofre a ação de elongase convertendo-se em ácido eicosatetraenóico (ETA, 20:4 n-3) que é, então, convertido a EPA pela enzima Δ -5-dessaturase (Figura 4). EPA é precursor da série 3 de PGs, série 5 de LTs e série 5 de resolvinas, que apresentam baixo potencial inflamatório e ação anti-inflamatória (Figura 5).

A via de conversão de EPA a DHA (22:6 n-3) envolve a adição de dois carbonos ao EPA para formar ácido docosapentaenóico (DPA, 22:5 n-3), adição de mais dois carbonos para produzir ácido tetracosapentaenóico (TPA, 24:5 n-3) que é

então convertido a ácido tetracosahexaenóico (THA, 24:6 n-3) pela Δ -6-dessaturase, o THA é transportado para os peroxissomos onde dois carbonos são removidos na β -oxidação para formar DHA (Figura 4). DHA é precursor de docosanoídes anti-inflamatórios tais como resolvinas e protectinas (Figura 5).

Figura 4: Vias metabólicas de síntese de ácidos graxos ômega-3 e ômega-6

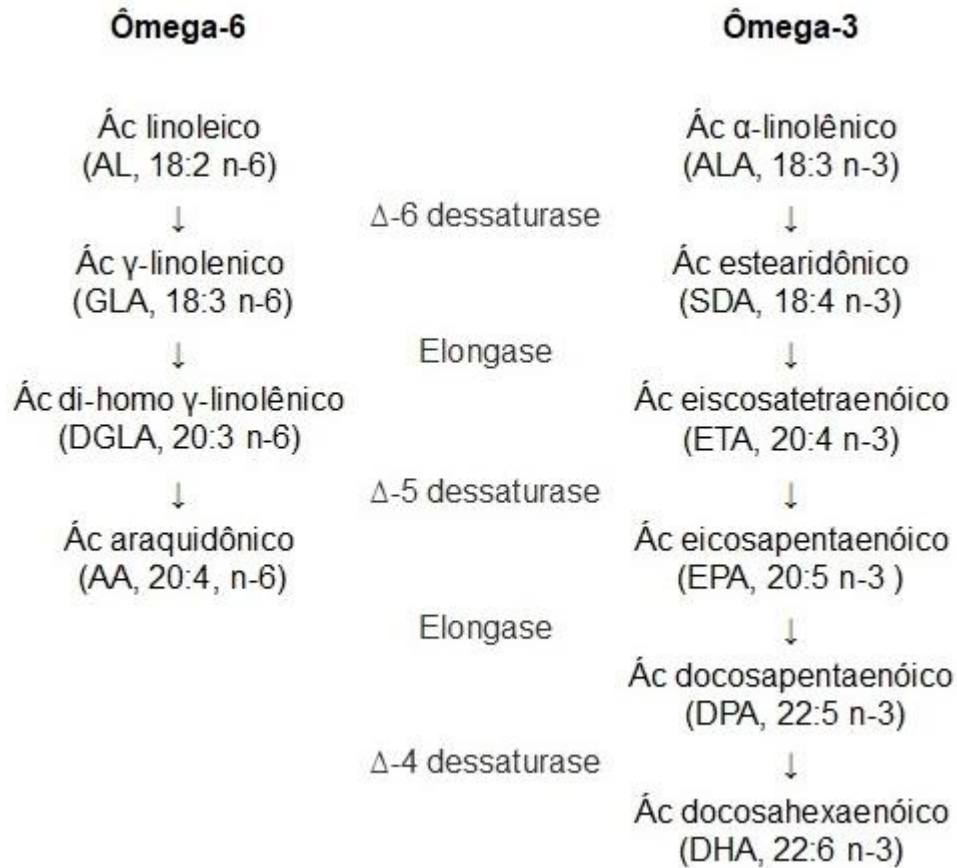
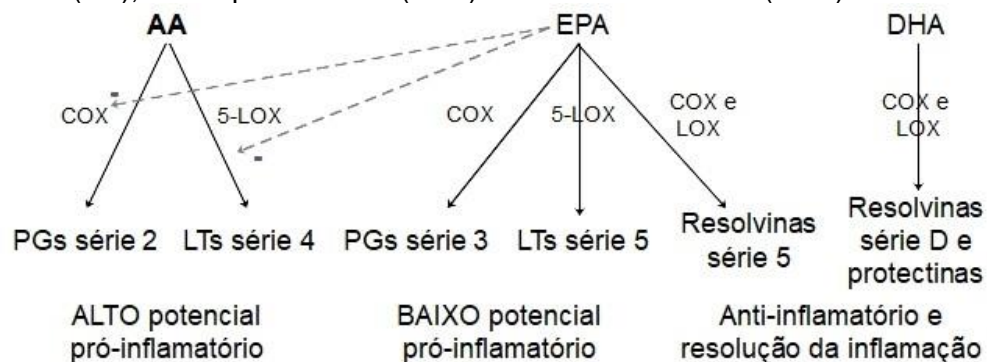


Figura 5: Síntese e ações de mediadores lipídicos produzidos a partir dos ácidos araquidônico (AA), eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenóico (DHA).



Nota: COX: ciclooxigenase; LOX: lipoxigenase; LT: leucotrieno; PG: prostaglandina.

Estudos utilizando modelos experimentais de indução cirúrgica de endometriose, mostraram efeitos benéficos da suplementação da dieta com ácidos graxos ômega-3 sobre a redução do tamanho de lesões de endometriose e diminuição da produção local de mediadores inflamatórios em ratos (NETSU *et al.*, 2008; AKYOL *et al.*, 2016) e em coelho (ATTAMAN *et al.*, 2014). Estudo *in vitro* reportou que ácidos graxos ômega-3 suprimem o crescimento e a sobrevivência *in vitro* de células endometriais de mulheres com e sem endometriose (GAZVANI *et al.*, 2001). Hopeman e colaboradores (2015) avaliaram a relação entre níveis circulantes de PUFA's em mulheres com e sem endometriose e reportaram que mulheres com altos níveis séricos de EPA tinham um risco 82% menor em ter endometriose comparado a mulheres com níveis baixos de EPA (HOPEMAN *et al.*, 2015).

Oseikria e colaboradores (2016) avaliaram a adição de diversas concentrações de DHA durante a MIV de oócitos bovinos sobre qualidade e competência oocitária. Os autores observaram que nas concentrações testadas (0, 1, 10 e 100 uM), DHA não teve efeito sobre a viabilidade oocitária e taxa de maturação (OSEIKRIA *et al.*, 2016). A concentração de 1uM de DHA durante a MIV promoveu uma maior taxa de clivagem e de formação de blastocisto após AP comparada com o grupo controle (OSEIKRIA *et al.*, 2016). A concentração de 10 uM não teve efeito sobre essas taxas, e a concentração de 100 uM diminuiu significativamente a clivagem (OSEIKRIA *et al.*, 2016).

E Nikoloff e colaboradores (2017) avaliaram a adição de diversas concentrações de EPA durante a MIV de oócitos bovinos sobre a taxa de maturação, genotoxicidade e citotoxicidade. A taxa de maturação não foi alterada pela adição de 1 nM e de 1 uM de DHA, entretanto, 1 mM significativamente diminuiu a taxa de maturação comparado ao grupo controle (NIKOLOFF *et al.*, 2017). 1 nM de DHA aumentou a expansão das células do *cumulus* após MIV comparado ao controle (NIKOLOFF *et al.*, 2017). Entretanto, 1 nM de DHA aumentou a frequência de danos ao DNA em células do *cumulus* (eletroforese em gel de célula única) comparado ao controle, 1 uM aumentou a taxa de apoptose em células do *cumulus* (Anexina V) comparado ao grupo controle e 1 mM diminuiu a viabilidade celular (*Tripán blue*), aumentou apoptose e diminuiu atividade mitocondrial (teste do MTT) de células do *cumulus* comparado ao controle (NIKOLOFF *et al.*, 2017).

3. *OBJETIVOS*

3.1. Objetivo geral:

Avaliar o impacto da adição de FF de mulheres inférteis com e sem endometriose e a suplementação com LC e ácidos graxos ômega-3 ao meio de MIV sobre a maturação nuclear e as taxas de normalidade meiótica de oócitos bovinos.

3.2. Objetivos específicos:

1. Comparar o impacto do FF de mulheres inférteis com endometriose em estágios iniciais (EI/II) e avançados [sem endometrioma (EIII/IV) e com endometrioma (Eendometrioma)] ao do FF de mulheres sem endometriose (FFControle) adicionados ao meio de maturação *in vitro* (MIV) sobre a maturação nuclear e as taxas de normalidade meiótica de oócitos bovinos avaliados por microscopia confocal.
2. Avaliar se a LC e os ácidos graxos ômega-3 (DHA e EPA) são capazes de prevenir os danos meióticos em oócitos bovinos induzidos por FF de mulheres inférteis com endometriose em estágios iniciais (I/II) e avançados (III/IV) durante a maturação *in vitro* (MIV).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Realizamos um estudo experimental previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP) (Processo HCRP nº 12201/2008) e pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da FMRP - USP (nº 169/2008). Optamos pelo uso de modelo experimental bovino, em virtude da similaridade no tamanho e morfologia ovarianos de humano e bovino, por ambas as espécies serem monovulatórias e policíclicas e por ser um material abundante, de baixo custo, de fácil manipulação (MALHI; ADAMS; SINGH, 2005; SANTOS; SCHOEVERS; ROELEN, 2014).

4.1. Seleção de pacientes doadoras de fluido folicular

Como doadoras de FF, foram elegíveis todas as pacientes submetidas à estimulação ovariana controlada (EOC) para a realização de injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) junto ao Setor de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP-USP, no período de Março a Outubro de 2013 e Maio/2016 a Setembro/2017. Todas as pacientes elegíveis que não apresentaram cancelamento inicial do ciclo de EOC e que completaram os critérios de inclusão (abaixo) foram convidadas a participar da pesquisa.

4.1.1. Critérios de inclusão

- Idade < 40 anos;
- Índice de massa corpórea (IMC) < 30 kg/m²;
- Concentração sérica do hormônio folículo estimulante (FSH) no terceiro dia do ciclo menstrual < 15 mUI/mL;
- Ausência de anovulação crônica;
- Ausência de hidrossalpinge;
- Ausência de doenças crônicas (tais como diabetes *melitus*, hipertensão arterial), doença cardiovascular, dislipidemia, lúpus eritematoso sistêmico ou qualquer outra doença reumatológica;
- Ausência de endocrinopatias descompensadas e não tratadas;
- Ausência de infecção por vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou qualquer infecção ativa;

- Não ser tabagista e etilista;
- Não ter usado medicações hormonais ou anti-inflamatórios hormonais ou não hormonais durante os 6 meses subsequentes à inclusão neste estudo.
- Exame de videolaparoscopia prévio.

O grupo controle foi composto por mulheres inférteis devido a fatores tubários e/ou cujo cônjuge apresentava infertilidade (fator masculino), sendo que todas as pacientes foram submetidas previamente ao exame de videolaparoscopia para inspeção da cavidade pélvica/abdominal e exclusão de endometriose.

O grupo endometriose foi subdividido em endometriose em estágios iniciais (mínima ou leve, EI/II), endometriose avançada (moderada ou grave, III/IV) sem a presença de endometrioma no ciclo (EIII/IV) e endometriose avançada com endometrioma no ciclo (Eendometrioma). O exame de videolaparoscopia prévio foi realizado para diagnóstico e classificação da endometriose de acordo com os critérios da ASRM (ASRM, 1997). As mulheres do grupo Eendometrioma apresentaram endometrioma no ciclo de EOC visualizado por ultrassonografia transvaginal.

O recrutamento de pacientes foi realizado em duas etapas: primeiramente, os prontuários foram analisados para avaliação de elegibilidade, verificação de exames e condição clínica da paciente, posteriormente, as pacientes foram brevemente entrevistadas para exclusão de qualquer dúvida com relação ao seu estado de saúde e estilo de vida.

4.2. Captação oocitária, coleta e processamento de amostras de fluido folicular

Amostras de FF foram obtidas durante a captação oocitária para realização de ICSI. Para evitar possível interferência de sucessivas punções ovarianas, FF foi obtido apenas do primeiro folículo (diâmetro ≥ 15 mm) do primeiro ovário puncionado.

Essas amostras foram imediatamente levadas ao laboratório de embriologia, onde as embriologistas checaram a presença de oócito e/ou células da granulosa. Os oócitos foram separados do FF para utilização durante as TRA e o FF foi centrifugado a 300 g por 10 minutos, aliquotado e armazenado a -80°C .

As amostras que não continham oócito e/ou células da granulosa foram excluídas, visto que, nesses casos, não seria possível afirmar que o folículo ovariano puncionado apresentava um oócito em processo de maturação.

FF de uma paciente de cada grupo (grupo controle, grupo endometriose em estágios iniciais, grupo endometriose em estágios avançados sem endometrioma e grupo endometriose em estágios avançados com endometrioma) foi utilizado individualmente em apenas em um experimento.

4.3. Estimulação ovariana controlada

No Setor de Reprodução Humana do HC-FMRP, todas as pacientes realizaram um exame de ultrassonografia transvaginal prévio ao início da EOC (pré-basal), quando anticoncepcional oral combinado (ACO) (Miranova®, Bayer ou Level®, Biolab) foi prescrito com o objetivo de sincronizar e programar o início da EOC.

Portanto, ACO foi iniciado no período menstrual do ciclo precedente à EOC e utilizado diariamente até cinco dias antes da data prevista para o início da EOC.e realização do ultrassom transvaginal basal.

De acordo com as características de cada paciente, dois protocolos de EOC distintos foram aplicados como descrito a seguir:

- Protocolo antagonista flexível: gonadotrofinas (150-300 UI/dia) foram administradas nos primeiros seis dias de EOC, com a dose diária ajustada de acordo com o crescimento folicular. Antagonistas do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH - ganirelix ou cetorelix 0,25 mg/dia) foram iniciados no dia em que a média do diâmetro do maior folículo foi ≥ 14 mm.
- Protocolo de estimulação mínima (citrato de clomifeno mais gonadotrofinas e antagonista de GnRH): citrato de clomifeno (100 mg/dia) foi administrado durante os primeiros cinco dias de EOC e as gonadotrofinas (150 UI/dia) foram administradas nos dias dois e quatro, e diariamente a partir do dia seis. O antagonista de GnRH (ganirelix ou cetorelix 0,25 mg/dia) foi iniciado no dia em que o diâmetro médio do maior folículo foi ≥ 14 mm.

O hCG recombinante (250 µg, Ovidrel®, Serono, Brasil) ou hCG urinário (10,000 IU, Choriomon®, Meizler, Brasil) foi administrado quando pelo menos um

folículo com 18 mm de diâmetro médio estava presente. Os oócitos foram captados 34 a 36 horas após a administração do hCG recombinante, e a fase lútea foi mantida pela administração da progesterona micronizada (600 mg/dia).

4.4. Coleta de ovários bovinos, recuperação e classificação dos complexos cumulus-oócito

Os ovários bovinos foram coletados no frigorífico Barra Mansa S.A, localizado no município de Sertãozinho – SP (há 20 Km de Ribeirão Preto) e transportados em recipiente térmico contendo solução salina (NaCl a 0,9%) a 35-38,5°C.

No laboratório, os ovários foram borrifados com álcool 70% e lavados e mantidos em solução salina contendo sulfato de estreptomicina (5 µg/mL) em banho-maria a 38,5°. Utilizando uma seringa de 10 mL e agulha de 22G, os folículos ovarianos com tamanho entre 2- 8 mm foram aspirados, e o conteúdo depositado em cálice cônico estéril mantido a 38,5°C. Após o término da aspiração folicular, o conteúdo aspirado permaneceu 10 minutos em repouso para deposição dos CCOs.

Então, o cálice contendo os CCOs foram levados à cabine de fluxo laminar para serem observados em lupa e classificados de acordo com suas características morfológicas. Apenas os CCOs com citoplasma homogêneo, circundado por três ou mais camadas compactas de células do *cumulus*, mesmo que parcialmente, foram selecionados (ADONA; LIMA VERDE LEAL, 2004; FERREIRA *et al.*, 2009a).

4.5. Maturação *in vitro*

Os CCOs selecionados foram lavados e manipulados em meio TCM 199 com 25 mM de HEPES [ácido N-(2-hidroxietilo)-piperazina-N'-2-etanesulfônico], L-glutamina e sais de Hank (Life Technologies GIBCO® 12350-039) suplementado com 20 µg/mL de piruvato de sódio, 10 µg/mL de gentamicina e 5% de soro bovino fetal inativado (SBF - GIBCO 10270-098) (meio de bancada).

Então, após a seleção morfológica, CCOs foram lavados em meio TCM 199 com 25 mM de HEPES, 2,2 g/L de bicarbonato de sódio, L-glutamina e sais de Earle (Life Technologies GIBCO® 12340-030) suplementado com 50 µg/mL de piruvato de sódio, 50 µg/mL de gentamicina, 1 µg/mL de estradiol, 20 µg/mL de FSH, 10% de

soro bovino fetal (SBF) e 2,5 UI/mL de hCG (Chorulon®) (meio de MIV) e foram separados aleatoriamente em 9 grupos experimentais (conforme abaixo):

- 1-) sem-FF: sem adição de FF ou LC ou ácidos graxos ômega 3;
- 2-) FFControle: com 1% de FF de paciente controle;
- 3-) FFControle+LC+n3: com 1% de FF de paciente controle + 0,6mg/mL de LC + 0,4 nM de DHA + 0,6 nM de EPA;
- 4-) FFEI/II: com 1% de FF de pacientes EI/II;
- 5-) FFEI/II+LC+n3: com 1% de FF de paciente EI/II + 0,6mg/mL de LC + 0,4 nM de DHA + 0,6 nM de EPA;
- 6-) FFEIII/IV: com 1% de FF de pacientes com EIII/IV sem endometrioma;
- 7-) FFEIII/IV+LC+n3: com 1% de FF de paciente EIII/IV sem endometrioma + 0,6mg/mL de LC + 0,4 nM de DHA + 0,6 nM de EPA;
- 8-) FFEEndometrioma: com 1% de FF de paciente EIII/IV com endometrioma;
- 9-) FFEEndometrioma+LC+n3: com 1% de FF de paciente EIII/IV com endometrioma + 0,6mg/mL de LC + 0,4 nM de DHA + 0,6 nM de EPA;

Após 22-24 horas de MIV, as células do *cumulus* foram separadas dos oócitos através de turbilhamento (pipetagem repetitiva) em meio de bancada em placas de vidro escavadas. Os oócitos desnudos foram fixados e mantidos por 30 minutos a 38,5°C em um tampão para estabilização de microtúbulos contendo 0,1 M de Pipes, 5 nM de MgCl₂.6H₂O, 2,5 nM de EGTA, 0,01% aprotinina, 1 nM DTT, 1 µM de Taxol, 0,5% Triton-X e 2% de formaldeído a 37%. O *pool* de oócitos de cada grupo foi armazenado em tubos de fundo cônico de 600 µL contendo 100 µL de solução fixadora em geladeira até a realização dos experimentos de imunofluorescência.

Visto que, durante a MIV oocitária, de acordo com cada grupo de tratamento, foi realizada a adição de FF, de LC e de ácidos graxos ômega-3 (DHA e EPA), optamos por concentrar o meio supracitado (meio de MIV) em 4%. O meio

concentrado 4% foi diluído até uma concentração normal naqueles grupos com adição de FF, LC e ácidos graxos (FFControle+LC+n3, FFEI/II+LC+n3, FFEIII/IV+LC+n3 e FFEndometrioma+LC+n3), já nos demais grupos, a concentração foi normalizada adicionando-se meio TCM 199 (Life Technologies GIBCO® 12340-030) puro filtrado; e assim conseguimos um ajuste das substâncias adicionadas indispensável ao processo de MIV. Os CCOs foram cultivados em gotas de 400 µL (aproximadamente, 20 oócitos por gota), a 38,5°C, 95% de umidade, 5% de CO₂ durante 22-24h, em placas NUNC® em um sistema de cultivo sem óleo mineral.

Durante as MIVs, optamos por utilizar uma concentração de 1% de FF visto que estudo prévio do grupo (DA BROI *et al.*, 2014) testou a adição de quatro diferentes concentrações de FF de mulheres inférteis com endometriose leve (1%, 5%, 10% e 15%) ao meio MIV e não reportou efeito dose-dependente. Assim, no presente estudo, optamos por utilizar a menor concentração de FF testada (1%).

4.6. Preparo das soluções de L-carnitina e dos ácidos graxos ômega-3

4.6.1. L-carnitina:

A concentração de LC (*Sigma Aldrich* C0283) utilizada para suplementar os experimentos de MIV conforme será descrito a seguir foi de 0,6 mg/mL (MANSOUR *et al.*, 2009; GIORGI *et al.*, 2016).

A solução estoque foi preparada em uma concentração 100 vezes maior que a solução trabalho (solução estoque: 60 mg/mL de LC) com água de injeção, filtrada em filtro de poros de 0,22 µm, alíquotada e armazenada a -20°C.

4.6.2. Ácidos graxos ômega 3

A concentração final de ácidos graxos ômega 3 utilizada para suplementar os experimentos de MIV conforme descritos a seguir foi de 1 nM (NIKOLOFF *et al.*, 2017). Sendo que 0,4 nM foi DHA (*Sigma Aldrich* D2534) e 0,6 nM EPA (*Sigma Aldrich* E2011). A proporção de 2:3 DHA/EPA foi escolhida baseando-se na composição de suplementos comerciais a base de óleo de peixe (Omega-3 das

marcas *Essential®*; *Sidney Oliveira®*; *Equaliv®*; *Country Life®*; *Solgar®*; *Catarienense®*) e em suplementos utilizados em ensaios clínicos randomizados [180 mg de EPA e 120 mg de DHA para mulheres com síndrome dos ovários policísticos que desejavam realizar TRA (NADJARZADEH *et al.*, 2015), 1200mg de EPA e 800 mg de DHA para mulheres obesas grávidas (HAGHIAC *et al.*, 2015), 180 mg de EPA e 120 mg de DHA para jovens mulheres com dismenorreia (RAHBAR; ASGHARZADEH; GHORBANI, 2012)].

As soluções estoques dos ácidos graxos foram preparadas em uma concentração 100 vezes maior que as concentrações finais (soluções estoque: 40 nM de DHA e 60 nM de EPA) com dimetilsulfóxido (DMSO), filtradas em filtro de poros de 0,22 µm e armazenadas a -20°C.

4.7. Imunofluorescência para visualização de microtúbulos e cromossomos

Os oócitos fixados foram retirados do fundo do tubo contendo solução fixadora e foram lavados 2 vezes em meio de lavagem tampão Salina Fosfato (PBS - *Phosphate Buffer Saline*) suplementado com 0,02% NaN₃, 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 mantidos nessa solução de lavagem em estufa a 38°C para bloqueio. Após 2 horas, os oócitos foram incubados com anticorpo primário anti-β-tubulina (Sigma T5293) *overnight* a 4-8°C.

Então, os oócitos foram novamente lavados em solução de lavagem e incubados com anticorpo policlonal anti-IgG de camundongo conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1:500, MP BIO 0855514) a 38,5°C por 2h. Os oócitos foram 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) sobre uma lâmina de vidro coberta por uma lamínula. As amostras foram visualizadas utilizando um microscópio confocal de alta performance (Confocal Leica TCS SP5, Leica Microsystems, Mannheim, Alemanha) em aumento óptico de 40X e os lasers Diodo 405 UV e HeNe 543.

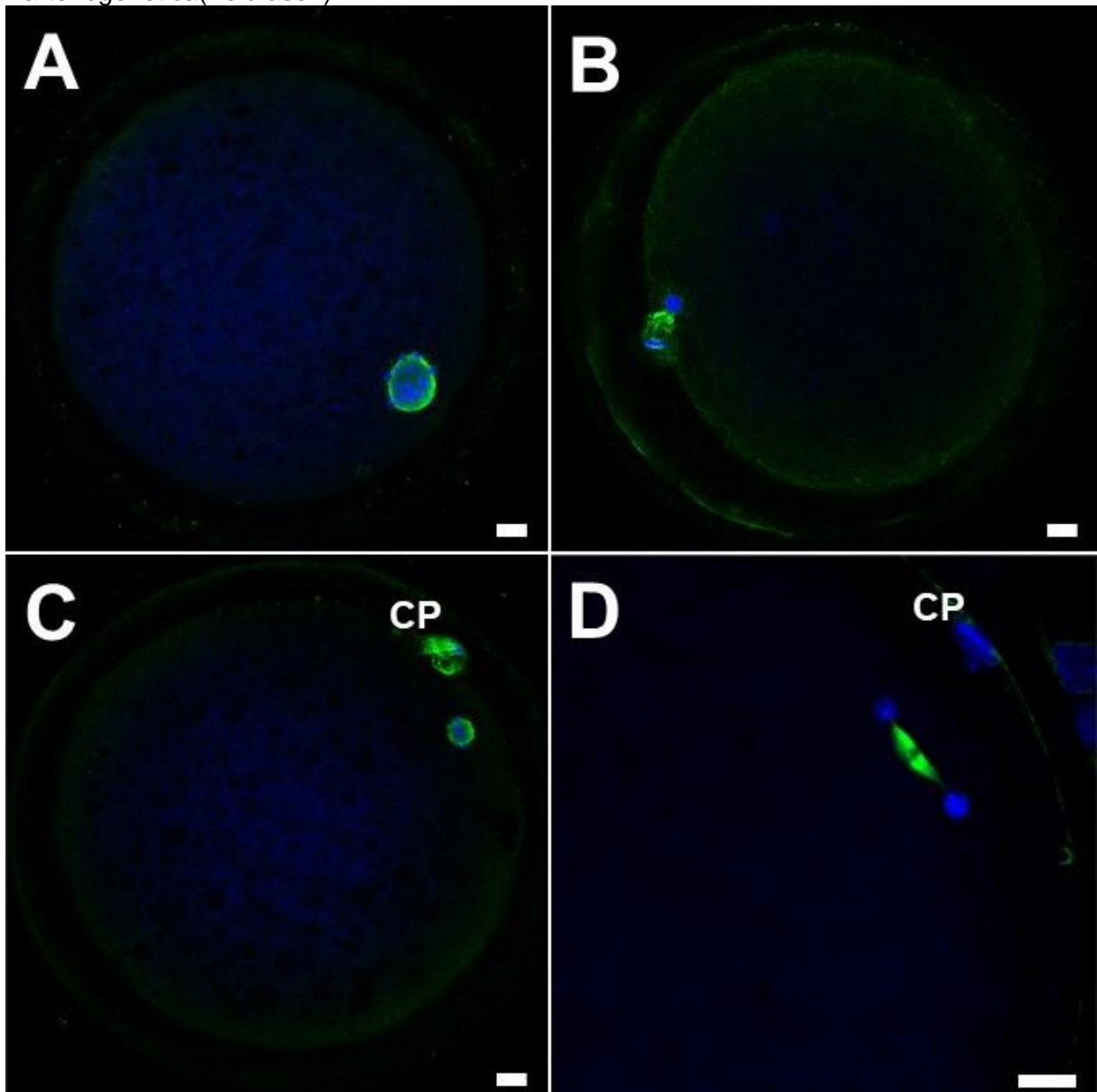
4.8. Classificação oocitária baseada na morfologia do fuso meiótico e no alinhamento cromossômico por microscopia confocal

Os oócitos foram classificados de acordo com o estágio de maturação nuclear: em metáfase I (MI – presença de uma placa metafásica no interior do oócito), telófase I (TI – presença de dois conjuntos cromossômicos interligados por fuso meiótico); ou metáfase II [MII - presença de uma placa metafásica no interior do oócito e de um corpúsculo polar (CP) entre o oócito e sua zona pelúcida]; ou como AP (caracterizado pela extrusão espontânea de um segundo CP sem ter ocorrido fertilização; ou caracterizada por telófase II) (Figura 6).

Os oócitos em MII foram subdivididos como analisáveis e não analisáveis de acordo com a posição de visualização da placa metafásica. Os oócitos foram considerados analisáveis quando o fuso meiótico podia ser visualizado em uma posição lateral ou sagital (microfilamentos observados em uma posição longitudinal, sendo possível a visualização dos dois polos do fuso meiótico) e os cromossomos dispostos em linha na região mediana do fuso e, considerados não analisáveis quando o fuso foi observado em uma posição polar (JU *et al.*, 2005), que impede uma visão detalhada do fuso.

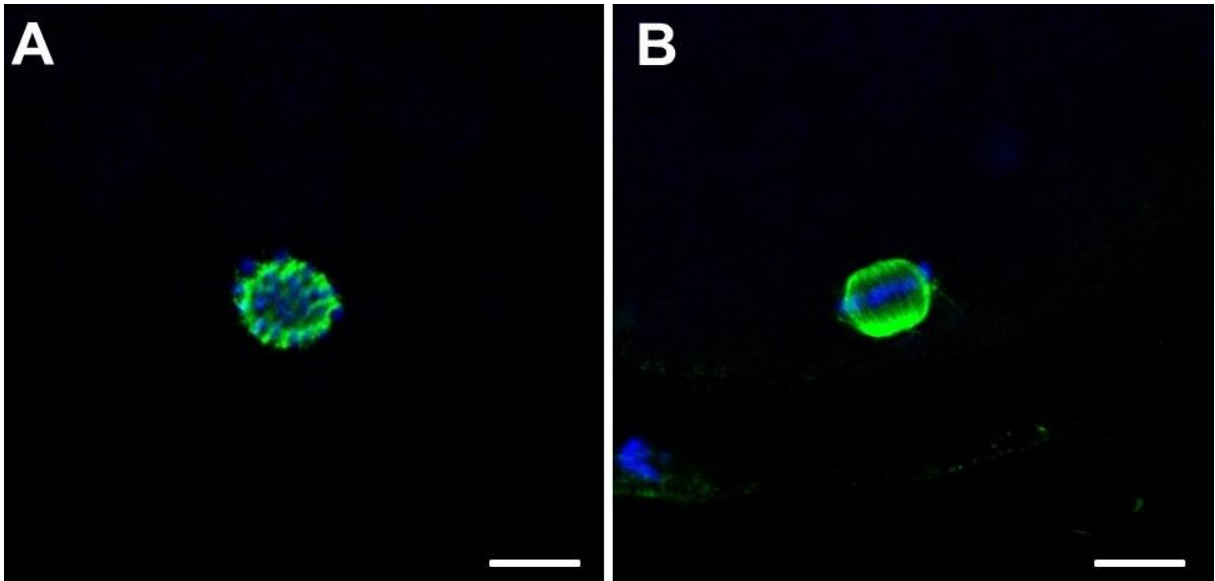
Oócitos em MII analisáveis foram classificados como “normais” quando apresentaram fuso meiótico em forma de barril com microtúbulos organizados de um polo a outro, cromossomos alinhados na placa metafásica no equador do fuso e presença de um CP; ou considerados como “anormais” quando apresentaram fuso meiótico alterado (dimensão longitudinal reduzida, microtúbulos desorganizados ou ausentes) e/ou configuração cromossômica alterada (dispersos ou deslocados do plano da placa metafásica).

Figura 6: Estágios de maturação nuclear de oócitos bovinos maturados *in vitro* e analisados por microscopia confocal. A-) Metáfase I; B) Telófase I; C-) Metáfase II; D-) Ativação Partenogenética(TelófaseII)



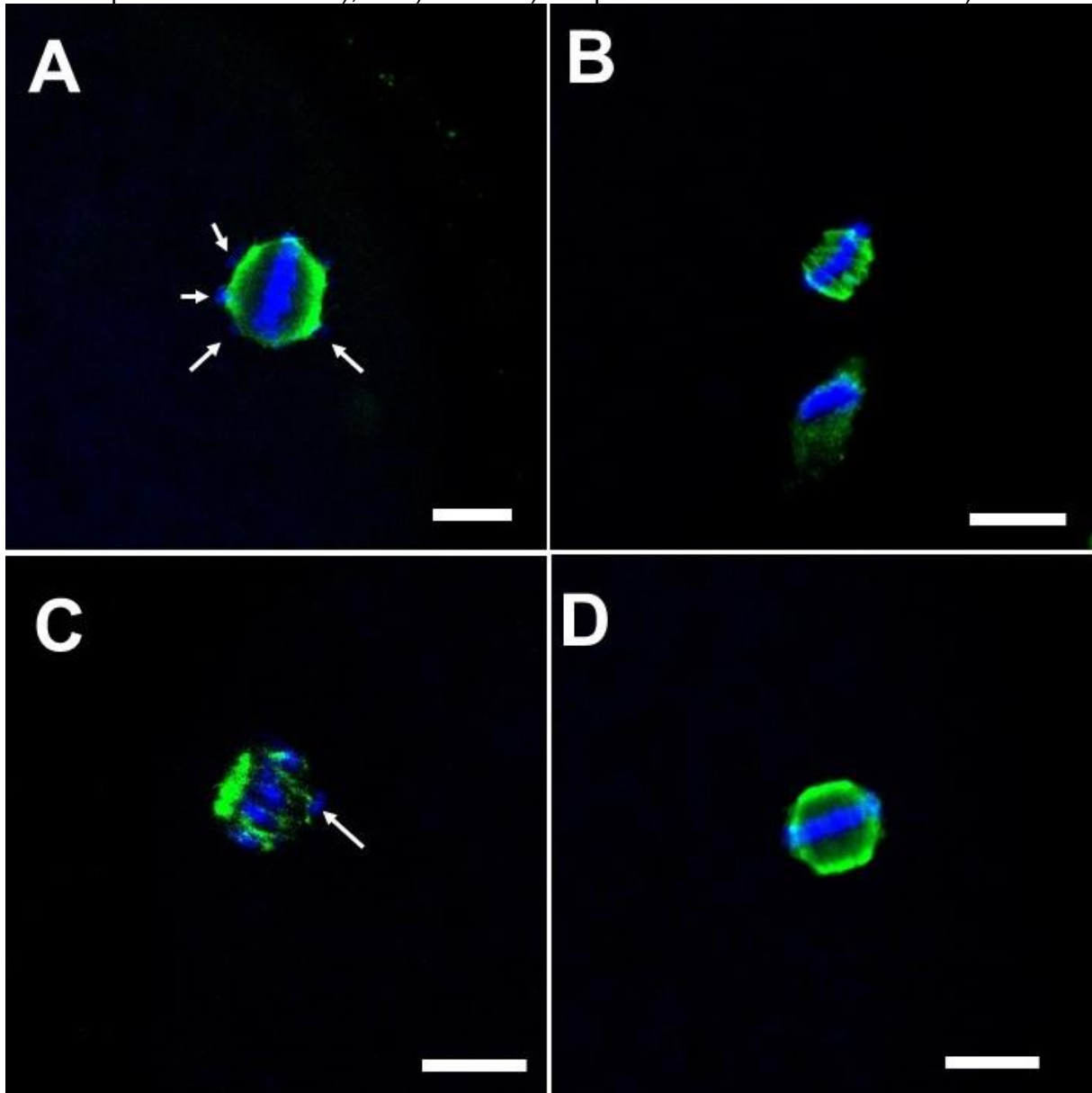
Nota: Em verde, marcação para fuso meiótico com anticorpo monoclonal anti- β -tubulina e anticorpo secundário conjugado com FITC. Em azul, marcação para material genético com Hoechst 33342. CP: corpúsculo polar. Barra branca no canto direito inferior: escala de 10 μ m.

Figura 7: Posição de visualização do fuso meiótico de oócitos bovinos em metáfase II maturados *in vitro* e visualizados por microscopia confocal. A-) Polar (fuso não analisável), B-)Sagital(analisável)



Nota: Em verde, marcação para fuso meiótico com anticorpo monoclonal anti- β -tubulina e anticorpo secundário conjugado com FITC. Em azul, marcação para material genético com Hoechst 33342. Barra branca no canto direito inferior: escala de 10 μ m.

Figura 8: Classificação de oócitos bovinos maturados *in vitro*, em metáfase II analisáveis, de acordo com a organização do fuso meiótico e alinhamento cromossômico analisados por microscopia confocal. A-), B-) e C-) representam anormais e D-) normal.



Nota: A-) Fuso normal, cromossomos desalinhados; B-) Fuso incompleto e cromossomos alinhados; C-) Fuso anormal e cromossomos desalinhados e D-) Fuso normal e cromossomos alinhados (MII normal). Em verde, marcação para fuso meiótico com anticorpo monoclonal anti- β -tubulina e anticorpo secundário conjugado com FITC. Em azul, marcação para material genético com Hoechst 33342. Barra branca no canto direito inferior: escala de 10 μ m. Seta branca indica cromossomos desalinhados

4.9. Obtenção da variável primária

A porcentagem de MII normais foi obtida dividindo o número de MII normais pelo número de MII analisáveis.

4.10. Obtenção das variáveis secundárias

- Taxa de MI: número de MI dividido pelo número de oócitos visualizados por confocal
- Taxa de TI: número de TI dividido pelo número de oócitos visualizados por confocal
- Taxa de AP: número de AP dividido pelo número de oócitos visualizados por confocal
- Taxa de MII: número de MII dividido pelo número de oócitos visualizados por confocal
- Taxa de MII analisáveis: número de oócitos MII visualizados em posição sagital/lateral divididos pelo número total de oócitos MII

4.11. Obtenção das variáveis clínicas secundárias

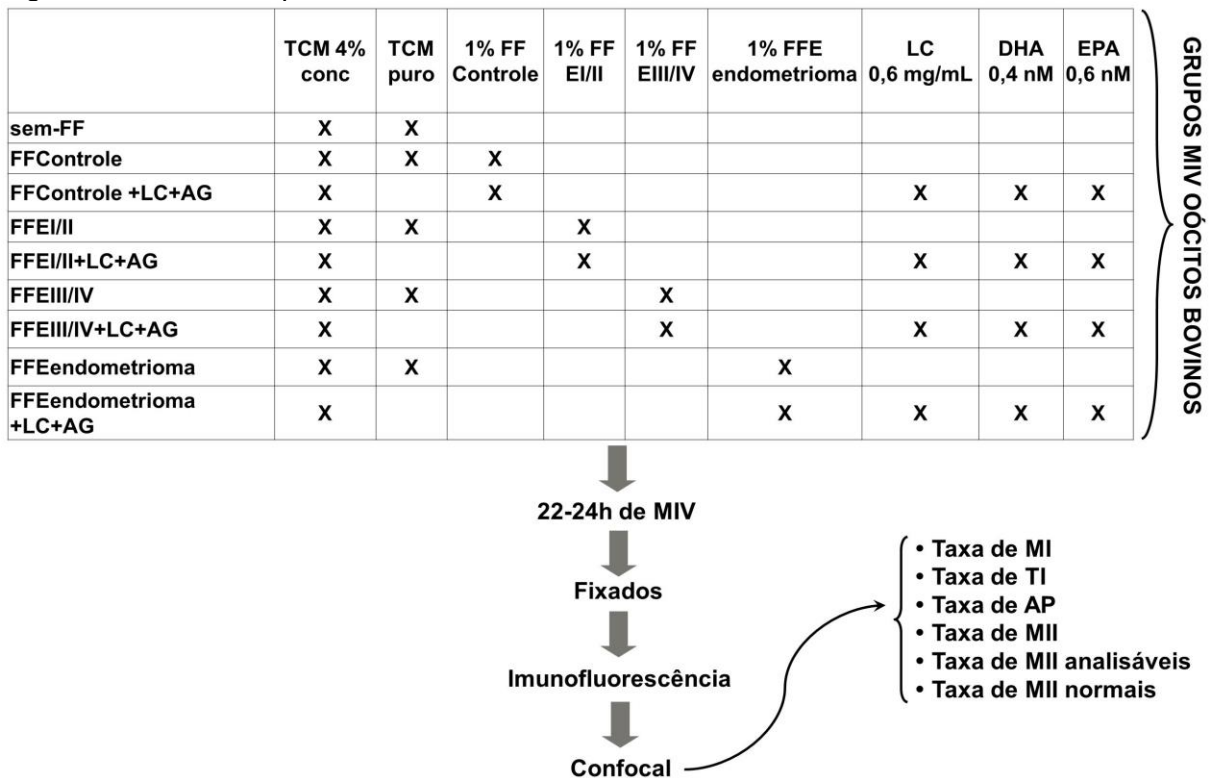
- Idade: foi obtida a partir da data de nascimento e data da captação oocitária (anos);
- IMC: divisão do peso em kg pela altura ao quadrado em m (kg/m^2);
- FSH: níveis séricos de FSH no 3º dia do ciclo menstrual dosados por quimioluminescência (UI/L);
- Tempo de infertilidade: intervalo de tempo que o casal mantém relações sexuais sem uso de contraceptivos (meses);
- Tempo entre videolaparoscopia e captação oocitária: intervalo de tempo entre a realização do exame de videolaparoscopia e a captação oocitária (meses);
- Contagem de folículos antrais (CFA basal): número total de folículos ovarianos antrais avaliado por meio de ultrassonografia transvaginal no dia de início da EOC (n);
- Espessura endometrial: medida da espessura do endométrio avaliada por meio de ultrassonografia transvaginal no dia de início da EOC (mm)
- Duração da EOC: tempo decorrido do início da EOC até a administração do hCG recombinante (dias);
- Oócitos captados: número de CCOs obtidos pela punção ovariana após 34-36 h da administração do hCG (n);

- Oócitos maduros: número de oócitos MII obtidos pela punção ovariana após 34-36 h da administração do hCG (n);

4.12. Desenho experimental

Abaixo a Figura 9 ilustra o desenho experimental realizado neste estudo.

Figura 9: Desenho experimental



4.13. Análise estatística

Os dados foram analisados usando o software RStudio versão 1.0.153, 2009-2017 [R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>]. Os resultados foram apresentados em tabelas (Tabelas 1 e 2).

A Tabela 1 mostra os dados clínicos referentes às pacientes doadoras de FF. Os dados foram apresentados como mediana e intervalos interquartis. As variáveis não paramétricas: Idade (anos), IMC (kg/m²), FSH sérico no 3º dia do ciclo menstrual (UI/mL), tempo de infertilidade (anos), tempo entre realização da videolaparoscopia e captação oocitária (em meses), CFA basal (nº de folículos),

espessura do endométrio no dia de início da EOC (mm), duração da EOC (dias), nº de oócitos captados e nº de oócitos MII captados foram comparados entre os grupos Controle, EI/II, EIII/IV e Eendometrioma utilizando o teste de Kruskal Wallis com pós teste de Dunn.

A Tabela 2 mostra os dados coletados a partir da realização das MIVs e imunofluorescências dos oócitos bovinos. As variáveis categóricas (porcentagem de MI, porcentagem de TI, porcentagem de AP, porcentagem de MII, porcentagem de MII analisáveis, porcentagem de MII normais) foram comparadas entre os grupos utilizando o teste do qui-quadrado.

Para todos os testes foi adotado um nível de significância em $p < 0,05$.

4.14. Cálculo amostral

Com base em estudos prévios de nosso grupo (DA BROI *et al.*, 2014; GIORGI *et al.*, 2016) que demonstraram uma diferença na porcentagem de MII normais de ~30% entre os grupos sem-FF e FFEI/II, e considerando um poder de teste de 80% ($\beta=0,2$ e $\alpha=0,05$), um total de 87 oócitos em MII analisáveis por grupo seriam necessários.

5. *RESULTADOS*

Oito experimentos foram realizados, e FF de uma paciente de cada grupo (grupo controle, grupo endometriose em estágios iniciais, grupo endometriose em estágios avançados sem endometrioma e grupo endometriose em estágios avançados com endometrioma) foi utilizado individualmente em cada um dos experimentos.

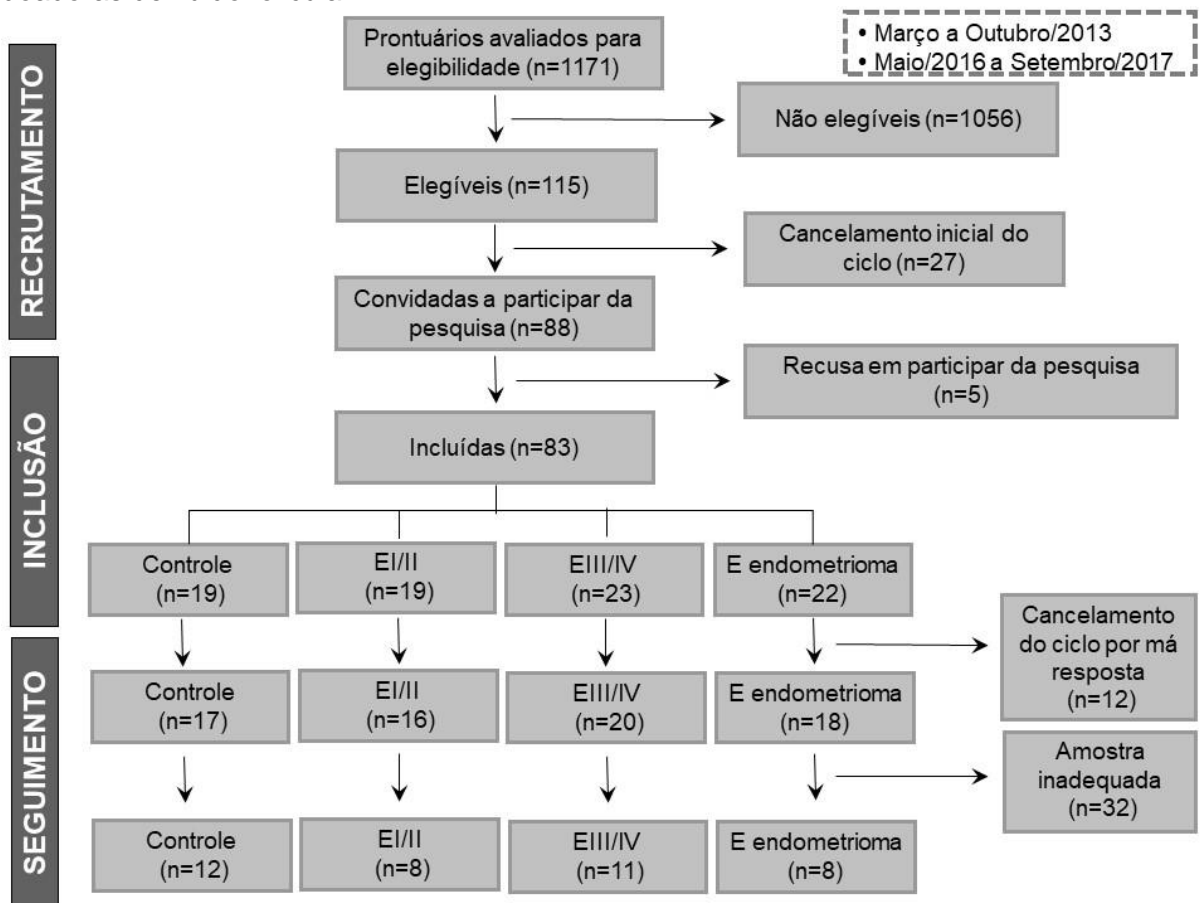
5.1. Recrutamento de pacientes doadoras de FF

Entre março de 2013 e outubro de 2013, e entre maio de 2016 a setembro de 2017, um total de 1171 prontuários foram avaliados para elegibilidade no Setor de Reprodução Assistida do HC-FMRP. Destes prontuários, 630 foram considerados não elegíveis pois o casal realizou outro tratamento que não ICSI (inseminação intrauterina, transferência de embrião congelado).

Dos 541 casos submetidos à ICSI, 115 apresentaram os critérios de elegibilidade, entretanto, 27 tiveram o ciclo de EOC cancelado devido à presença de folículo dominante. Portanto, 88 mulheres foram convidadas a participar da pesquisa e 83 delas concordaram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Destas 83 pacientes, 12 tiveram o ciclo de EOC cancelado devido à má resposta à EOC. Portanto, 71 mulheres foram submetidas ao procedimento de captação oocitária (17 Controle, 16 EI/II, 20 EIII/IV e 18 Eendometrioma).

Das 71 mulheres submetidas à captação oocitária, 32 apresentaram amostra inadequada devido à contaminação por sangue à inspeção visual ou por não apresentarem nenhum oócito em MII captado. Um total de 39 amostras (12 Controle, 8 EI/II, 11 EIII/IV e 8 Eendometrioma) foram processadas e armazenadas a -196°C até futura utilização (características das amostras de FF utilizadas estão registradas no APÊNDICE A).

Figura 10: Fluxograma ilustrando recrutamento, inclusão e seguimento de mulheres inférteis doadoras de fluido folicular



5.2. Dados clínicos doadoras de FF

A Tabela 1 mostra os dados clínicos das 32 pacientes com amostras de FF utilizadas nos 8 experimentos de MIV. Não houve diferença na idade, IMC, níveis séricos de FSH, tempo entre videolaparoscopia e captação oocitária, CFA basal, espessura endometrial, duração da EOC, oócitos captados, oócitos maduros e embriões clivados. Houve uma diferença entre o grupo controle e Eendometrioma com relação ao tempo de infertilidade ($p=0,0275$).

Tabela 1: Variáveis clínicas e resposta à estimulação ovariana controlada das mulheres inférteis doadoras de fluido folicular sem endometriose (controle), com endometriose em estágios iniciais (E I/II) e em estágios avançados sem endometrioma (E III/IV) e com endometrioma (E endometrioma).

	Controle (n=8)	E I/II (n=8)	E III/IV (n=8)	E endometrioma (n=8)	
Idade (anos)	36 (35,5 – 37,3)	34 (33,5 - 37)	33 (29 - 34)	34,5 (33 – 36,3)	p =0,1907
IMC (kg/m ²)	24,6 (23,8 – 27,9)	21,9 (21,8 - 27,4)	24,8 (24,6 – 27,3)	21,8 (20,8 – 25,2)	p =0,3259
FSH (UI/L)	8,2 (7,9 – 9,7)	4,4 (4,4 – 5,3)	5,2 (3,8 – 7,8)	5,6 (4,1 - 8,4)	p= 0,1890
Tempo infertilidade (meses)	114 (93 - 135)*	84 (81 - 84)	108 (66 - 111)	48 (45 - 60)*	*p=0,0275
Tempo entre VLPSC e EOC (meses)	57 (53,8 – 70,5)	23 (32,8 - 75)	68 (10,3 - 79)	34 (30 – 49,5)	p =0,3282
CFA basal (n)	8,0 (7,5- 8)	7 (7 – 9,5)	9,0 (3,8 - 11)	8,0 (3- 13)	p=0,9533
Endométrio (mm)	3,3 (2,9 – 3,9)	7,3 (2,9 – 5,5)	4,6 (3,2 – 6,9)	4,5 (3,4 – 5,2)	p=0,6850
Duração EOC (dias)	8 (8 – 9,3)	9 (9 – 10,5)	10 (9 - 10)	10 (9,5 – 11,3)	p=0,2115
Oócitos captados (n)	3 (2 - 4)	4 (3,8 – 5,5)	4 (3,5 - 8)	2 (1 – 4,3)	p =0,1873
Oócitos maduros (n)	3 (2 – 3,3)	4 (3,8 – 5,5)	4 (3,5 – 7,5)	2 (1 – 4,3)	p =0,2084

Nota: As variáveis são reportadas como mediana e intervalos interquartis. IMC: índice de massa corpórea; FSH: hormônio folículo estimulante; CFA basal: contagem de folículos antrais; EOC: estimulação ovariana controlada; VLPSC: videolaparoscopia. Grupos comparados por meio do teste de Kruskal Wallis com pós teste de Dunn ($p < 0,05$).

5.3. Maturação *in vitro* e microscopia confocal

Para os 8 experimentos de MIV realizados entre novembro/2017 e janeiro/2018, um total de 240 ovários bovinos foram aspirados, e um total de 1686 CCOs imaturos foram submetidos à MIV. Após a MIV, um total de 1561 oócitos desnudados foram fixados para realização de imunofluorescência e 1401 oócitos

foram visualizados por microscopia confocal (167 oócitos estavam em MI, 25 em TI, 1188 em MII e 21 sofreram AP). Dos 1188 oócitos em MII, 735 foram considerados analisáveis (isto é, visualizados em uma posição sagital ou lateral) e 453 foram considerados não analisáveis (visão polar).

Não houve diferença na taxa de TI ($p=0,05467$), AP ($p=0,8854$) e MII analisáveis ($p=0,5651$) entre os nove grupos experimentais (Tabela 1).

A taxa de oócitos em MI foi de 6,0% no grupo sem-FF, sendo semelhante a dos grupos FFControle (6,1%, $p=1$), FFControle+LC+n3 (11,7%, $p=0,1247$), FFEI/II (12,7%, $p=0,07406$), FFEI/II+LC+n3 (9,8%, $p=0,3085$), FFEIII/IV+LC+n3 (7,7%, $p=0,7314$) e FFEndometrioma+LC+n3 (11,1%, $p=0,166$). A taxa de MI foi menor nos grupos sem-FF e FFControle quando comparada a dos grupos FFEIII/IV (16,9%; vs sem-FF: $p=0,00504$; vs FFC: $p=0,00537$) e FFEndometrioma (24,7%; vs sem-FF: $p<0,0001$; vs FFC: $p<0,0001$). A adição de LC e ômega-3 não alterou a taxa de MI nos grupos FFControle (6,1% vs 11,7%, $p=0,1292$) e FFEI/II (12,7% vs 9,8%, $p=0,5288$), mas reduziu a taxa de MI nos grupos FFEIII/IV (FFEIII/IV+LC+n3: 7,7% vs 16,9%, $p=0,0259$) e FFEendometrioma (FFEendometrioma+LC+n3: 11,1% vs 24,7%, $p=0,0028$).

A taxa de MII foi de 91,9% no grupo sem-FF, sendo semelhante aos grupos FFControle (89,2%, $p=0,5389$), FFControle+LC+n3 (89,2%, $p=0,06992$), FFEI/II (85,4%, $p=0,1069$), FFEI/II+LC+n3 (85,3%, $p=0,09598$), FFEIII/IV+LC+n3 (90,8%, $p=0,8999$) e FFEndometrioma+LC+n3 (86,4%, $p=0,1681$). A menor taxa de MII foi encontrada no grupo FFEndometrioma (69,3%) que diferiu dos demais 8 grupos (vs sem-FF: $p<0,0001$; vs FFControle: $p<0,0001$; vs FFControle+LC+n3: $p=0,00194$; vs FFEI/II: $p=0,00114$; vs FFEI/II+LC+n3: $p=0,00117$; vs FFEIII/IV: $p=0,02681$; vs FFEIII/IV+LC+n3: $p<0,0001$; vs FFEndometrioma+LC+n3: $p=0,00044$). O grupo sem-FF apresentou maior taxa de MII comparado aos grupos FFEIII/IV (80,7%, $p=0,00681$) e FFEendometrioma ($p<0,0001$). A adição de LC e ômega-3 não alterou a taxa de MII nos grupos FFControle (FFControle vs FFControle+LC+n3: $p=0,3122$), FFEI/II (FFEI/II vs FFEI/II+LC+n3: $p=1$). No entanto, a adição de LC e ômega-3 aumentou a taxa de MII nos grupos FFEIII/IV (FFEIII/IV vs FFEIII/IV+LC+n3: $p=0,0190$) e FFEendometrioma (FFEendometrioma vs FFEendometrioma+LC+n3: $p=0,0004$).

A porcentagem de MII meioticamente normais foi de 87,2% no grupo sem-FF, sendo similar a dos grupos FFControle (87,2%, $p=1$, poder de teste: 5%),

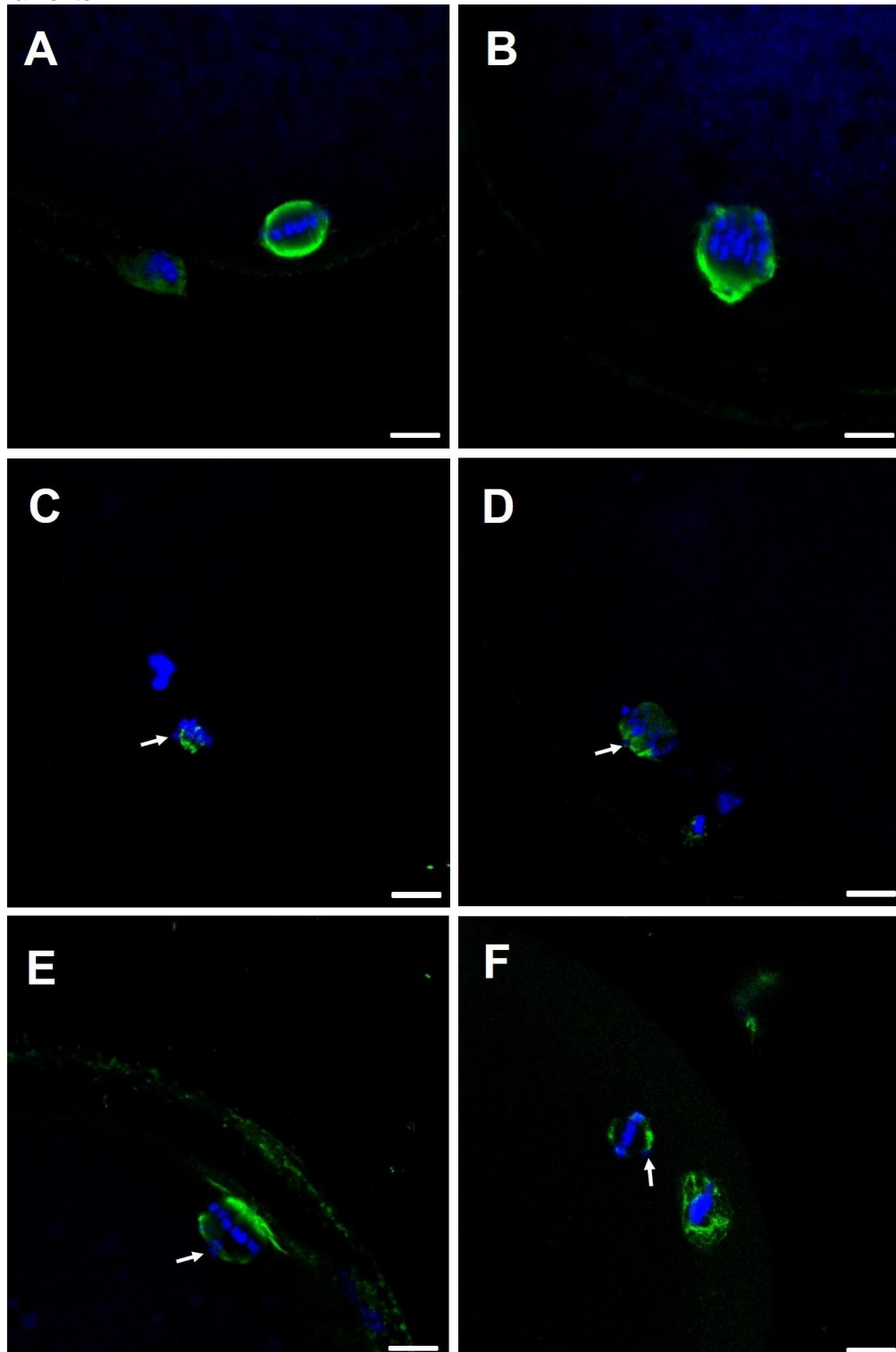
FFControle+LC+n3 (82,5%, $p=0,54$, poder de teste: 7%), FFEI/II+LC+n3 (84,5%, $p=0,7615$, poder de teste: 6%), FFEIII/IV+LC+n3 (84,1%, $p=0,7122$, poder de teste: 6%) e FFEndometrioma+LC+n3 (75,3%, $p=0,0623$, poder de teste: 14%). A porcentagem de MII normais no grupo sem-FF foi significativamente maior do que nos grupos FFEI/II (62,2%, $p=0,00023$), FFEIII/IV (70,2%, $p=0,0092$) e FFEndometrioma (72,7%, $p=0,03497$). A porcentagem de MII normais no grupo FFControle também foi significativamente maior do que nos grupos FFEI/II ($p=0,00059$), FFEIII/IV ($p=0,01523$) e FFEndometrioma ($p=0,0486$). A adição de LC e ácidos graxos ômega-3 durante a MIV não alterou a taxa de MII normais no grupo FFControle ($p=0,5792$, poder de teste: 7%) e com FFEndometrioma ($p=0,865$, poder de teste: 5%), mas aumentou essa taxa nos grupos com FFEI/II ($p=0,00205$) e FFEIII/IV ($p=0,04995$). Apesar dos grupos FFEndometrioma (72,7%) e FFEndometrioma+LC+n3 (75,3%) não diferirem com relação à porcentagem de MII normais ($p=0,865$), o grupo FFEndometrioma+LC+n3 teve porcentagem de MII normais semelhante aos grupos sem-FF ($p=0,062$, poder de teste: 14%) e FFControle ($p=0,083$, poder de teste: 14%).

Tabela 2: Estágios de maturação nuclear, e porcentagem de oócitos em MII normais maturados *in vitro* em meio sem adição de FF (sem-FF), com adição de 1% de FF de pacientes inférteis sem endometriose (FFControle), com endometriose leve (FFEI/II), com endometriose moderada/grave sem endometrioma (FFEIII/IV) ou com endometriose moderada/grave com endometrioma (FFEndometrioma), suplementado com 0,6mg/mL de L-Carnitina, 0,4 nM de ácido docosahexaenóico e 0,6 nM de ácido eicosapentaenóico (LC+n3) visualizados por microscopia confocal.

	Oócitos fixados pós-MIV n	Visualizados n	MI n (%)	T1 n (%)	AP n (%)	MII		
						Total de MII n (%)	Analisáveis n (%)	Normais n (%)
sem-FF	167	149	9(6,0%)a	2 (1,3%)	1 (0,7%)	137 (91,9%)a	94 (68,6%)	82 (87,2%)a
FFControle	163	148	9 (6,1%)a	5 (3,4%)	2 (1,4%)	132 (89,2%)ab	78 (59,1%)	68 (87,2%)a
FFControle +LC+n3	179	163	19 (11,7%)ab	3 (1,8%)	3 (1,8%)	138 (89,2%)ab	80 (58,0%)	66 (82,5%)ab
FFEI/II	178	158	20 (12,7%)ab	1 (0,6%)	2 (1,3%)	135 (85,4%)ab	82 (60,7%)	51 (62,2%)c
FFEI/II +LC+n3	186	163	16 (9,8%)ab	4 (2,5%)	4 (2,5%)	139 (85,3%)ab	84 (60,4%)	71 (84,5%)ad
FFEIII/IV	185	166	28 (16,9%)bc	2 (1,2%)	2 (1,2%)	134 (80,7%)b	84 (62,7%)	59 (70,2%)bc
FFEIII/IV +LC+n3	163	142	11 (7,7%)a	1 (0,7%)	1 (0,7%)	129 (90,8%)a	82 (63,6%)	69 (84,1%)ad
FFEndometrioma	163	150	37 (24,7%)c	7 (4,7%)	2 (1,3%)	104 (69,3%)c	66 (63,5%)	48 (72,7%)bcd
FFEndometrioma +LC+n3	177	162	18 (11,1%)ab	0 (0%)	4 (2,5%)	140 (86,4%)ab	85 (60,7%)	64 (75,3%)abc

Nota: MIV: maturação *in vitro*; MI = metáfase I; T1 = telófase I; MII = metáfase II; AP = ativação partenogenética. Analisáveis: oócitos com fuso fixado em uma visão lateral ou sagital. Dados são resultados de 8 replicatas utilizando fluido folicular de pacientes controles, com endometriose leve, com endometriose grave sem endometrioma e com endometrioma. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística, $p < 0,05$, usando teste de qui-quadrado.

Figura 11: Alterações meióticas oocitárias mais significativas encontradas em cada grupo: A-) Metáfase II normal no grupo FFControle; B-) Metáfase I no grupo FFEendometrioma; C-) a F-) Metáfase II anormal nos grupos FFEI/II, FFEIII/IV, FFEendometrioma e FFEendometrioma+LC+n3, respectivamente



Nota: Em verde, marcação para fuso meiótico com anticorpo monoclonal anti- β -tubulina e anticorpo secundário conjugado com FITC. Em azul, marcação para material genético com Hoechst 33342. Barra branca no canto direito inferior: escala de 10 μ m. Seta branca indica cromossomos desalinhados.

6. *DISCUSSÃO*

Apesar da estreita relação entre endometriose e infertilidade, os mecanismos etiopatogênicos envolvidos na diminuição da fertilidade natural dessas mulheres permanecem desconhecidos. Neste estudo, demonstramos que o FF de mulheres inférteis com endometriose quando adicionado ao meio de MIV de oócitos bovinos provoca diminuição da qualidade oocitária (avaliada neste estudo pelo bloqueio da maturação nuclear e comprometimento da organização do fuso e cromossomos de oócitos em MII) quando comparado ao FF de mulheres inférteis sem a doença. A presença de endometrioma no ciclo de EOC apresenta um impacto ainda mais prejudicial à qualidade oocitária, afetando, principalmente, a maturação nuclear. A adição de LC e de ácidos graxos ômega-3 (DHA e EPA) preveniu esses danos, ressaltando o papel do EO e de alterações da β -oxidação na piora da qualidade de oócitos de mulheres com endometriose em estágios iniciais e avançados (com e sem endometrioma).

Independentemente do estágio, nossos achados, usando modelo experimental bovino, evidenciam que a endometriose afeta a qualidade oocitária reduzindo a porcentagem de oócitos em MII com fuso normal e cromossomos alinhados comparada a dos grupos sem-FF e com FF controle. O fuso meiótico de oócitos é uma estrutura dinâmica, que alinha e segrega os cromossomos durante a meiose, formado pela polimerização de subunidades α e β da proteína tubulina associada a mais de 100 outras proteínas (WITTMANN; HYMAN; DESAI, 2001). Vários fatores podem alterar o fuso, sendo o EO, um deles (SHARMA; AZEEM; AGARWAL, 2013). Radicais livres são moléculas contendo elétrons desemparelhados, e que devido a essa instabilidade de elétrons, pode danificar diretamente as proteínas do fuso (e outras macromoléculas celulares, como o DNA) provocando desarranjos estruturais e funcionais (SALVI *et al.*, 2001). Excesso de radicais livres também pode alterar o potencial de membrana da mitocôndria, levando a uma diminuição da produção de ATP e, conseqüente, desestruturação do fuso meiótico (ZHANG *et al.*, 2006).

Nossos achados corroboram achados anteriores do nosso grupo, demonstrando que adição de 1% de FF de mulheres inférteis com endometriose em estágios iniciais ao meio de MIV de oócitos bovinos prejudica a organização do fuso meiótico e o alinhamento cromossômico de oócitos em MII (DA BROI *et al.*, 2014; GIORGI *et al.*, 2016). Pela primeira vez, evidenciamos que o FF de mulheres inférteis com endometriose em estágios avançados (com e sem endometrioma)

também compromete a normalidade meiótica de oócitos bovinos submetidos a MIV na presença destes FF na concentração de 1%.

Entretanto, Hamdan e colaboradores (2016), utilizando modelo murino, não observaram alteração de fuso meiótico e alinhamento cromossômico quando os oócitos foram maturados com FF de mulheres com endometriose grave; discordando de nossos resultados. No estudo de Hamdan e colaboradores (2016), as doadoras de FF foram previamente submetidas ao exame de videolaparoscopia para diagnóstico, tratamento e estadiamento da endometriose de acordo com os critérios da ASRM, entretanto não houve menção da presença de infertilidade e endometrioma como critério de inclusão/exclusão. Outras diferenças entre o presente estudo e o trabalho de Hamdan e colaboradores (2016) são: o tempo de incubação e a concentração de FF utilizada (Hamdan e colaboradores incubaram os oócitos em uma concentração de 15-50% de FF por 18h). Dessa forma, hipotetizamos que a discordância de resultados entre o nosso estudo e o estudo de Hamdan e colaboradores (2016) relativos à organização do fuso meiótico deve-se, principalmente, ao modelo experimental utilizado. Morfologicamente e fisiologicamente oócitos de diferentes espécies apresentam diferenças, mesmo que sutis (SANTOS; SCHOEVERS; ROELEN, 2014), entretanto, revisão avaliando as características oocitárias de bovinos, murinos, suínos e humanos, sugeriu que para estudos avaliando toxicologia reprodutiva (que no nosso caso seria a exposição a um ambiente com EO) os modelos bovinos e suínos seriam mais adequados que o modelo murino para representar oócitos humanos (SANTOS; SCHOEVERS; ROELEN, 2014).

Apesar disso, Hamdan e colaboradores (2016) avaliaram alterações cromossômicas por outra metodologia, a fosforilação da histona H2AX (marcador de dano ao DNA e, portanto, ao cromossomo), e reportaram uma maior quantidade de focos de fosforilação da histona H2AX nos oócitos incubados com FF de endometriose grave comparado aos grupos sem FF e com FF controle, indicando comprometimento dos cromossomos de oócitos de mulheres com endometriose grave, corroborando, ao menos em parte, os nossos achados (HAMDAN *et al.*, 2016).

A taxa de maturação nuclear também foi avaliada no estudo de Hamdan e colaboradores (2016), que observaram que o FF de mulheres sem endometriose não afetou a taxa de maturação oocitária comparada ao grupo sem adição de FF

(HAMDAN *et al.*, 2016). Entretanto, o FF de mulheres com endometriose grave (tanto a adição de 15% quanto 50%), prejudicou a taxa de maturação oocitária *in vitro* (HAMDAN *et al.*, 2016). Os autores desse estudo sugerem que a diminuição da taxa de extrusão de CP no grupo incubado com FF de endometriose deve ser resultante de danos ao DNA provocados pelo EO (HAMDAN *et al.*, 2016). Um trabalho de nosso grupo mostrou que o FF de mulheres inférteis com endometriose apresenta um aumento dos níveis de 8OHdG (marcador de dano oxidativo ao DNA) comparado a mulheres inférteis sem a doença (DA BROI *et al.*, 2016). Desta forma, Hamdan e colaboradores (2016) corroboram nossos resultados que o FF de mulheres inférteis com endometriose avançada (com e sem endometrioma) compromete a maturação nuclear oocitária (maior taxa de MI e menor taxa de MII) quando comparado ao FF de mulheres inférteis sem endometriose e com endometriose em estágios iniciais.

Mostramos que a adição de FF de mulheres inférteis com endometrioma no ciclo diminui a taxa de maturação nuclear quando comparado aos demais grupos, inclusive, aquele contendo FF de mulheres com endometriose III/IV sem endometrioma no ciclo. Neste contexto, estudos prévios evidenciaram que o FF obtido de folículos de ovários contendo endometrioma apresentam maiores níveis de ferro livre e ferritina comparados a FF obtido de ovários livre de endometrioma, e essa concentração parece aumentar quanto maior a proximidade do folículo com o endometrioma (SANCHEZ *et al.*, 2014; BENAGLIA *et al.*, 2015).

No presente estudo, no grupo Endometrioma, utilizamos tanto amostras de FF obtidas de ovário ipsilateral (2/8) como contralateral ao endometrioma (6/8) (APÊNDICE A). Estudo avaliando mulheres com endometrioma unilateral comparou os resultados de fertilização *in vitro* (FIV) de oócitos provenientes do ovário ipsilateral e contralateral ao endometrioma, e não relatou diferenças nos números de oócitos captados, de embriões viáveis, assim como nas taxas de fertilização e de clivagem (FILIPPI *et al.*, 2014). Portanto, embora, o conteúdo folicular de ferro seja alterado pela presença de endometrioma (SANCHEZ *et al.*, 2014; BENAGLIA *et al.*, 2015), os resultados de TRA parecem não ser alterados comparando ambos ovários de mulheres com endometriose com endometrioma unilateral (FILIPPI *et al.*, 2014).

Embora o trabalho de Filippi e colaboradores (2014) não tenha comparado os resultados de FIV entre mulheres com e sem endometrioma, sugerimos que, além do efeito negativo do contato direto do endometrioma com o córtex ovariano

adjacente sobre a foliculogênese (KITAJIMA *et al.*, 2011; KURODA *et al.*, 2012), a presença de endometrioma no ciclo interfere no compartimento sistêmico do organismo (soro) (CARMONA *et al.*, 2012; SANTULLI *et al.*, 2013), afetando o ambiente folicular do ovário contralateral (nos casos de endometrioma unilateral) alterando também o FF. Análise proteômica por espectrometria de massa do FF de mulheres com endometrioma unilateral (amostra de FF ipsilateral e contralateral) e sem endometriose (controle) identificou 535 proteínas expressas, sendo 139 comuns aos 3 grupos (endometrioma, ovário sem endometrioma e controle) (REGIANI *et al.*, 2015). Análise de enriquecimento foi realizada a partir da composição do ovário com endometrioma e ovário sem endometrioma, sendo que ambos grupos apresentaram proteínas com funções similares, demonstrando o impacto da endometriose (ou presença de um endometrioma ativo no ciclo, independentemente da proximidade folicular) sobre a composição do FF (REGIANI *et al.*, 2015).

LC e ácidos graxos ômega-3 preveniram os danos meióticos oocitários provocados pelo FF de mulheres inférteis com endometriose, independentemente do estágio da doença e da presença ou não de endometrioma. Estudo prévio de nosso grupo mostrou que a adição de LC previne os danos ao fuso meiótico de oócitos bovinos maturados *in vitro* na presença de FF de mulheres com endometriose leve (taxa de MII normais aumentou de 51,35% para 80,61% com LC) (GIORGI *et al.*, 2016). Contudo, pela primeira vez, mostramos que a adição conjunta de LC e de ácidos graxos ômega-3 previne os danos oocitários (tanto em nível de maturação nuclear quanto de organização do fuso e alinhamento cromossômico em oócitos MII).

Recente revisão destacou o importante papel da carnitina sobre a fertilidade feminina discutindo estudos *in vivo* e *in vitro* envolvendo humanos ou modelos animais, e os possíveis mecanismos de ação da LC na melhora da fertilidade feminina (AGARWAL;GUPTA; DURAIRAJANAYAGAM, 2018). Por outro lado, estudos experimentais mostram que suplementação com ômega-3 melhora a qualidade oocitária (NEHRA *et al.*, 2012), regula o endométrio (WATERS *et al.*, 2014) e aumenta a taxa de prenhez (WATHES; ABAYASEKARA; AITKEN, 2007).

Tanto a LC quanto os ácidos graxos estão envolvidos na β -oxidação que é uma importante via mitocondrial de produção de energia durante a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário inicial (DOWNS; MOSEY; KLINGER, 2009; DUNNING *et al.*, 2010; DUNNING; ROBKER, 2012; PACZKOWSKI *et al.*, 2013;

VALSANGKAR; DOWNS, 2013; DUNNING; RUSSEL; ROBKER, 2014; DUNNING *et al.*, 2014). Oócitos de mulheres inférteis com endometriose mínima ou leve apresentam alterações mitocondriais avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão e por reação quantitativa em cadeia da polimerase (RT-PCR) (XU *et al.*, 2015). E, embora neste trabalho não investigamos as mitocôndrias oocitárias, sugerimos que o EO presente no FF de mulheres inférteis com endometriose (PRIETO *et al.*, 2012; SINGH *et al.*, 2013b; DA BROI; NAVARRO, 2016; HAMDAN *et al.*, 2016; NASIRI *et al.*, 2017), altere o funcionamento mitocondrial, contribuindo com a piora da qualidade oocitária (ZHANG *et al.*, 2006; XU *et al.*, 2015). A LC e os ácidos graxos ômega-3 ativariam a β -oxidação, normalizando os níveis de ATP que é essencial para a aquisição da competência oocitária (VAN BLERKOM; DAVIS; LEE., 1995; FERREIRA *et al.*, 2009b).

Também sugerimos que os ácidos graxos ômega-3 tenham agido modulando a ação da enzima cicloxigenase-2 (COX-2) (DERECKA *et al.*, 2008) nos oócitos maturados *in vitro* com FF de mulheres com endometriose. A COX-2 está envolvida com metabolismo lipídico e inflamação e é codificada pelo gene *PTGS2* (O'NEILL; FORD-HUTCHINSON, 1993). Estudo de nosso grupo mostrou diminuição da expressão do gene *PTGS2* em células do *cumulus* de mulheres com endometriose comparado a mulheres inférteis sem a doença submetidas à EOC para ICSI (DA LUZ *et al.*, 2017). Desta forma, é possível que o FF de mulheres com endometriose (neste estudo, especialmente, III/IV) altere o funcionamento da COX-2 nos CCOs, diminuindo a expressão de *PTGS2*, o que afetaria a maturação nuclear oocitária e a resolução da meiose I. E os ácidos graxos ômega-3 devem ter modulado a COX-2 que poderia promover o funcionamento normal do gene *PTGS2*, e, por consequência, normalizar a taxa de maturação nuclear (MAREI *et al.*, 2014)

Embora há estudos controversos (KIM *et al.*, 2013; KHANAKI *et al.*, 2014) e evidências fracas sobre os efeitos benéficos do ômega-3 para a endometriose (GAZVANI *et al.*, 2001; MISSMER *et al.*, 2004; NETSU *et al.*, 2008; ATTAMAN *et al.*, 2014; HOPEMAN *et al.*, 2015; AKYOL *et al.*, 2016), os ácidos graxos ômega-3 parecem estar envolvidos com a supressão da progressão da endometriose, provavelmente modulando a inflamação em favor da síntese de resolvinas (DMITRIEVA; SUESS; SHIRLEY, 2014) o que poderia impactar diretamente no alívio da dor. Recente estudo clínico registrado no ISRCTN (ISRCTN44202346) pretende avaliar a eficácia do ômega-3 no tratamento da dor relacionada à endometriose com

um estudo duplo-cego utilizando dois braços de estudo: i) uso de ômega-3 (Omacor 1000mg 2 vezes ao dia) e ii) cápsula de azeite de oliva com semelhante aspecto (ABOKHRAIS *et al.*, 2018).

Entretanto, não há estudos avaliando o uso de PUFA omega-3 na melhora da infertilidade relacionada à endometriose. Estudo de coorte prospectivo (n=100) avaliou a relação entre níveis séricos de PUFA n-6 e n-3 sobre os resultados de TRA e observou que maiores níveis sérios de ômega-3 estavam associados a uma maior probabilidade de gestação clínica e nascidos vivos por ciclo iniciado (CHIU *et al.*, 2018). Mirabi e colaboradores (2017) também observaram uma maior concentração de EPA no soro de mulheres submetidas às técnicas de TRA que engravidaram comparadas àquelas que não engravidaram, no entanto, quando essa comparação foi realizada utilizando amostras de FF, nenhuma diferença foi encontrada (MIRABI *et al.*, 2017).

Avaliando os dados clínicos dos grupos de doadoras de FF (FFControle, FFEI/II, FFEIII/IV e FFEendometrioma), observamos uma diferença na duração da infertilidade entre os grupos FFControle e FFEendometrioma. Acreditamos que essa diferença não seja importante neste estudo, visto que a mediana das idades (este sim, um fator relacionado a piora da qualidade oocitária) entre os grupos não diferiu.

Nosso estudo trouxe contribuições inéditas para a elucidação da etiopatogênese da infertilidade relacionada à endometriose. Porém, contamos com algumas limitações. I-) Utilizamos FF de mulheres submetidas à EOC, tornando questionável a extrapolação dos resultados para ciclos naturais; porém, o grupo controle também foi submetido a protocolos de bloqueio hipofisário semelhantes. II-) Para a classificação da endometriose utilizamos os critérios da ASRM, e não podemos saber se a utilização de outros critérios [como por exemplo o índice de fertilidade (ADAMSON; PASTA, 2010)] poderiam levar a resultados semelhantes. III-) Utilizamos o FF apenas do primeiro folículo aspirado de cada paciente, pois não sabemos se a prorrogação da anestesia e repetidas punções ovarianas promoveriam EO folicular; todavia, não podemos afirmar que FFs de diferentes folículos teriam o mesmo impacto durante a MIV sobre o oócito. IV-) Além disso, os dados obtidos a partir de estudos com modelos animais pode não necessariamente ser extrapolados para os seres humanos e estudos com oócitos de mulheres inférteis com endometriose maturados *in vivo* seriam importantes para confirmar nossos resultados. V) Pequena casuística avaliada relativa ao número de amostras

de FF dos quatro grupos avaliados, o que limita a generalização de nossos achados. Todavia, nossos restritivos critérios de elegibilidade para as doadoras de FF, importante para aumentar a validade interna dos resultados, e a limitada indicação de videolaparoscopia na abordagem atual da infertilidade, tornaram bastante difícil a inclusão de mais pacientes e estudos com maiores casuísticas são importantes para confirmar nossos achados.

Atualmente, os tratamentos disponíveis para a infertilidade relacionada à endometriose são cirúrgicos e/ou as TRA (KENNEDY *et al.*, 2005) que são invasivos e/ou de elevado custo, com conseqüente baixo acesso populacional. Portanto, novas abordagens terapêuticas seriam essenciais para auxiliar milhares de mulheres atingidas por essa doença. Devido às propriedades da LC e dos ácidos graxos ômega-3, a combinação de tratamento cirúrgico com a suplementação dessas substâncias poderia impedir a recorrência e/ou progressão da endometriose (devido à ação antioxidante da LC e anti-inflamatória dos ácidos graxos ômega-3) e melhorar a fertilidade natural (por prevenir o EO, o comprometimento da beta oxidação e os danos oocitários) visto que o as TRA não são acessíveis a todas as mulheres. Nossos achados estimulam o delineamento de estudos clínicos investigando o impacto da suplementação conjunta de LC e ácidos graxos ômega-3 na melhora da fertilidade natural de mulheres inférteis com endometriose.

7. CONCLUSÕES

I-) O FF de mulheres inférteis com endometriose, independentemente do estágio da doença, diminui a taxa de MII normais quando adicionado ao meio de MIV de oócitos bovinos, comparado à adição de FF de mulheres inférteis sem endometriose. Entretanto, o FF de mulheres inférteis com endometriose em estágios avançados (III/IV) prejudica a taxa de maturação nuclear comparado ao grupo sem-FF, o que não é observado no grupo com FF de mulheres inférteis com endometriose em estágios iniciais. E o FF de mulheres inférteis com endometrioma, quando adicionado ao meio de MIV de oócitos bovinos, diminui a taxa de maturação nuclear comparado à adição de FF de mulheres inférteis sem endometriose, com endometriose em estágios iniciais e com endometriose em estágios avançados sem endometrioma. Portanto, a avanço do estágio da endometriose, assim como a presença de endometrioma no ciclo (mesmo que contralateral), apresentam impacto mais deletério sobre a qualidade oocitária.

II-) A suplementação do meio de MIV de oócitos bovinos com LC e ácidos graxos ômega-3 (DHA e EPA) preveniu os danos meióticos oocitários provocados pela adição do FF de mulheres inférteis com endometriose (em todos os estágios). Dessa forma, sugerimos que o estado inflamatório e de estresse oxidativo exacerbado, assim como, a desregulação da β -oxidação podem estar envolvidos na piora da qualidade oocitária, com conseqüente prejuízo da fertilidade natural de mulheres com endometriose.

BIBLIOGRAFIA

ABBAS, S. et al. Prevalence and incidence of diagnosed endometriosis and risk of endometriosis in patients with endometriosis-related symptoms: findings from a statutory health insurance-based cohort in Germany. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 160, n. 1, p. 79-83, 2012.

ABOKHRAIS, I. M. et al. A pilot randomised double blind controlled trial of the efficacy of purified fatty acids for the treatment of women with endometriosis-associated pain (PurFECT): study protocol. **Pilot Feasibility Stud**, v. 4, p. 83, 2018.

ABRIEU, A. et al. Mps1 is a kinetochore-associated kinase essential for the vertebrate mitotic checkpoint. **Cell**, v. 106, n. 1, p. 83-93, 2001.

ADAMSON, G. D.; PASTA, D. J. Endometriosis fertility index: the new, validated endometriosis staging system. **Fertil Steril**, v. 94, n. 5, p. 1609-15, 2010.

ADONA, P. R.; LIMA VERDE LEAL, C. 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.; GUPTA, S.; SHARMA, R. Oxidative stress and its implications in female infertility - a clinician's perspective. **Reprod Biomed Online**, v. 11, n. 5, p. 641-50, 2005.

AGARWAL, A.; SENGUPTA, P.; DURAIRAJANAYAGAM, D. Role of L-carnitine in female infertility. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 16, n. 1, p. 5, 2018.

AKYOL, A. et al. Efficacies of vitamin D and omega-3 polyunsaturated fatty acids on experimental endometriosis. **Taiwan J Obstet Gynecol**, v. 55, n. 6, p. 835-839, 2016.

ANTONIO, C. et al. Xkid, a chromokinesin required for chromosome alignment on the metaphase plate. **Cell**, v. 102, n. 4, p. 425-35, 2000.

ARMSTRONG, D. T. Effects of maternal age on oocyte developmental competence. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1303-22, 2001.

ASRM. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. **Fertil Steril**, v. 67, n. 5, p. 817-21, 1997.

ATTAMAN, J. A. et al. The anti-inflammatory impact of omega-3 polyunsaturated Fatty acids during the establishment of endometriosis-like lesions. **Am J Reprod Immunol**, v. 72, n. 4, p. 392-402, 2014.

BECKMAN, K. B.; AMES, B. N. The free radical theory of aging matures. **Physiol Rev**, v. 78, n. 2, p. 547-81, 1998.

BELLELIS, P. et al. Epidemiological and clinical aspects of pelvic endometriosis—a case series. **Rev Assoc Med Bras (1992)**, v. 56, n. 4, p. 467-71, 2010.

BENAGIANO, G.; BROSENS, I. History of adenomyosis. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 20, n. 4, p. 449-63, 2006.

BENAGIANO, G; BROSENS, I. Who identified endometriosis? **Fertil Steril**, v. 95, n. 1, p. 13-6, 2011.

BENAGIANO, G.; BROSENS, I.; LIPPI, D. The history of endometriosis. **Gynecol Obstet Invest**, v. 78, n. 1, p. 1-9, 2014.

BENAGLIA, L. et al. Intrafollicular iron and ferritin in women with ovarian endometriomas. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 94, n. 6, p. 646-53, 2015.

BERLETT, B. S.; STADTMAN, E. R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. **J Biol Chem**, v. 272, n. 33, p. 20313-6, 1997.

BIGGERS, J. D.; WHITTINGHAM, D. G.; DONAHUE, R. P. The pattern of energy metabolism in the mouse oöcyte and zygote. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 58, n. 2, p. 560-7, 1967.

BROSENS, I. et al. Early stage management of ovarian endometrioma to prevent infertility. **Facts Views Vis Obgyn**, v. 5, n. 4, p. 309-14, 2013.

BURNEY, R. O.; GIUDICE, L. C. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. **Fertil Steril**, v. 98, n. 3, p. 511-9, 2012.

BÄCHLER, M. et al. Species-specific differences in follicular antral sizes result from diffusion-based limitations on the thickness of the granulosa cell layer. **Mol Hum Reprod**, v. 20, n. 3, p. 208-21, 2014.

BÉRUBÉ, S. et al. Fecundity of infertile women with minimal or mild endometriosis and women with unexplained infertility. The Canadian Collaborative Group on Endometriosis. **Fertil Steril**, v. 69, n. 6, p. 1034-41, 1998.

CARMONA, F. et al. Ovarian endometrioma but not deep infiltrating endometriosis is associated with increased serum levels of interleukin-8 and interleukin-6. **J Reprod Immunol**, v. 95, n. 1-2, p. 80-6, 2012.

CHAMIÉ, L. P. et al. Atypical Sites of Deeply Infiltrative Endometriosis: Clinical Characteristics and Imaging Findings. **Radiographics**, v. 38, n. 1, p. 309-328, 2018.

CHANKITISAKUL, V. et al. Supplementation of maturation medium with L-carnitine improves cryo-tolerance of bovine in vitro matured oocytes. **Theriogenology**, v. 79, n. 4, p. 590-8, 2013.

CHAVARRO, J. E. et al. Dietary fatty acid intakes and the risk of ovulatory infertility. **Am J Clin Nutr**, v. 85, n. 1, p. 231-7, 2007.

CHAVARRO, J. E. et al. A prospective study of polyunsaturated fatty acid levels in blood and prostate cancer risk. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 16, n. 7, p. 1364-70, 2007.

CHIU, Y. H. et al. Serum omega-3 fatty acids and treatment outcomes among women undergoing assisted reproduction. **Hum Reprod**, v. 33, n. 1, p. 156-165, 2018.

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, n. 4 Suppl, p. 1220-31, 2007.

CHOI, Y. S. et al. Alteration in the intrafollicular thiol-redox system in infertile women with endometriosis. **Reproduction**, v. 149, n. 2, p. 155-62, 2015.

CUNHA-FILHO, J. S. et al. Insulin-like growth factor (IGF)-1 and IGF binding protein-1 and -3 in the follicular fluid of infertile patients with endometriosis. **Hum Reprod**, v. 18, n. 2, p. 423-8, 2003.

D'HOOGE, T. M. et al. The cycle pregnancy rate is normal in baboons with stage I endometriosis but decreased in primates with stage II and stage III-IV disease. **Fertil Steril**, v. 66, n. 5, p. 809-13, 1996.

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.

DA BROI, M. G. et al. Increased concentration of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in follicular fluid of infertile women with endometriosis. **Cell Tissue Res**, 2016.

DA BROI, M. G.; NAVARRO, P. A. Oxidative stress and oocyte quality: ethiopathogenic mechanisms of minimal/mild endometriosis-related infertility. **Cell Tissue Res**, v. 364, n. 1, p. 1-7, 2016.

DA BROI, M. G. et al. Influence of follicular fluid and cumulus cells on oocyte quality: clinical implications. **J Assist Reprod Genet**, v. 35, n. 5, p. 735-751, 2018.

DA BROI, M. G. et al. Oocyte oxidative DNA damage may be involved in minimal/mild endometriosis-related infertility. **Mol Reprod Dev**, v. 85, n. 2, p. 128-136, 2018.

DA LUZ, C. M. et al. PTGS2 down-regulation in cumulus cells of infertile women with endometriosis. **Reprod Biomed Online**, v. 35, n. 4, p. 379-386, 2017.

DAS, S. et al. Reactive oxygen species level in follicular fluid--embryo quality marker in IVF? **Hum Reprod**, v. 21, n. 9, p. 2403-7, 2006.

DE JONGE, C. J. et al. The acrosome reaction-inducing effect of human follicular and oviductal fluid. **J Androl**, v. 14, n. 5, p. 359-65, 1993.

DE LIMA, C. B. et al. Follicular fluid lipid peroxidation levels in women with endometriosis during controlled ovarian hyperstimulation. **Hum Fertil (Camb)**, v. 20, n. 1, p. 48-54, 2017.

DE SANTIS, L. et al. Polar body morphology and spindle imaging as predictors of oocyte quality. **Reprod Biomed Online**, v. 11, n. 1, p. 36-42, 2005.

DE ZIEGLER, D.; BORGHESE, B.; CHAPRON, C. Endometriosis and infertility: pathophysiology and management. **Lancet**, v. 376, n. 9742, p. 730-8, 2010.

DERECKA, K. et al. A PPAR-independent pathway to PUFA-induced COX-2 expression. **Mol Cell Endocrinol**, v. 287, n. 1-2, p. 65-71, 2008.

DMITRIEVA, N.; SUESS, G.; SHIRLEY, R. Resolvins RvD1 and 17(R)-RvD1 alleviate signs of inflammation in a rat model of endometriosis. **Fertil Steril**, v. 102, n. 4, p. 1191-6, 2014.

DONNEZ, J. et al. Large ovarian endometriomas. **Hum Reprod**, v. 11, n. 3, p. 641-6, 1996.

DONNEZ, J. et al. Oxidative stress in the pelvic cavity and its role in the pathogenesis of endometriosis. **Fertil Steril**, v. 106, n. 5, p. 1011-1017, 2016.

DOWNS, S. M.; HUNZICKER-DUNN, M. Differential regulation of oocyte maturation and cumulus expansion in the mouse oocyte-cumulus cell complex by site-selective analogs of cyclic adenosine monophosphate. **Dev Biol**, v. 172, n. 1, p. 72-85, 1995.

DOWNS, S. M.; MOSEY, J. L.; KLINGER, J. Fatty acid oxidation and meiotic resumption in mouse oocytes. **Mol Reprod Dev**, v. 76, n. 9, p. 844-53, 2009.

DUMESIC, D. A. et al. Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. **Fertil Steril**, v. 103, n. 2, p. 303-16, 2015.

DUNNING, K. R. et al. Beta-oxidation is essential for mouse oocyte developmental competence and early embryo development. **Biol Reprod**, v. 83, n. 6, p. 909-18, 2010.

DUNNING, K. R.; ROBKER, R. L. Promoting lipid utilization with L-carnitine to improve oocyte quality. **Anim Reprod Sci**, v. 134, n. 1-2, p. 69-75, 2012.

DUNNING, K. R. et al. Regulation of fatty acid oxidation in mouse cumulus-oocyte complexes during maturation and modulation by PPAR agonists. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e87327, 2014.

DUNNING, K. R.; RUSSELL, D. L.; ROBKER, R. L. Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and β -oxidation. **Reproduction**, v. 148, n. 1, p. R15-27, 2014.

EDWARDS, R. G. Follicular fluid. **J Reprod Fertil**, v. 37, n. 1, p. 189-219, 1974.

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.

EISENBACH, M. Mammalian sperm chemotaxis and its association with capacitation. **Dev Genet**, v. 25, n. 2, p. 87-94, 1999.

EVANS, A. M.; FORNASINI, G. Pharmacokinetics of L-carnitine. **Clin Pharmacokinet**, v. 42, n. 11, p. 941-67, 2003.

FALCONER, H. et al. IVF outcome in women with endometriosis in relation to tumour necrosis factor and anti-Müllerian hormone. **Reprod Biomed Online**, v. 18, n. 4, p. 582-8, 2009.

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.

FERREIRA, E. M. et al.. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71, n. 5, p. 836-48, 2009.

FILIPPI, F. et al. Ovarian endometriomas and oocyte quality: insights from in vitro fertilization cycles. **Fertil Steril**, v. 101, n. 4, p. 988-93.e1, 2014.

FLACHS, P. et al. Polyunsaturated fatty acids of marine origin upregulate mitochondrial biogenesis and induce beta-oxidation in white fat. **Diabetologia**, v. 48, n. 11, p. 2365-75, 2005.

FRITZ, I. B.; MARQUIS, N. R. The role of acylcarnitine esters and carnitine palmitoyltransferase in the transport of fatty acyl groups across mitochondrial membranes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 54, n. 4, p. 1226-33, 1965.

FULDEORE, M. J.; SOLIMAN, A. M. Prevalence and Symptomatic Burden of Diagnosed Endometriosis in the United States: National Estimates from a Cross-Sectional Survey of 59,411 Women. **Gynecol Obstet Invest**, v. 82, n. 5, p. 453-461, 2017.

FUNABIKI, H.; MURRAY, A. W. The *Xenopus* chromokinesin Xkid is essential for metaphase chromosome alignment and must be degraded to allow anaphase chromosome movement. **Cell**, v. 102, n. 4, p. 411-24, 2000.

GARCIA-VELASCO, J. A.; ARICI, A. Is the endometrium or oocyte/embryo affected in endometriosis? **Hum Reprod**, v. 14 Suppl 2, p. 77-89, 1999.

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.

GAZVANI, M. R. et al. High omega-3:omega-6 fatty acid ratios in culture medium reduce endometrial-cell survival in combined endometrial gland and stromal cell cultures from women with and without endometriosis. **Fertil Steril**, v. 76, n. 4, p. 717-22, 2001.

GAZVANI, R.; TEMPLETON, A. Peritoneal environment, cytokines and angiogenesis in the pathophysiology of endometriosis. **Reproduction**, v. 123, n. 2, p. 217-26, 2002.

GIACOMINI, E. et al. Characteristics of follicular fluid in ovaries with endometriomas. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 209, p. 34-38, 2017.

GIORGI, V. S. et al. N-Acetyl-Cysteine and L-Carnitine Prevent Meiotic Oocyte Damage Induced by Follicular Fluid From Infertile Women With Mild Endometriosis. **Reprod Sci**, v. 23, n. 3, p. 342-51, 2016.

GOSDEN, R. G. et al. Physiological factors underlying the formation of ovarian follicular fluid. **J Reprod Fertil**, v. 82, n. 2, p. 813-25, 1988.

GOUD, P. T. et al. Dynamics of nitric oxide, altered follicular microenvironment, and oocyte quality in women with endometriosis. **Fertil Steril**, v. 102, n. 1, p. 151-159.e5, 2014.

HAGHIAC, M. et al. Dietary Omega-3 Fatty Acid Supplementation Reduces Inflammation in Obese Pregnant Women: A Randomized Double-Blind Controlled Clinical Trial. **PLoS One**, v. 10, n. 9, p. e0137309, 2015.

HALBAN, J. **Metastatic hysteradenosis**: Wien klin Wochenschr. 37: 1205-1206 p. 1924.

HAMDAN, M. et al. The sensitivity of the DNA damage checkpoint prevents oocyte maturation in endometriosis. **Sci Rep**, v. 6, p. 36994, 2016.

HAMMICHE, F. et al. Increased preconception omega-3 polyunsaturated fatty acid intake improves embryo morphology. **Fertil Steril**, v. 95, n. 5, p. 1820-3, 2011.

HOPEMAN, M. M. et al. Serum Polyunsaturated Fatty Acids and Endometriosis. **Reprod Sci**, v. 22, n. 9, p. 1083-7, 2015.

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.

IWANOFF, N. **Dusiges cystenhaltiges uterusfibromyom compliciert durch sarcom und carcinom**: Monatsch Geburtshilfe Gynakol. 7: 295-300 p. 1898.

JOMOVA, K.; VALKO, M. Importance of iron chelation in free radical-induced oxidative stress and human disease. **Curr Pharm Des**, v. 17, n. 31, p. 3460-73, 2011.

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.

JUNGHEIM, E. S. et al. Elevated serum α -linolenic acid levels are associated with decreased chance of pregnancy after in vitro fertilization. **Fertil Steril**, v. 96, n. 4, p. 880-3, 2011.

KENNEDY, S. et al. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. **Hum Reprod**, v. 20, n. 10, p. 2698-704, 2005.

KHANAKI, K. et al. High ω -3: ω -6 fatty acids ratio increases fatty acid binding protein 4 and extracellular secretory phospholipase A2IIa in human ectopic endometrial cells. **Iran J Reprod Med**, v. 12, n. 11, p. 755-64, 2014.

KIM, N. H. et al. Microtubule and microfilament organization in maturing human oocytes. **Hum Reprod**, v. 13, n. 8, p. 2217-22, 1998.

KIM, T. H. et al. Differences in omega-3 and fatty acid profiles between patients with endometriosis and those with a functional ovarian cyst. **J Obstet Gynaecol**, v. 33, n. 6, p. 597-600, 2013.

KITAJIMA, M. et al. Endometriomas as a possible cause of reduced ovarian reserve in women with endometriosis. **Fertil Steril**, v. 96, n. 3, p. 685-91, 2011.

KURODA, M. et al. Histological assessment of impact of ovarian endometrioma and laparoscopic cystectomy on ovarian reserve. **J Obstet Gynaecol Res**, v. 38, n. 9, p. 1187-93, 2012.

LAMAITA, R. M. et al. Evaluation of N-acetylglucosaminidase and myeloperoxidase activity in patients with endometriosis-related infertility undergoing intracytoplasmic sperm injection. **J Obstet Gynaecol Res**, v. 38, n. 5, p. 810-6, 2012.

LEE, B. J. et al. Effects of L-carnitine supplementation on oxidative stress and antioxidant enzymes activities in patients with coronary artery disease: a randomized, placebo-controlled trial. **Nutr J**, v. 13, p. 79, 2014.

LIMOLI, C. L. et al. Apoptosis, reproductive failure, and oxidative stress in Chinese hamster ovary cells with compromised genomic integrity. **Cancer Res**, v. 58, n. 16, p. 3712-8, 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.

LIU, L. et al. Oxidative stress contributes to arsenic-induced telomere attrition, chromosome instability, and apoptosis. **J Biol Chem**, v. 278, n. 34, p. 31998-2004, 2003.

LONERGAN, P. et al. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. **Mol Reprod Dev**, v. 37, n. 1, p. 48-53, 1994.

LOUSSE, J. C. et al. Peritoneal endometriosis is an inflammatory disease. **Front Biosci (Elite Ed)**, v. 4, p. 23-40, 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.

MANDELBAUM, J. et al. Effects of cryopreservation on the meiotic spindle of human oocytes. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 113 Suppl 1, p. S17-23, 2004.

MANESCHI, F. et al. Ovarian cortex surrounding benign neoplasms: a histologic study. **Am J Obstet Gynecol**, v. 169, n. 2 Pt 1, p. 388-93, 1993.

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 Suppl, p. 2079-86, 2009.

MAREI, W. F. et al. Role of PTGS2-generated PGE2 during gonadotrophin-induced bovine oocyte maturation and cumulus cell expansion. **Reprod Biomed Online**, v. 28, n. 3, p. 388-400, 2014.

MBIZVO, M. T.; BURKMAN, L. J.; ALEXANDER, N. J. Human follicular fluid stimulates hyperactivated motility in human sperm. **Fertil Steril**, v. 54, n. 4, p. 708-12, 1990.

MEULEMAN, C. et al. High prevalence of endometriosis in infertile women with normal ovulation and normospermic partners. **Fertil Steril**, v. 92, n. 1, p. 68-74, 2009.

MIAO, Y. et al. The protective role of melatonin in porcine oocyte meiotic failure caused by the exposure to benzo(a)pyrene. **Hum Reprod**, v. 33, n. 1, p. 116-127, 2018.

MIRABI, P. et al. The role of fatty acids on ICSI outcomes: a prospective cohort study. **Lipids Health Dis**, v. 16, n. 1, p. 18, 2017.

MISSMER, S. A. et al. Incidence of laparoscopically confirmed endometriosis by demographic, anthropometric, and lifestyle factors. **Am J Epidemiol**, v. 160, n. 8, p. 784-96, 2004.

MOAWAD, A. R. et al. L-carnitine supplementation during vitrification of mouse germinal vesicle stage-oocytes and their subsequent in vitro maturation improves meiotic spindle configuration and mitochondrial distribution in metaphase II oocytes. **Hum Reprod**, 2014.

MOEN, M. H.; SCHEI, B. Epidemiology of endometriosis in a Norwegian county. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 76, n. 6, p. 559-62, 1997.

MONTJEAN, D. et al. Carnitine content in the follicular fluid and expression of the enzymes involved in beta oxidation in oocytes and cumulus cells. **J Assist Reprod Genet**, v. 29, n. 11, p. 1221-5, 2012.

MORAN, L. J. et al. Altered Preconception Fatty Acid Intake Is Associated with Improved Pregnancy Rates in Overweight and Obese Women Undertaking in Vitro Fertilisation. **Nutrients**, v. 8, n. 1, 2016.

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.

NADJARZADEH, A. et al. Effect of Omega-3 Supplementation on Visfatin, Adiponectin, and Anthropometric Indices in Women with Polycystic Ovarian Syndrome. **J Reprod Infertil**, v. 16, n. 4, p. 212-20, 2015.

NAKAGAWA, K. et al. Measurement of oxidative stress in the follicular fluid of infertility patients with an endometrioma. **Arch Gynecol Obstet**, v. 293, n. 1, p. 197-202, 2016.

NASIRI, N. et al. Oxidative Stress Statuses in Serum and Follicular Fluid of Women with Endometriosis. **Cell J**, v. 18, n. 4, p. 582-587, 2017.

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 Suppl 1, p. 1187-94, 2006.

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.

NEHRA, D. et al. Prolonging the female reproductive lifespan and improving egg quality with dietary omega-3 fatty acids. **Aging Cell**, v. 11, n. 6, p. 1046-54, 2012.

NETSU, S. et al. Oral eicosapentaenoic acid supplementation as possible therapy for endometriosis. **Fertil Steril**, v. 90, n. 4 Suppl, p. 1496-502, 2008.

NIKOLOFF, N. et al. Effect of eicosapentaenoic acid on bovine cumulus-oocyte complex in vitro. **Cell Biol Int**, v. 41, n. 5, p. 505-513, 2017.

NISOLLE, M.; DONNEZ, J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. **Fertil Steril**, v. 68, n. 4, p. 585-96, 1997.

O'NEILL, G. P.; FORD-HUTCHINSON, A. W. Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. **FEBS Lett**, v. 330, n. 2, p. 156-60, 1993.

OPØIEN, H. K. et al. Do endometriomas induce an inflammatory reaction in nearby follicles? **Hum Reprod**, v. 28, n. 7, p. 1837-45, 2013.

OSEIKRIA, M. et al. N-3 polyunsaturated fatty acid DHA during IVM affected oocyte developmental competence in cattle. **Theriogenology**, v. 85, n. 9, p. 1625-1634.e2, 2016.

PACZKOWSKI, M. et al. Comparative importance of fatty acid beta-oxidation to nuclear maturation, gene expression, and glucose metabolism in mouse, bovine, and porcine cumulus oocyte complexes. **Biol Reprod**, v. 88, n. 5, p. 111, 2013.

PAFFONI, A. et al. The Gametotoxic Effects of the Endometrioma Content: Insights From a Parthenogenetic Human Model. **Reprod Sci**, p. 1933719118777637, 2018.

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.

PARAZZINI, F. et al. Epidemiology of endometriosis and its comorbidities. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 209, p. 3-7, 2017.

PATEL, B. G. et al. Pathogenesis of endometriosis: Interaction between Endocrine and inflammatory pathways. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, 2018.

PAVLOK, A.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Mol Reprod Dev**, v. 31, n. 1, p. 63-7, 1992.

PELLICER, A. et al. The follicular endocrine environment in stimulated cycles of women with endometriosis: steroid levels and embryo quality. **Fertil Steril**, v. 69, n. 6, p. 1135-41, 1998.

PELLICER, A. et al. The follicular endocrine environment in stimulated cycles of women with endometriosis: steroid levels and embryo quality. **Fertil Steril**, v. 69, n. 6, p. 1135-41, 1998.

PHONGNIMITR, T. et al. Effect of L-carnitine on maturation, cryo-tolerance and embryo developmental competence of bovine oocytes. **Anim Sci J**, v. 84, n. 11, p. 719-25, 2013.

PREIS, K. A.; SEIDEL, G. E.; GARDNER, D. K. Reduced oxygen concentration improves the developmental competence of mouse oocytes following in vitro maturation. **Mol Reprod Dev**, v. 74, n. 7, p. 893-903, 2007.

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.

RAHBAR, N.; ASGHARZADEH, N.; GHORBANI, R. Effect of omega-3 fatty acids on intensity of primary dysmenorrhea. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 117, n. 1, p. 45-7, 2012.

REDWINE, D. B. Ovarian endometriosis: a marker for more extensive pelvic and intestinal disease. **Fertil Steril**, v. 72, n. 2, p. 310-5, 1999.

REGIANI, T. et al. Follicular fluid alterations in endometriosis: label-free proteomics by MS(E) as a functional tool for endometriosis. **Syst Biol Reprod Med**, v. 61, n. 5, p. 263-76, 2015.

REVELLI, A. et al. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 7, p. 40, 2009.

RODGERS, R. J.; IRVING-RODGERS, H. F. Formation of the ovarian follicular antrum and follicular fluid. **Biol Reprod**, v. 82, n. 6, p. 1021-9, 2010.

RUSSELL, W. **Aberrant portions of the mullerian duct found in an ovary. Ovarian cysts of mullerian origin:** Bull Johns Hopkins Hosp 1899.

SALVI, A. et al. Structural damage to proteins caused by free radicals: assessment, protection by antioxidants, and influence of protein binding. **Biochem Pharmacol**, v. 61, n. 10, p. 1237-42, 2001.

SAMPSON, J. A. Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation. **Am J Pathol**, v. 3, n. 2, p. 93-110.43, 1927.

SANCHEZ, A. M. et al. Iron availability is increased in individual human ovarian follicles in close proximity to an endometrioma compared with distal ones. **Hum Reprod**, v. 29, n. 3, p. 577-83, 2014.

SANCHEZ, A. M. et al. The distinguishing cellular and molecular features of the endometriotic ovarian cyst: from pathophysiology to the potential endometrioma-mediated damage to the ovary. **Hum Reprod Update**, v. 20, n. 2, p. 217-30, 2014.

SANTANAM, N.; ZONERAICH, N.; PARTHASARATHY, S. Myeloperoxidase as a Potential Target in Women With Endometriosis Undergoing IVF. **Reprod Sci**, v. 24, n. 4, p. 619-626, 2017.

SANTOS, R. R.; SCHOEVERS, E. J.; ROELEN, B. A. Usefulness of bovine and porcine IVM/IVF models for reproductive toxicology. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 12, p. 117, 2014.

SANTULLI, P. et al. Interleukin-19 and interleukin-22 serum levels are decreased in patients with ovarian endometrioma. **Fertil Steril**, v. 99, n. 1, p. 219-26, 2013.

SASSON, I. E.; TAYLOR, H. S. Stem cells and the pathogenesis of endometriosis. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1127, p. 106-15, 2008.

SCHULZ, H. Beta oxidation of fatty acids. **Biochim Biophys Acta**, v. 1081, n. 2, p. 109-20, 1991.

SCUTIERO, G. et al. Oxidative Stress and Endometriosis: A Systematic Review of the Literature. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2017, p. 7265238, 2017.

SHALGI, R. et al. Proteins of human follicular fluid: the blood-follicle barrier. **Fertil Steril**, v. 24, n. 6, p. 429-34, 1973.

SHARMA, R. K.; AZEEM, A.; AGARWAL, A. Spindle and chromosomal alterations in metaphase II oocytes. **Reprod Sci**, v. 20, n. 11, p. 1293-301, 2013.

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.

SINGH, A. K. et al. Altered circulating levels of matrix metalloproteinases 2 and 9 and their inhibitors and effect of progesterone supplementation in women with endometriosis undergoing in vitro fertilization. **Fertil Steril**, v. 100, n. 1, p. 127-34.e1, 2013a.

SINGH, A. K. et al. Markers of oxidative stress in follicular fluid of women with endometriosis and tubal infertility undergoing IVF. **Reprod Toxicol**, v. 42, p. 116-24, 2013b.

SINGH, A. K. et al. Intrafollicular interleukin-8, interleukin-12, and adrenomedullin are the promising prognostic markers of oocyte and embryo quality in women with endometriosis. **J Assist Reprod Genet**, v. 33, n. 10, p. 1363-1372, 2016.

SINGH, N. et al. Effect of endometriosis on implantation rates when compared to tubal factor in fresh non donor in vitro fertilization cycles. **J Hum Reprod Sci**, v. 7, n. 2, p. 143-7, 2014.

SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; MAYES, M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. **Theriogenology**, v. 49, n. 2, p. 483-97, 1998.

SMITH, M. P. et al. Total cortisol levels are reduced in the periovulatory follicle of infertile women with minimal-mild endometriosis. **Am J Reprod Immunol**, v. 47, n. 1, p. 52-6, 2002.

SOMFAI, T. et al. Enhancement of lipid metabolism with L-carnitine during in vitro maturation improves nuclear maturation and cleavage ability of follicular porcine oocytes. **Reprod Fertil Dev**, v. 23, n. 7, p. 912-20, 2011.

STADTMAN, E. R. Protein oxidation and aging. **Science**, v. 257, n. 5074, p. 1220-4, 1992.

SUGIURA, K.; PENDOLA, F. L.; EPPIG, J. J. Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism. **Dev Biol**, v. 279, n. 1, p. 20-30, 2005.

TAMAI, I. et al. Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2. **J Biol Chem**, v. 273, n. 32, p. 20378-82, 1998.

TANBO, T.; FEDORCSAK, P. Endometriosis-associated infertility: aspects of pathophysiological mechanisms and treatment options. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 96, n. 6, p. 659-667, 2017.

THOMPSON, J. G.; LANE, M.; GILCHRIST, R. B. Metabolism of the bovine cumulus-oocyte complex and influence on subsequent developmental competence. **Soc Reprod Fertil Suppl**, v. 64, p. 179-90, 2007.

TOMIO, K. et al. Omega-3 polyunsaturated Fatty acids suppress the cystic lesion formation of peritoneal endometriosis in transgenic mouse models. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e73085, 2013.

TVRZICKA, E. et al. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease--a review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, v. 155, n. 2, p. 117-30, 2011.

VALSANGKAR, D.; DOWNS, S. M. A requirement for fatty acid oxidation in the hormone-induced meiotic maturation of mouse oocytes. **Biol Reprod**, v. 89, n. 2, p. 43, 2013.

VAN BLERKOM, J.; DAVIS, P. Differential effects of repeated ovarian stimulation on cytoplasmic and spindle organization in metaphase II mouse oocytes matured in vivo and in vitro. **Hum Reprod**, v. 16, n. 4, p. 757-64, 2001.

VAN BLERKOM, J.; DAVIS, P. W.; LEE, J. ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in-vitro fertilization and embryo transfer. **Hum Reprod**, v. 10, n. 2, p. 415-24, 1995.

VAN LANGENDONCKT, A.; CASANAS-ROUX, F.; DONNEZ, J. Iron overload in the peritoneal cavity of women with pelvic endometriosis. **Fertil Steril**, v. 78, n. 4, p. 712-8, 2002.

VERCELLINI, P. et al. Coagulation or excision of ovarian endometriomas? **Am J Obstet Gynecol**, v. 188, n. 3, p. 606-10, 2003.

VERCELLINI, P. et al.. 'Blood On The Tracks' from corpora lutea to endometriomas. **BJOG**, v. 116, n. 3, p. 366-71, 2009.

VERCELLINI, P. et al.. Endometriosis: pathogenesis and treatment. **Nat Rev Endocrinol**, v. 10, n. 5, p. 261-75, 2014.

VIGANÒ, P. et al. Unravelling the ovarian endometrioma pathogenesis: "The long and winding road" across the various theories. **Journal of Endometriosis and Pelvic Pain Disorders**. v 5, p 62-67,. 2013.

VOLARCIK, K. et al. The meiotic competence of in-vitro matured human oocytes is influenced by donor age: evidence that folliculogenesis is compromised in the reproductively aged ovary. **Hum Reprod**, v. 13, n. 1, p. 154-60, 1998.

VON RECKLINGHAUSEN, F. Die Adenomyome und cystadenome der uterus und tubenwandung: **Berli. klin. Wochenschr.** 8 1895.

WAKEFIELD, S. L. et al. Maternal supply of omega-3 polyunsaturated fatty acids alter mechanisms involved in oocyte and early embryo development in the mouse. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 294, n. 2, p. E425-34, 2008.

WANG, J. et al. Follicular fluid levels of prostaglandin E2 and the effect of prostaglandin E2 on steroidogenesis in granulosa-lutein cells in women with moderate and severe endometriosis undergoing in vitro fertilization and embryo transfer. **Chin Med J (Engl)**, v. 125, n. 22, p. 3985-90, 2012.

WANG, W. H.; KEEFE, D. L. Prediction of chromosome misalignment among in vitro matured human oocytes by spindle imaging with the PolScope. **Fertil Steril**, v. 78, n. 5, p. 1077-81, 2002.

WATERS, S. M. et al. Effect of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on transcription factor regulation in the bovine endometrium. **Mol Biol Rep**, v. 41, n. 5, p. 2745-55, 2014.

WATHES, D. C.; ABAYASEKARA, D. R.; AITKEN, R. J. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. **Biol Reprod**, v. 77, n. 2, p. 190-201, 2007.

WITTMANN, T.; HYMAN, A.; DESAI, A. The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors. **Nat Cell Biol**, v. 3, n. 1, p. E28-34, 2001.

WU, G. et al. Intrafollicular inflammatory cytokines but not steroid hormone concentrations are increased in naturally matured follicles of women with proven endometriosis. **J Assist Reprod Genet**, v. 34, n. 3, p. 357-364, 2017.

WU, G. Q. et al. L-carnitine enhances oocyte maturation and development of parthenogenetic embryos in pigs. **Theriogenology**, v. 76, n. 5, p. 785-93, 2011.

WUNDER, D. M. et al. Steroids and protein markers in the follicular fluid as indicators of oocyte quality in patients with and without endometriosis. **J Assist Reprod Genet**, v. 22, n. 6, p. 257-64, 2005.

XU, B. et al. Oocyte quality is decreased in women with minimal or mild endometriosis. **Sci Rep**, v. 5, p. 10779, 2015.

XU, H. et al. Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) and monocyte chemotactic protein 1 in follicular fluid accumulate differentially in patients with and without endometriosis undergoing in vitro fertilization. **Fertil Steril**, v. 86, n. 6, p. 1616-20, 2006.

YALÇINKAYA, E. et al. Effect of follicular fluid NO, MDA and GSH levels on in vitro fertilization outcomes. **J Turk Ger Gynecol Assoc**, v. 14, n. 3, p. 136-41, 2013.

YAZAKI, T. et al. L-carnitine improves hydrogen peroxide-induced impairment of nuclear maturation in porcine oocytes. **Anim Sci J**, v. 84, n. 5, p. 395-402, 2013.

ZHANG, Q. F. et al. Relationship between resistin and IL-23 levels in follicular fluid in infertile patients with endometriosis undergoing IVF-ET. **Adv Clin Exp Med**, v. 26, n. 9, p. 1431-1435, 2017.

ZHANG, X. et al. Deficit of mitochondria-derived ATP during oxidative stress impairs mouse MII oocyte spindles. **Cell Res**, v. 16, n. 10, p. 841-50, 2006.

ZHOU, H. et al. Involvement of follicular basement membrane and vascular endothelium in blood follicle barrier formation of mice revealed by 'in vivo cryotechnique'. **Reproduction**, v. 134, n. 2, p. 307-17, 2007.

APÊNDICES

APÊNDICE A: Caracterização das pacientes doadoras de fluidos foliculares utilizados em cada replicata de maturação *in vitro* de oócitos bovinos

	Grupo	Idade	IMC	Protocolo de EOC	Endometrioma
MIV 1	Controle	34	24,6	Estimulação mínima	-
	EI/II	34	21,9	Estimulação mínima	-
	EIII/IV	33	24,7	Estimulação mínima	-
	E endometrioma	33	20,9	Estimulação mínima	Contralateral
MIV2	Controle	36	24,9	Antagonista flexível	-
	EI/II	39	21,4	Antagonista flexível	-
	EIII/IV	37	24,9	Antagonista flexível	-
	E endometrioma	36	22,6	Antagonista flexível	Contralateral
MIV3	Controle	38	21,7	Estimulação mínima	-
	EI/II	37	25,0	Estimulação mínima	-
	EIII/IV	33	24,9	Estimulação mínima	-
	E endometrioma	34	20,3	Estimulação mínima	Contralateral
MIV4	Controle	33	27,9	Antagonista flexível	-
	EI/II	31	29,8	Antagonista flexível	-
	EIII/IV	29	27,6	Antagonista flexível	-
	E endometrioma	32	27,4	Antagonista flexível	Contralateral
MIV5	Controle	37	24,5	Antagonista flexível	-
	EI/II	37	27,6	Antagonista flexível	-
	EIII/IV	38	28,0	Antagonista flexível	-
	E endometrioma	37	20,9	Antagonista flexível	Contralateral
MIV6	Controle	36	24,6	Antagonista flexível	-
	EI/II	35	22,3	Antagonista flexível	-
	EIII/IV	29	24,1	Antagonista flexível	-
	E endometrioma	38	19,5	Antagonista flexível	Ipsilateral
MIV7	Controle	36	27,9	Antagonista flexível	-
	EI/II	34	27,4	Antagonista flexível	-
	EIII/IV	33	27,3	Antagonista flexível	-
	E endometrioma	34	29,4	Antagonista flexível	Ipsilateral
MIV8	Controle	38	29,4	Antagonista flexível	-
	EI/II	32	21,6	Antagonista flexível	-
	EIII/IV	29	21,7	Antagonista flexível	-
	E endometrioma	35	24,5	Antagonista flexível	Contralateral

APÊNDICE B: Dados de estágios de maturação nuclear, e porcentagem de oócitos em MII normais de acordo com as oito replicatas de maturação *in vitro* de oócitos bovinos realizadas.

	Oócitos fixados pós-MIV n	Visualizados n	MI n (%)	T1 n (%)	AP n (%)	MII		
						Total de MII	Analisáveis	Normais
						n (%)	n (%)	n (%)
MIV 1	166	161	37(22,9%)a	3 (1,9%)	0 (0%)	121 (75,2%)c	87 (71,9%)a	71 (81,6%)
MIV 2	220	198	21 (10,6%)bc	2 (1,0%)	2 (1,0%)	173 (87,4%)ab	110 (63,6%)	90 (81,8%)
MIV 3	260	230	35 (15,2%)ab	7 (3,0%)	4 (1,7%)	184 (80,0%)bc	126 (68,5%)a	103 (81,7%)
MIV 4	223	222	26 (11,7%)bc	2 (0,9%)	5 (2,3%)	189 (85,1%)ab	115 (60,8%)	89 (77,4%)
MIV 5	213	215	14 (6,5%)c	2 (0,9%)	4 (1,9%)	195 (90,7%)a	107 (54,9%)b	80 (74,8%)
MIV 6	144	100	14 (14,0%)	3 (3,0%)	0 (0%)	83 (83,0%)ab	46 (55,4%)b	35 (76,1%)
MIV 7	178	150	12 (8,0%)bc	2 (1,3%)	5 (3,3%)	131 (87,3%)ab	74 (56,5%)b	58 (78,4%)
MIV 8	157	125	8 (6,4%)c	4 (3,2%)	1 (8,0%)	112 (89,6%)a	70 (62,5%)	52 (74,3%)

Nota-se: MIV: maturação *in vitro*; MI = metáfase I; T1 = telófase I; MII = metáfase II; AP = ativação partenogenética. Analisáveis: oócitos com fuso fixado em uma visão lateral ou sagital. Cada replicata foi realizada dividindo o n° de oócitos em 9 grupos (sem-FF, FFControle, FFControle+LC+AG, FFEleve, FFEleve+LC+AG, FFEgrave, FFEgrave+LC+AG, FFendometrioma e FFendometrioma+LC+AG) Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística, $p < 0,05$, usando teste de qui-quadrado.

***MANUSCRITO A SER SUBMETIDO PARA
HUMAN REPRODUCTION***

1 Title: L-carnitine and omega-3 fatty acids prevent meiotic damages in bovine oocytes
2 matured *in vitro* with follicular fluid from infertile women with endometriosis

3 Running title: Endometriosis, L-carnitine and omega-3

4

5 VSI Giorgi^{1*}; RA Ferriani^{1,2}; PAS Navarro^{1,2}.

6

7 ¹ Human Reproduction Division, Department of Gynecology and Obstetrics, Faculty
8 of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, SP, Brazil.

9 ² National Institute of Hormones and Women's Health, National Council for Scientific
10 and Technological Development (CNPq), Brazil.

11

12 ***Corresponding author:**

13 E-mail: vanessasig@gmail.com (VSIG)

14

15

16

17 **Abstract**

18 **Study question:** Does supplementation of *in vitro* maturation (IVM) medium with L-
19 carnitine (LC) and omega-3 fatty acids [docosahexaenoic (DHA) and
20 eicosapentaenoic acids (EPA)] prevent oocyte damages induced by follicular fluid
21 (FF) from infertile women with endometriosis in early (minimal/mild – EI/II) and
22 advanced stages [moderate/severe (EIII/IV) without or with endometrioma
23 (Eendometrioma)]?

24 **Summary answer:** LC and omega-3 fatty acids prevent damages on nuclear
25 maturation and on meiotic spindle assembly and chromosome alignment of bovine
26 oocytes matured *in vitro* with FF from endometriosis I/II and III/IV stages.

27 **What is known already:** One of the possible mechanisms involved in infertility
28 related to endometriosis is the poor oocyte quality. During acquisition of oocyte
29 competence, adequate ATP levels is fundamental to polar body extrusion and
30 meiotic spindle assembly. β -oxidation is an important mitochondrial pathway to
31 generate ATP from fatty acids oxidation, and LC play transferring long-chain fatty
32 acids (like omega-3 fatty acids) from cytosol to mitochondrial matrix.

33 **Study design, size, duration:** Experimental study using bovine model. Thirty two FF
34 samples were obtained of March to October 2013, and May/2016 to September/2017
35 from infertile women who underwent ovarian stimulation for intracytoplasmic sperm
36 injection (ICSI) [8 with EI/II, 8 with EIII/IV, 8 with Eendometrioma and 8 with tubal
37 and/or male factor infertility (control group)]. IVM experiments were performed
38 between November 2017 and January 2018 using immature bovine oocytes.

39 **Participants/materials, setting, methods:** Immature bovine oocytes obtained of
40 ovaries from slaughterhouse were submitted to IVM divided into 9 groups: no FF (No-
41 FF), with 1% FF from infertile women without endometriosis (CFF), with EI/II, EIII/IV

42 and Eendometrioma, with the addition of LC and omega-3 fatty acids (LC+n3). Eight
43 replicates were performed using an individual FF of each group. After 22-24 h of IVM,
44 the oocytes were denuded, fixed and fluorescently labelled for the morphological
45 visualization of microtubules and chromatin by confocal microscopy. Nuclear
46 maturation rate and normal methaphase II (MII) rate were analyzed by chi-square
47 test ($p < 0.05$).

48 **Main results and the role of chance:** Addition of LC+n3 restored maturation rate
49 increasing methaphase II (MII) rate in groups with EIII/IV (80.7% vs 90.8%:
50 $p = 0.0190$) and Eendometrioma (69.3% vs 86.4%: $p = 0.0004$), and it prevented
51 damages in spindle and chromosome alignment in MII oocytes in groups EI/II (62.2%
52 vs 84.5%, $p = 0.00205$) and EIII/IV (70.2% vs 84.1%, $p = 0.04995$). FF from EI/II
53 (62.2%), EIII/IV (70.2%) and Eendometrioma (72.7%) decreased normal MII rate
54 compared to No-FF (87.2% vs EI/II: $p = 0.0002$; vs EIII/IV: $p = 0.0092$; vs
55 Eendometrioma: $p = 0.0350$) and CFF (87.2% vs EI/II: $p = 0.0006$; vs EIII/IV: $p = 0.0152$;
56 vs Eendometrioma: $p = 0.0486$). EI/II (85.4%) did not alter nuclear maturation rate, but
57 EIII/IV (80.7%) and Eendometrioma (69.3%) decreased total MII rate compared to
58 No-FF (91.9% vs EIII/IV: $p = 0.0068$; vs Eendometrioma: $p < 0.0001$) and CFF (89.2%
59 vs EIII/IV: $p = 0.054$; vs Eendometrioma: $p < 0.0001$), and Eendometrioma had lower
60 total MII rate compared to another groups including EIII/IV ($p = 0.0268$)

61 **Limitations, reasons for caution:** Due to the rigorous criteria for the selection of FF
62 donors, the sample size of the present study was small. We used FF from women
63 who underwent ovarian stimulation, a fact that renders questionable the extrapolation
64 of the result to natural cycles. In addition, this was an experimental study; therefore,
65 studies using *in vivo* matured oocytes from infertile women with endometriosis will be
66 important to confirm the present results.

67 **Wider implications of the findings:** The present results elucidate part of the
68 etiopathogenic mechanisms of infertility related to endometriosis, suggesting that
69 oxidative stress and β -oxidation alterations are factors involved in worst of oocyte
70 quality in women with endometriosis. We observed which FF from endometriosis,
71 regardless of stage of disease, damages meiotic spindle assembly and chromosome
72 alignment of bovine MII oocytes; however, EIII/IV (with and without endometrioma)
73 also had nuclear maturation impairment, and presence of endometrioma had further
74 negative impact in oocyte maturation. Besides that, we demonstrated that LC+n3
75 supplementation during IVM fully prevented the deleterious effects of the FF from
76 women with endometriosis on the nuclear maturation and oocyte spindle, and
77 therefore, we ask whether the use of LC and ω -3 could improve the natural
78 fertility and/or the results of *in vitro* fertilisation of women with endometriosis.

79 **Study funding/competing interest(s):** This study was supported by the
80 Coordination of Improvement of Higher Level Personnel, Brazil. The authors declare
81 no conflict of interest.

82 **Trial registration number:** Not applicable.

83 **Key words:** Endometriosis; Female infertility; Follicular fluid; Oocyte quality; L-
84 carnitine; Omega-3; Docosahexaenoic acid; Eicosapentaenoic acid; Antioxidant; β -
85 oxidation.

86

87 Introduction

88 Endometriosis is a gynecological, inflammatory and estrogen dependent
89 disease, characterized by the presence and growth of endometrial tissue (glands and
90 stroma) outside the uterine cavity (Kennedy, et al., 2005). The prevalence of
91 endometriosis is 25-50% in the population of infertile women, and among women
92 with endometriosis, approximately 30-50% have problems with infertility (Missmer, et
93 al., 2004).

94 The American Society of Medicine Reproductive (ASRM) classifies
95 endometriosis in 4 stages: minimal (I), mild (II), moderate (III) and severe (IV)
96 (ASRM, 1997). In most of cases of endometriosis in advanced stages (III/IV), it is
97 easy justify infertility due to pelvic anatomical alterations by adhesions, deep lesion
98 and endometrioma, hampering ovulation, the tubal transport of the embryo and,
99 possibly, the embryonic implantation (de Ziegler, et al., 2010). However, even in the
100 initial cases of endometriosis (I/II), when there is no anatomical alteration of the
101 pelvic cavity, a decrease in the monthly fertility rate is reported (Bérubé, et al., 1998,
102 Parazzini, 1999).

103 Although controversial, studies have suggested worsening of oocyte quality as
104 one of the events responsible for the infertility related to endometriosis (Barcelos, et
105 al., 2009, Da Broj, et al., 2014, Mansour, et al., 2010, Pellicer, et al., 2001), but the
106 mechanisms leading to this impairment is unknown (Díaz, et al., 2000, Simón, et al.,
107 1994). Study using oocyte donation program reported similar implantation and
108 pregnancy rates in women with and without endometriosis who received oocytes
109 from endometriosis-free donor, however, implantation rates were lower in women
110 without the disease who received oocytes from women with endometriosis (Simón, et
111 al., 1994).

112 Human oocytes are extremely rare and their use in invasive studies is
113 generally not feasible because it prevents their use in Assisted Reproductive
114 Techniques (ART). Thus, studies evaluating *cumulus* cells or follicular fluid (FF) could
115 help understanding the acquisition of oocyte competence (Da Broi, et al., 2018).

116 Addition of FF from infertile women with mild endometriosis to the *in vitro*
117 maturation (IVM) medium of bovine oocytes compromises the quality of bovine
118 oocytes (evaluated through chromosomal alignment and meiotic spindle
119 organization) when compared to the addition of FF from infertile women without
120 endometriosis (Da Broi, Malvezzi, Paz, Ferriani and Navarro, 2014). The antioxidants
121 L-carnitine (LC) and N-acetyl-cysteine (NAC) prevented such meiotic oocyte damage,
122 indicating that oxidative stress (OS) is involved in the etiopathogenesis of
123 endometriosis-related infertility, however, LC was superior to NAC, preventing,
124 completely such damage (Giorgi, et al., 2016).

125 LC, in addition to its antioxidant function, plays a fundamental role in cell
126 energy generation, since its main biological function is to transport long chain fatty
127 acids from the cytosol to the mitochondria where β -oxidation occurs, a process that
128 results in the esterification of LC to form acyl-Carnitine derivatives, producing energy
129 in the form of ATP (Evans and Fornasini, 2003). β -oxidation is essential for the
130 resumption of oocyte meiosis and nuclear maturation in mice (Downs, et al., 2009,
131 Paczkowski, et al., 2013, Valsangkar and Downs, 2013), swine and cattle
132 (Paczowski, Silva, Schoolcraft and Krisher, 2013).

133 Oxidation of a molecule of fatty acid (palmitic acid) generates approximately
134 106 ATPs compared to 30 ATPs produced by oxidation of a glucose molecule
135 (Dunning, et al., 2014). Fatty acids can be classified as saturated, monounsaturated
136 and polyunsaturated (PUFA). Mammals, including humans, fail to synthesize

137 adequate amounts of omega-3 and omega-6 PUFAs (Wathes, et al., 2007). Two
138 important omega-3 fatty acids are: docosahexaenoic acid (DHA) and
139 eicosapentaenoic acid (EPA).

140 There are two studies evaluating the addition of omega-3 to the IVM medium
141 of bovine oocyte (Nikoloff, et al., 2017, Oseikria, et al., 2016). Oseikria et al. (2016)
142 showed that, at low concentrations, DHA increases oocyte competence assessed by
143 increased cleavage rates and blastocyst formation after parthenogenetic activation.
144 Nikoloff et al. (2017) showed that the addition of EPA improves the oocyte quality
145 observed by increased *cumulus* cell expansion.

146 There are no studies in the literature evaluating the impact of the
147 endometriosis stage on oocyte quality and the possible prevention of oocyte damage
148 with the combined administration of LC, DHA and EPA. Therefore, our primary
149 objective was to evaluate the impact of the addition of LC and DHA/EPA (n3) to the
150 IVM medium containing FF from infertile women with and without endometriosis on
151 nuclear maturation and organization of the meiotic spindle and chromosomes in
152 bovine oocytes by confocal microscopy. And as secondary objective, we evaluated
153 the impact of the endometriosis stage on bovine oocyte quality (nuclear maturation
154 and organization of the meiotic spindle and chromosomes) by adding FF from
155 women with and without endometriosis in the early and advanced stages (with and
156 without endometrioma) to the IVM medium of bovine oocytes.

157

158 Materials and Methods

159 We performed an experimental study previously approved by the Research
160 Ethics Committee of the Hospital das Clínicas of the Medical School of Ribeirão
161 Preto (HC-FMRP), University of São Paulo (USP) (Process HCRP nº 12201/2008)
162 and by the Ethics Committee in Animal Experimentation of FMRP - USP (nº
163 169/2008).

164 We used bovine ovaries from local slaughterhouse. And bovine model was
165 chose due to the similarity in human and bovine ovarian size and morphology,
166 because both species are mono-ovulatory and polycyclic and because it is an
167 abundant material, low cost, easily manipulated (Malhi, et al., 2005, Santos, et al.,
168 2014).

169

170 Patient selection and follicular fluid collection

171 FF samples were obtained during March to October/2013 and May/2016 to
172 September/2017 from infertile women who underwent ovarian stimulation for
173 intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in the Sector of Human Reproduction,
174 Department of Gynaecology and Obstetrics, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto,
175 University of São Paulo (FMRP-USP). All patients gave written informed consent to
176 participate.

177 Inclusion criteria were as follows: age <40 years; body mass index (BMI) \leq 30
178 kg/m²; serum concentration of follicle stimulating hormone (FSH) on the third day of
179 the menstrual cycle \leq 12 mIU/mL; absence of chronic anovulation; presence of
180 hydrosalpinx or of chronic diseases such as diabetes mellitus or any other
181 endocrinopathy; absence of cardiovascular disease; absence of dyslipidemia;
182 absence of systemic lupus erythematosus or any other rheumatologic disease;

183 absence of HIV infection or any active infection; be no-smoking; have not use
184 vitamins, hormonal or non-hormonal medications during a period of 6 months before
185 the inclusion in the study; have undergone to a videolaparoscopy examination.

186 The control group consisted of infertile women due to tubal factors and/or
187 whose mate had infertility (male factor). All patients were submitted to
188 videolaparoscopy examination for inspection of the pelvic / abdominal cavity and
189 exclusion of endometriosis.

190 The endometriosis group was subdivided into early stage endometriosis
191 (minimal or mild, EI/II) and advanced endometriosis (moderate or severe) without
192 (EIII/IV) or with endometrioma in the cycle (Eendometrioma). Previous
193 videolaparoscopy was performed for the diagnosis and classification of
194 endometriosis according to ASRM criteria (Asrm, 1997). Eendometrioma group
195 presented endometrioma in the cycle visualized by transvaginal ultrasonography.

196

197 Protocol of controlled ovarian stimulation

198 According to the characteristics of each patient, two distinct protocols of
199 controlled ovarian stimulation (COS) were applied as described below:

200 - Flexible antagonist protocol: gonadotrophins (150-300 IU / day) were
201 administered in the first six days of COS, with the dose adjusted daily according to
202 follicular growth.

203 - Minimal stimulation protocol (clomiphene citrate plus gonadotrophins and
204 GnRH antagonist): clomiphene citrate (100 mg / day) was administered during the
205 first five days of COS and gonadotrophins (150 IU / day) were given on days two and
206 four, and daily from day six.

207 The GnRH antagonist (ganirelix or cetrorelix 0.25 mg/day) was started when
208 the mean diameter of the largest follicle was ≥ 14 mm. Recombinant hCG (250 μ g,
209 Ovidrel®, Serono, Brazil) or urinary hCG (10,000 IU, Choriomon®, Meizler, Brazil)
210 was administered when at least one follicle with a mean diameter of 18 mm was
211 present. Oocytes were collected 34 to 36 hours after the administration of
212 recombinant hCG, and the luteal phase was maintained by administration of
213 micronized progesterone (600 mg / day).

214 Before COS, oral contraceptive (Miranova®, Bayer or Level®, Biolab) was
215 prescribed for all patients with the goal of synchronizing and scheduling the start of
216 the COS.

217

218 Collection and processing of FF samples

219 FF samples were obtained during oocyte recovery to perform ICSI. To avoid
220 possible interference of successive ovarian punctures, FF was obtained from the first
221 follicle (diameter ≥ 15 mm) of the first ovary punctured.

222 These samples were immediately taken to the embryology laboratory, where
223 embryologists checked for the presence of oocytes and/or granulosa cells. Oocytes
224 were separated from the FF for use during ART and the FF was centrifuged at 300 g
225 for 10 minutes, aliquoted and stored at -80°C .

226 Samples that did not contain oocyte and/or granulosa cells were excluded,
227 since in these cases it would not be possible to state that the ovarian follicle
228 punctured had an oocyte in the process of maturation.

229 FF was collected from 39 infertile women, 12 without endometriosis, 8 with
230 EI/II, 11 with EIII/IV without endometrioma and 8 with endometrioma.

231 For this study, FF sample of each patient was used just one time in each 8
232 bovine IVM performed.

233

234 Oocyte collection

235 Bovine ovaries were collected immediately after slaughter and transported in
236 physiological saline at 35-38.5°C. In the laboratory, follicles measuring 2 to 8 mm
237 were aspirated and only *cumulus*-oocyte complexes (COCs) with homogeneous
238 cytoplasm and at least three layers of cumulus oophorus cells were selected (Adona
239 and Lima Verde Leal, 2004, Ferreira, et al., 2009).

240

241 *In vitro* maturation (IVM)

242 COCs were cultured in 400 µL drops of culture medium for IVM (approximately
243 20 oocytes per drop) at 38.5°C, 95% humidity and 5% CO₂ (Adona and Lima Verde
244 Leal, 2004, Ferreira, Vireque, Adona, Ferriani and Navarro, 2009, Hashimoto, et al.,
245 2002) in a culture system without mineral oil. The IVM medium used was TCM-199
246 containing Earle's salts and bicarbonate (Invitrogen, Gibco Laboratories Life
247 Technologies, Inc., Grand Island, NY, USA) supplemented with 0.4 mM sodium
248 pyruvate, 0.5 µg/mL gentamicin, 5 µg/mL FSH, 2.5 UI/mL hCG (Chorulon®), 1 µg/mL
249 estradiol and 10% foetal calf serum (FCS; Gibco).

250 Duration of IVM was 22-24 h.

251

252 Preparation of antioxidant (N-acetyl-cysteine and L-carnitine) solutions

253 L-carnitine

254 The concentration of LC (Sigma Aldrich C0283) used to supplement the IVM
255 experiments as described below was 0.6 mg/mL (Giorgi, Da Broi, Paz, Ferriani and

256 Navarro, 2016, Mansour, et al., 2009). The stock solution was prepared at a
257 concentration 100 times higher than the working solution (stock solution: 60 mg/mL
258 LC) with injection water, filtered through a 0.22 µm pore filter, aliquoted and stored at
259 -20 ° C.

260

261 Omega 3 Fatty Acids

262 The final concentration of omega-3 fatty acids used to supplement the IVM
263 experiments as described below was 1 nM (Nikoloff, Pascua, Anchordoquy,
264 Anchordoquy, Sirini, Seoane and Furnus, 2017). Being that 0.4 nM was DHA (Sigma
265 Aldrich D2534) and 0.6 nM EPA (Sigma Aldrich E2011). The ratio of 2:3 DHA/EPA
266 was chosen based on the composition of commercial supplements based on fish oil
267 (Omega-3 Essential® brands: Sidney Oliveira®, Equaliv®, Country Life®, Solgar®,
268 Catarienense®) and supplements used in randomized clinical trials [180 mg of EPA
269 and 120 mg of DHA for women with polycystic ovary syndrome who wanted to
270 perform ART (Nadjarzadeh, et al., 2015), 1200 mg of EPA and 800 mg of DHA for
271 obese women (Haghiac, et al., 2015), 180 mg of EPA and 120 mg of DHA for young
272 women with dysmenorrhea (Rahbar, et al., 2012)].

273 Stock solutions of the fatty acids were prepared in a concentration 100 fold
274 higher than the final concentrations (stock solutions: 40 nM DHA and 60 nM EPA)
275 with DMSO, filtered through a 0.22 µm pore filter and stored at -20 ° C.

276

277 Fixation and immunofluorescence for the visualization of microtubules and
278 chromosomes

279 After IVM, *cumulus* cells were separated from the oocytes by pipetting. The
280 oocytes were fixed and left to stand for 30 minutes in a buffer for microtubule

281 stabilization (Ferreira, Vireque, Adona, Ferriani and Navarro, 2009, Liu, et al., 1998).
282 The oocytes were washed and blocked during 2 hours at 37°C in washing medium
283 consisting of phosphate buffer saline (PBS) supplemented with 0.02% NaN₃, 0.01%
284 Triton X-100, 0.2% defatted dry milk, 2% goat serum, 2% bovine serum albumin, and
285 0.1 M glycine. The oocytes were incubated overnight at 4°C with an anti-β-tubulin
286 murine monoclonal antibody (1:1000) and were washed and incubated with a
287 secondary fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-mouse IgG antibody
288 (1:500. Zymed Laboratories, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) at 38.5°C for 2 h. The
289 oocytes were submitted to an additional washing and were labelled with Hoechst
290 33342 (10 mg/mL) in Vectashield mounting medium (H-1000, Vector, Burlingame,
291 CA, USA) on a glass slide covered with a coverslip. The samples were visualized
292 using a high-performance confocal microscope (Confocal Leica TCS SP5, Leica
293 Microsystems, Mannheim, Germany) at 40X magnification with 405 nm Diode UV
294 and 543 nm HeNe lasers.

295

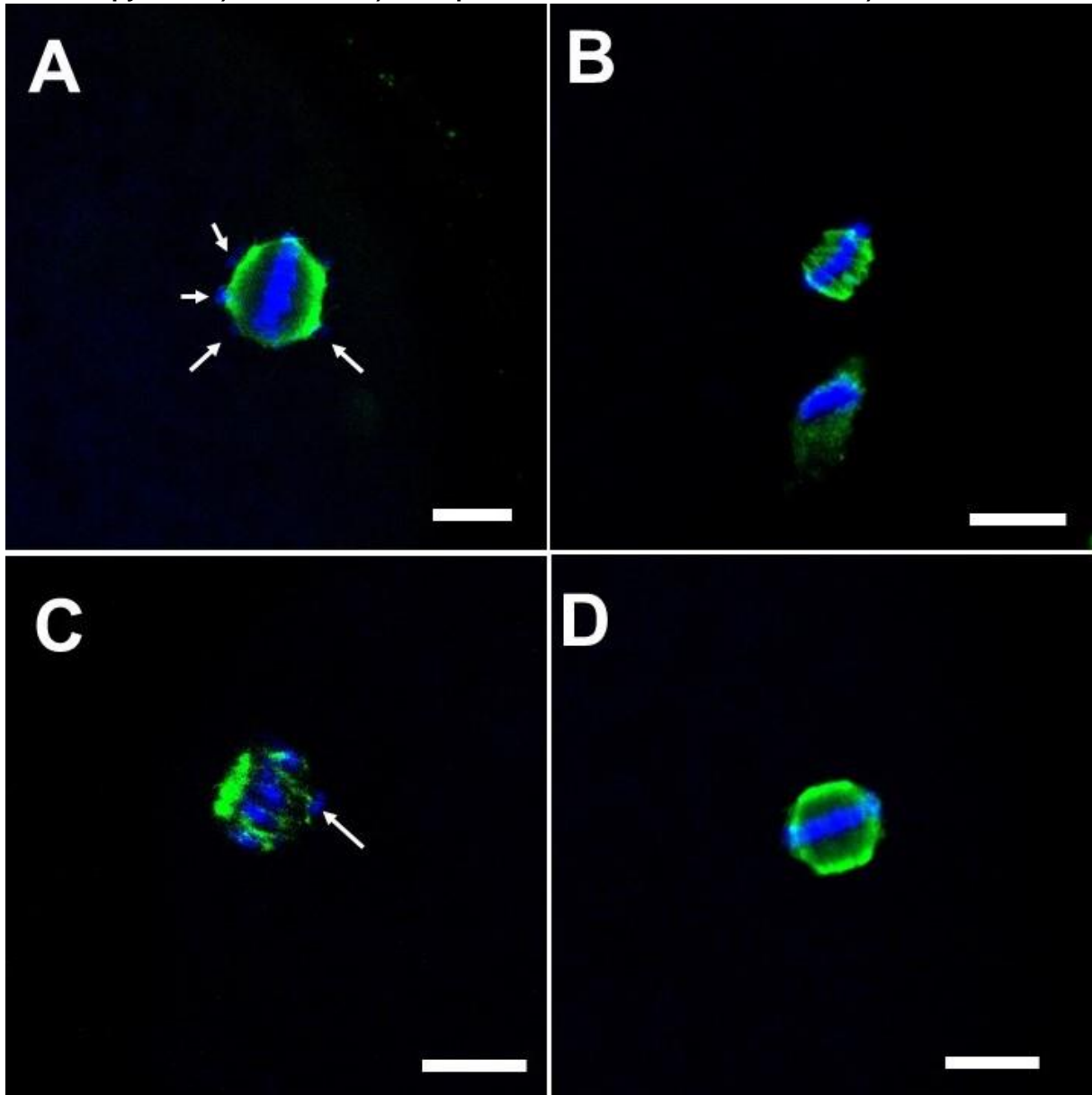
296 Oocyte classification based on meiotic spindle morphology and chromosome
297 alignment

298 Based on the stage of nuclear maturation, the oocytes were classified as
299 metaphase I (MI), telophase I (TI) or metaphase II (MII), or as parthenogenetically
300 activated (PA). MII oocytes were subdivided into analyzable and non-analyzable
301 groups according to the position of visualization of the metaphase plate. The oocytes
302 were considered analyzable when the meiotic spindle was visualized in a lateral or
303 sagittal position and non-analyzable when the spindle was observed in a polar
304 position (Ju, et al., 2005). MII oocytes were classified as “normal” when they
305 exhibited a barrel-shaped meiotic spindle with microtubules organized from one pole

306 to the other, chromosomes aligned on the metaphase plate at the equator of the
307 spindle (Figure 1D) and the presence of a polar body (PB), or classified as
308 “abnormal” when they showed an altered meiotic spindle (reduced longitudinal
309 dimension, disorganized or absent microtubules, dispersed or dislocated from the
310 plane of the metaphase plate) (Figure 1A-C). PA was characterized by the
311 spontaneous extrusion of a second PB without the occurrence of fertilization or
312 telophase II.

313

Figure 1: Classification of bovine oocytes matured in vitro, in metaphase II, according to the organization of the meiotic spindle and chromosomal alignment analyzed by confocal microscopy. A-) to C-) represent abnormal and D-) normal MII.



Note: A-) Normal spindle, misaligned chromosomes; B-) Incomplete spindle and aligned chromosomes; C-) Abnormal spindle and misaligned chromosomes and D-) Normal spindle and aligned chromosomes (normal MII). In green, meiotic spindle labeled with monoclonal antibody anti- β -tubulin and secondary antibody conjugated to FITC. In blue, label for genetic material with Hoechst 33342. White bar in lower right corner: 10 μ m scale. White arrow indicates misaligned chromosomes

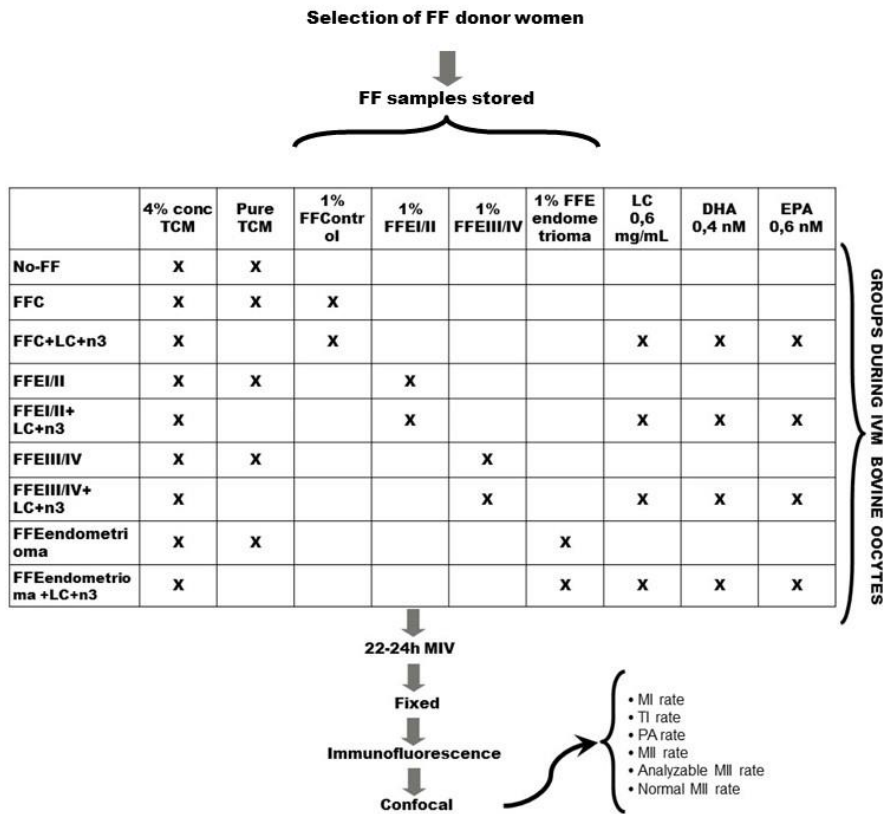
314

315 Experimental design

316 Figure 2 illustrates the experimental design performed in this study.

317

318 **Figura 2: Experimental design**



319

320 **Statistical analysis**

321 Data were analyzed using RStudio software version 1.0.153, 2009-2017 [R
 322 Core Team (2017). A: A language and environment for statistical computing. R
 323 Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL [https://www.R-](https://www.R-project.org/)
 324 [project.org/](https://www.R-project.org/)]. The results were presented in a table.

325 The categorical variables (percentage of MI, percentage of TI, percentage of
 326 PA, percentage of MII, percentage of MII analysable, percentage of normal MII) were
 327 compared between the groups using the chi-square test, with the level of significance
 328 set at $p < 0.05$.

329

330 **Sample Calculation**

331 Based on previous studies by our group (Da Broi, Malvezzi, Paz, Ferriani and
 332 Navarro, 2014, Giorgi, Da Broi, Paz, Ferriani and Navarro, 2016) that demonstrated a

333 difference in the percentage of normal MII of ~ 30% between the No-FF and FFEI/II
 334 groups, and considering a test power of 80% ($\beta = 0.2$ and $\alpha = 0.05$), a total of 87
 335 analyzing oocytes per group could be required. Therefore, our test power ranged
 336 from 68-83%.

337

338 Results

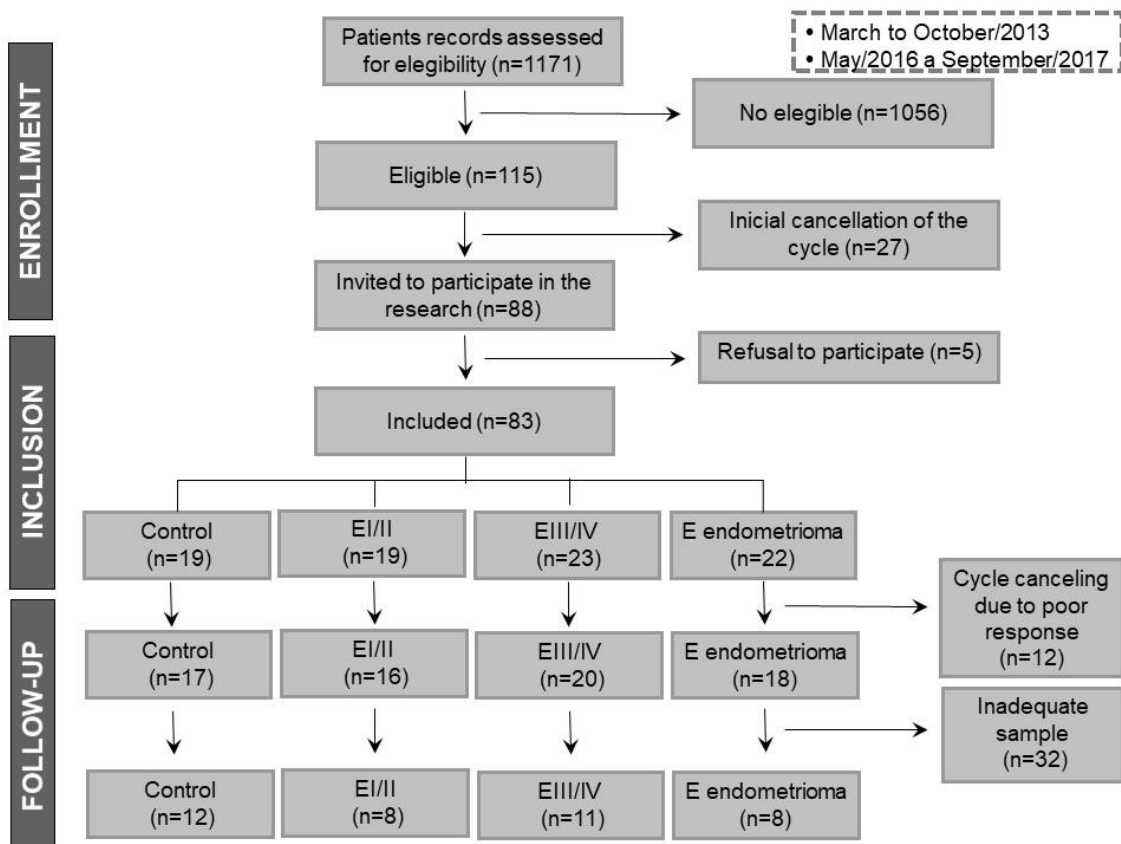
339 Eight IVM experiments were performed, and one FF sample of each group
 340 was used individually in each of the experiments.

341

342 Flow-chart of selection of FF donors

343 Figure 3 represents Flow-chart of selection of FF donors.

344 **Figure 3: Flow-chart of recruitment of patients donors of follicular fluid**



345

346 A total of 39 FF samples were processed and stored at -196 ° C until further
 347 use. The choice of samples in each experiment was chosen based on age, BMI and
 348 COS protocol. Table 1 shows characteristics of FF donors used in each group.

349 **Table 1: Clinical variables, response to controlled ovarian stimulation, and ICSI results of infertile donor**
 350 **women with no endometriosis (control), with endometriosis in the early stages (E I / II) and in advanced**
 351 **stages without endometrioma (EIII / IV) and with endometrioma (Eendometrioma)**

	Control (n=8)	E I/II (n=8)	E III/IV (n=8)	E endometrioma (n=8)	
Age (years)	36 (35.5 – 37.3)	34 (33.5 - 37)	33 (29 - 34)	34.5 (33 – 36.3)	p =0.1907
BMI (kg/m ²)	24.6 (23.8 – 27.9)	21.9 (21.8 - 27.4)	24.8 (24.6 – 27.3)	21.8 (20.8 – 25.2)	p =0.3259
FSH (UI/L)	8.2 (7.9 – 9.7)	4.4 (4.4 – 5.3)	5.2 (3.8 – 7.8)	5.6 (4.1 - 8.4)	p= 0.1890
Duration of infertility (months)	114 (93 - 135)*	84 (81 - 84)	108 (66 - 111)	48 (45 - 60)*	*p=0.0275
Time vlpsc and COS (months)	57 (53.8 – 70.5)	23 (32.8 - 75)	68 (10.3 - 79)	34 (30 – 49.5)	p =0.3282
Basal CFA (n)	8.0 (7.5- 8)	7 (7 – 9.5)	9.0 (3.8 - 11)	8.0 (3- 13)	p=0.9533
Endometrium (mm)	3.3 (2.9 – 3.9)	7.3 (2.9 – 5.5)	4.6 (3.2 – 6.9)	4.5 (3.4 – 5.2)	p=0.6850
COS duration (dias)	8 (8 – 9.3)	9 (9 – 10.5)	10 (9 - 10)	10 (9.5 – 11.3)	p=0.2115
Recovery oocytes (n)	3 (2 - 4)	4 (3.8 – 5.5)	4 (3.5 - 8)	2 (1 – 4.3)	p =0.1873
Mature oocytes (n)	3 (2 – 3.3)	4 (3.8 – 5.5)	4 (3.5 – 7.5)	2 (1 – 4.3)	p =0.2084

Note: The variables are reported as median and interquartile ranges. BMI: body mass index; FSH: follicle stimulating hormone; CFA: count of antral follicles; COS: controlled ovarian stimulation; vlpsc: videolaparoscopy. Compared groups by Kruskal Wallis test with Dunn post test (p <0.05).

352

353 *In vitro* maturation and confocal microscopy

354 During the 8 IVM experiments performed between November 2017 and
355 January 2018, a total of 1686 immature COCs were submitted to IVM. After IVM,
356 *cumulus* cells were removed, a total of 1561 oocytes were fixed for
357 immunofluorescence and 1401 oocytes were visualized by confocal microscopy (167
358 oocytes were in MI, 25 in TI, 1188 in MII and 21 were parthenogenetically activated).
359 Of the 1188 oocytes in MII, 735 were considered analyzable (ie, viewed in a sagittal
360 or lateral position) and 453 were considered non-analyzing (polar view).

361 There were no differences in the TI ($p = 0.05467$), AP ($p = 0.8854$) and
362 analyzable MI ($p = 0.5651$) among the nine experimental groups (Table 2).

363 About MI rate, No-FF group (6.0%) had similar rate to FFC (6.1%, $p = 1$),
364 FFC+LC+n3 (11.7%, $p=0.1277$), FFEI/II (12.7%, $p=0.07406$), FFEI/II+LC+n3 (9.8%,
365 $p=0.3085$), FFEIII/IV+LC+n3 (7.7%, $p=0.3085$), and FFEEndometrioma+LC+n3
366 (11.1%, $p=0.166$). The MI rate was lower in the No-FF and FFC groups when
367 compared to the FFEIII/IV (16.9%; vs No-FF: $p=0.00504$; vs FFC: $p = 0.00537$) and
368 FFEEndometrioma (24.7%, vs No-FF: $p<0.0001$, vs. FFC: $p<0.0001$). The addition of
369 LC and omega-3 did not alter the MI rate in the FFC (6.1% vs 11.7%, $p=0.192$) and
370 FFEI/II (12.7% vs 9.8%, $p=0.5288$). However, the FFEIII/IV+LC+n3 group presented
371 a lower MI rate than FFEIII/IV (7.7% vs 16.9%, $p=0.0259$), as well as
372 FFEEndometrioma+LC+n3 and FFEEndometrioma (11,1% vs 24.7%, $p=0.0028$).

373 The MII rate was 91.9% in the No-FF group, being similar to FFC group
374 (89.2%, $p=0.5389$), FFC+LC+n3 (84.7%, $p=0.06992$), FFEI/II (85.4%, $p=0.1069$),
375 FFEI/II+LC+n3 (85.3%, $p=0.09598$), FFEIII/IV+LC+n3 (90.8%, $p=0.1069$) and
376 FFEEndometrioma+LC+n3 (86.4%, $p = 0.1681$). The lowest MII rate was found in the
377 FFEEndometrioma group (69.3%), which differed from the other 8 groups (vs No-FF:
378 $p<0.0001$; vs FFC: $p<0.0001$; vs FFC+LC+n3: $p=0.00194$, vs FFEI/II: $p=0.00114$, vs

379 FFEI/II+LC+n3: $p=0.00117$, vs FFEIII/IV: $p=0.02681$, vs FFEIII/IV+LC+n3: $p<0.0001$;
 380 vs FFEndometrioma+LC+n3: $p=0.00044$). The No-FF group had a higher rate of MII
 381 compared to the FFEIII/IV group (80.7%, $p=0.00681$). The FFC group (89.2%)
 382 presented MII rate similar to the FFC+LC+n3 group (89.2%, $p=0.3122$), as well as
 383 the FFEI/II+LC+n3 group (85.3%) was similar to the FFEI/II group (85.4%, $p = 1$).
 384 However, the addition of LC and omega-3 in the FFEIII/IV and FFEndometrioma
 385 groups increased the rate of MII [(FFEIII/IV vs. FFEIII/IV+LC+n3: $p=0.0190$) and
 386 (FFEndometrioma vs FFEndometrioma+LC+n3: $p=0.0004$)].

387 The percentage of meiotic normal MII was 87.2% in the No-FF group, being
 388 similar to the FFC (87.2%, $p=1$), FFC+LC+n3 (82.5%, $p=0.54$), FFEI/II+LC+n3
 389 (84.5%, $p = 0.7615$), FFEIII/IV+LC+n3 (84.1%, $p=0.7122$) and
 390 FFEndometrioma+LC+n3 (75.3%, $p=0.0623$). The percentage of normal MII in the
 391 No-FF group was significantly higher than FFEI/II (62.2%, $p=0.00023$), FFEIII/IV
 392 (70.2%, $p=0.0092$) and FFEndometrioma (72.7%, $p=0.03497$). The percentage of
 393 normal MII in the FFC was also significantly higher than FFEI/II ($p=0.00059$),
 394 FFEIII/IV ($p=0.01523$) and FFEndometrioma groups ($p=0.0486$). The addition of LC
 395 and omega-3 fatty acids during IVM did not alter the rate of normal MII in the FFC
 396 group ($p=0.5792$) and FFEndometrioma ($p=0.865$), but LC+n3 increased the rate in
 397 the FFEI/II ($p=0.00205$) and FFEIII/IV ($p=0.04995$). Although the FFEndometrioma
 398 (72.7%) and FFEndometrioma+LC+n3 (75.3%) groups had similar percentage of
 399 normal MII ($p=0.865$), the FFEndometrioma+LC+n3 group had similar normal MII
 400 percentage to the No-FF ($p = 0.062$) and FFC ($p = 0.083$).

Table 2: Stages of nuclear maturation, and percentage of normal MII oocytes matured *in vitro* in medium without follicular fluid (no-FF), with addition of 1% FF from infertile patients without endometriosis (FFC), with early endometriosis (FFEI/II), with advanced endometriosis without (FFEIII/IV) or with endometrioma (FFEendometrioma), supplemented with 0.6mg/mL L-Carnitine, 0.4nM docosahexaenoic acid, and 0.6 nM eicosapentaenoic acid (LC+n3) visualized by confocal microscopy.

	Fixed oocytes after IVM n	Viewed by confocal n	MI n (%)	TI n (%)	PA n (%)	MII		
						Total MII n (%)	Analyzable n (%)	Normal n (%)
No-FF	167	149	9(6.0%)a	2 (1.3%)	1 (0.7%)	137 (91.9%)a	94 (68.6%)	82 (87.2%)a
FFC	163	148	9 (6.1%)a	5 (3.4%)	2 (1.4%)	132 (89.2%)ab	78 (59.1%)	68 (87.2%)a
FF+LC+n3	179	163	19 (11.7%)ab	3 (1.8%)	3 (1.8%)	138 (89.2%)ab	80 (58.0%)	66 (82.5%)ab
FFEI/II	178	158	20 (12.7%)ab	1 (0.6%)	2 (1.3%)	135 (85.4%)ab	82 (60.7%)	51 (62.2%)c
FFEI/II +LC+n3	186	163	16 (9.8%)ab	4 (2.5%)	4 (2.5%)	139 (85.3%)ab	84 (60.4%)	71 (84.5%)ad
FFEIII/IV	185	166	28 (16.9%)bc	2 (1.2%)	2 (1.2%)	134 (80.7%)b	84 (62.7%)	59 (70.2%)bc
FFEIII/IV +LC+n3	163	142	11 (7.7%)a	1 (0.7%)	1 (0.7%)	129 (90.8%)a	82 (63.6%)	69 (84.1%)ad
FFEendometrioma	163	150	37 (24.7%)c	7 (4.7%)	2 (1.3%)	104 (69.3%)c	66 (63.5%)	48 (72.7%)bcd
FFEendometrioma +LC+n3	177	162	18 (11.1%)ab	0 (0%)	4 (2.5%)	140 (86.4%)ab	85 (60.7%)	64 (75.3%)abc

Note: IVM: *in vitro* maturation; MI=metaphase I; TI=telophase I; MII=metaphase II; PA=parthenogenetic activation. Analyzable: oocytes with spindles fixed in lateral or sagittal view. Data are results of 8 replicates using follicular fluid from control patients, with mild endometriosis, with severe endometriosis without endometrioma and with endometrioma. Different letters in the same column indicate statistical difference, $p < 0.05$, using chi-square test.

401 Discussion

402 Despite the close relationship between endometriosis and infertility, the
403 etiopathogenic mechanisms involved in the reduction of the natural fertility of these
404 women remain unknown. In this study, we demonstrated that the FF of infertile
405 women with endometriosis when added to the IVM medium of bovine oocytes causes
406 a decrease in oocyte quality (assessed in this study by nuclear maturation blocking
407 and impairment of spindle organization and oocyte chromosomes in MII) when
408 compared FF of infertile women without the disease. The presence of endometrioma
409 in the EOC cycle has an even more detrimental impact on oocyte quality, mainly
410 affecting nuclear maturation. The addition of LC and omega-3 fatty acids (DHA and
411 EPA) prevented such damage, highlighting the role of EO and β -oxidation alterations
412 in worsening oocyte quality in early and advanced endometriosis women (with and
413 without without endometrioma).

414 Regardless of the stage, our findings, using bovine experimental model, show
415 that endometriosis affects oocyte quality by reducing the percentage of oocytes in MII
416 with normal spindle and aligned chromosomes compared to the no-FF and FF control
417 groups. The meiotic spindle of oocytes is a dynamic structure, which aligns and
418 secretes the chromosomes during meiosis, formed by the polymerization of α and β
419 subunits of the tubulin protein associated with more than 100 other proteins
420 (Wittmann, et al., 2001). Several factors may alter the spindle, with EO being one of
421 them (Sharma, et al., 2013). Excess free radicals can directly damage spindle
422 proteins (and other cellular macromolecules, such as DNA) (Salvi, et al., 2001) and
423 may also alter the membrane potential of the mitochondria, leading to a decrease in
424 ATP production and consequent destruction of the meiotic spindle (Zhang, et al.,
425 2006).

426 Our findings corroborate previous findings from our group, demonstrating that
427 addition of 1% FF from infertile women with endometriosis in early stages to the IVM
428 medium of bovine oocytes impairs the meiotic spindle arrangement and the
429 chromosomal alignment of oocytes in MII (Da Broi, Malvezzi, Paz, Ferriani and
430 Navarro, 2014, Giorgi, Da Broi, Paz, Ferriani and Navarro, 2016). For the first time,
431 we showed that FF of infertile women with advanced endometriosis (with and without
432 endometrioma) also compromised the meiotic normality of bovine oocytes submitted
433 to IVM in the presence of these FF at the concentration of 1%.

434 However, Hamdan et al. (2016), using murine model, did not observe meiotic
435 spindle alteration and chromosomal alignment when oocytes were matured with FF
436 from women with severe endometriosis; disagreeing with our results. In the study by
437 Hamdan et al. (2016), FF donors were previously submitted to videolaparoscopy for
438 diagnosis, treatment and staging of endometriosis according to the ASRM criteria.
439 However, there was no mention of the presence of infertility and endometrioma as
440 criteria for inclusion / exclusion. Other differences between the present study and the
441 work of Hamdan and collaborators (2016) are: incubation time and FF concentration
442 used (Hamdan and coworkers incubated the oocytes at a concentration of 15-50%
443 FF for 18h). Thus, we hypothesize that the disagreement of results between our
444 study and the study by Hamdan and collaborators (2016) regarding the organization
445 of the meiotic spindle is mainly due to the experimental model used. Morphologically
446 and physiologically, oocytes of different species present differences, even if subtle
447 (Santos, Schoevers and Roelen, 2014); however, a review evaluating the oocyte
448 characteristics of bovine, murine, swine and humans, suggested that for studies
449 evaluating reproductive toxicology if it would be exposure to an EO environment)

450 bovine and swine models would be more adequate than the murine model to
451 represent human oocytes(Santos, Schoevers and Roelen, 2014).

452 Despite this, Hamdan et al. (2016) evaluated chromosomal alterations by
453 another methodology, phosphorylation of histone H2AX (marker of DNA damage
454 and, therefore, to the chromosome), and reported a greater amount of histone H2AX
455 phosphorylation foci in incubated oocytes with FF of severe endometriosis compared
456 to the no-FF and FF control groups, indicating the involvement of the oocyte
457 chromosomes of women with severe endometriosis, at least in part confirming our
458 findings (Hamdan, et al., 2016).

459 The nuclear maturation rate was also evaluated in the study by Hamdan et al.
460 (2016), who observed that the FF of women without endometriosis did not affect the
461 oocyte maturation rate compared to the group without FF (Hamdan, Jones, Cheong
462 and Lane, 2016). However, the FF of women with severe endometriosis (both the
463 addition of 15% and 50%), impaired the *in vitro* oocyte maturation rate (Hamdan,
464 Jones, Cheong and Lane, 2016). The authors of this study suggest that the decrease
465 in PB extrusion rate in the group incubated with FF from endometriosis women
466 should be the result of DNA damage caused by OS (Hamdan, Jones, Cheong and
467 Lane, 2016). A study of our group showed that the FF of infertile women with
468 endometriosis presents an increase in the levels of 8OHdG (marker of oxidative DNA
469 damage) compared to infertile women without the disease (Da Broi, et al., 2016).
470 Thus, Hamdan and collaborators (2016) corroborate our findings that the FF of
471 infertile women with advanced endometriosis (with and without endometrioma)
472 compromises oocyte nuclear maturation (higher MI rate and lower MIII rate) when
473 compared to FF of infertile women without endometriosis and with endometriosis in
474 the early stages.

475 We have shown that the addition of FF from infertile women with
476 endometrioma in the cycle decreases the nuclear maturation rate (represented by the
477 higher MI rate and lower MII rate) when compared to the other groups, including that
478 containing FF from women with endometriosis III/IV without endometrioma.
479 Endometrioma is a type of endometriosis lesion in the ovary forming a "pseudocyst"
480 containing in it a "chocolate" coloring fluid formed by cellular debris of endometriosis
481 and blood (Brosens, et al., 2013). The content present inside the endometrioma is
482 characterized by an accumulation of iron and its derivatives, making the environment
483 toxic and hostile to folliculogenesis (Sanchez, et al., 2014). Analysis of FF by mass
484 spectrometry identified 535 expressed proteins, being 139 common to groups of FF
485 from endometrioma, ovary without endometrioma and control (Regiani, et al., 2015).
486 Enrichment analysis was performed from the ovary composition with endometrioma
487 and ovary without endometrioma (Regiani, Cordeiro, da Costa, Salgueiro, Cardozo,
488 Carvalho, Perkel, Zylbersztein, Cedenho and Lo Turco, 2015). Both groups
489 presented proteins with similar roles, demonstrating the impact of endometriosis (or
490 presence of an active endometrioma in the cycle, regardless of the follicular
491 proximity) on the FF composition (Regiani, Cordeiro, da Costa, Salgueiro, Cardozo,
492 Carvalho, Perkel, Zylbersztein, Cedenho and Lo Turco, 2015).

493 LC and omega-3 fatty acids prevented meiotic oocyte damage mediated by FF
494 from women with endometriosis regardless of disease stage and presence of
495 endometrioma. A previous study of our group showed that the addition of LC
496 prevented damage to the meiotic spindle of bovine oocytes matured *in vitro* in the
497 presence of FF from women with mild endometriosis (normal MII rate increased from
498 51.35% to 80.61% with LC) (Giorgi, Da Broi, Paz, Ferriani and Navarro, 2016).
499 However, for the first time, we have shown that the combined addition of LC and

500 omega-3 fatty acids prevents oocyte damage (both at nuclear maturation and
501 chromosome alignment and meiotic spindle assembly in MII oocytes).

502 Recent review highlighted the important role of carnitine in female fertility by
503 discussing *in vivo* and *in vitro* studies involving humans or animal models, and the
504 possible mechanisms of LC action in improving female fertility (Agarwal, et al., 2018).
505 And experimental studies show that supplementation with omega-3 improves oocyte
506 quality (Nehra, et al., 2012), regulates the endometrium (Waters, et al., 2014) and
507 increases the pregnancy rate (Wathes, Abayasekara and Aitken, 2007).

508 LC is an antioxidant and reduces OS and lipotoxicity by eliminating free
509 radicals and excess of palmitate from the endoplasmic reticulum; and by decreasing
510 rates of apoptosis promoting oocyte growth and development (Agarwal, Sengupta
511 and Durairajanayagam, 2018). OS is a factor involved in worsening oocyte quality in
512 women with endometriosis, and murine oocytes incubated with FF from women with
513 severe endometriosis present higher ROS levels compared to oocytes incubated
514 without FF and with FF control (Hamdan, Jones, Cheong and Lane, 2016).

515 LC and fatty acids are involved in β -oxidation which is an important pathway of
516 energy production during oocyte maturation and early embryonic development
517 (Downs, Mosey and Klinger, 2009, Dunning, et al., 2014, Dunning, et al., 2010,
518 Dunning and Robker, 2012, Dunning, Russell and Robker, 2014, Paczkowski, Silva,
519 Schoolcraft and Krisher, 2013, Valsangkar and Downs, 2013). Oocytes from infertile
520 women with minimal or mild endometriosis present mitochondrial alterations
521 evaluated by transmission electron microscopy and by quantitative polymerase chain
522 reaction (RT-PCR) (Xu et al., 2015). And, although we did not investigate the oocyte
523 mitochondria in this study, we suggest that FF from women with endometriosis,
524 should alter mitochondrial function, contributing to worsening oocyte quality.

525 Evaluating the clinical data of the FF donor groups (FFC, FFEI/II, FFEIII/IV
526 and FFEendometrioma), we observed a difference in the duration of infertility
527 between the FFC and FFEendometrioma groups. We believe that this difference is
528 not important in this study, since the median age (this one, a factor related to
529 worsening oocyte quality) between the groups did not differ.

530 Our study has brought unprecedented contributions to the elucidation of the
531 etiopathogenesis of infertility related to endometriosis. However, we do have some
532 limitations. I-) We used FF of women submitted to COS, making the extrapolation of
533 the results to natural cycles questionable; however, the control group was also
534 submitted to similar pituitary block protocols. II-) We use only FF from the first
535 aspirated follicle of each patient, since we do not know if the prolongation of
536 anesthesia and repeated ovarian punctures would promote follicular OS; however,
537 we cannot say that FF from different follicles would have the same impact during IVM
538 on the oocyte. III-) In addition, data obtained from animal model studies may not
539 necessarily be extrapolated to humans and studies with oocytes from infertile women
540 with endometriosis *in vivo* matured would be important to confirm our results.

541 Therefore, FF from infertile women with endometriosis damages meiotic
542 spindle assembly and chromosome alignment of MII bovine oocytes, and FF from
543 advanced endometriosis besides damaging the meiotic spindle, also impairs nuclear
544 maturation. Also, FF from women with endometrioma compromise even more nuclear
545 maturation. Supplementation with LC and omega-3 fatty acids prevented all these
546 bovine oocyte damages.

547 Currently available treatments for infertility related to endometriosis are
548 surgical and/or ART (Kennedy, Bergqvist, Chapron, D'Hooghe, Dunselman, Greb,
549 Hummelshoj, Prentice, Saridogan and Group, 2005) that are invasive and/or costly,

550 with consequent low population access. Therefore, new therapeutic approaches
 551 would be essential to help thousands of women affected by this disease. Due to the
 552 properties of LC and omega-3 fatty acids, the combination of surgical treatment with
 553 the supplementation of these substances could prevent the recurrence and/or
 554 progression of endometriosis (due to the antioxidant action of LC and anti-
 555 inflammatory of omega-3 fatty acids) and improve natural fertility (by preventing OS,
 556 impaired beta oxidation and oocyte damage) since ART is not accessible to all
 557 women. Our findings stimulate the design of clinical studies investigating the impact
 558 of joint supplementation of LC and omega-3 fatty acids on improving the natural
 559 fertility of infertile women with endometriosis.

560

561 **References**

- 562 Adona PR, Lima Verde Leal C. Meiotic inhibition with different cyclin-dependent kinase inhibitors in
 563 bovine oocytes and its effects on maturation and embryo development. *Zygote* 2004;12: 197-204.
 564 Agarwal A, Sengupta P, Durairajanayagam D. Role of L-carnitine in female infertility. *Reprod Biol*
 565 *Endocrinol* 2018;16: 5.
 566 ASRM. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996.
 567 *Fertil Steril* 1997;67: 817-821.
 568 Barcelos ID, Vieira RC, Ferreira EM, Martins WP, Ferriani RA, Navarro PA. Comparative analysis of the
 569 spindle and chromosome configurations of in vitro-matured oocytes from patients with
 570 endometriosis and from control subjects: a pilot study. *Fertil Steril* 2009;92: 1749-1752.
 571 Brosens I, Puttemans P, Gordts S, Campo R, Benagiano G. Early stage management of ovarian
 572 endometrioma to prevent infertility. *Facts Views Vis Obgyn* 2013;5: 309-314.
 573 Bérubé S, Marcoux S, Langevin M, Maheux R. Fecundity of infertile women with minimal or mild
 574 endometriosis and women with unexplained infertility. The Canadian Collaborative Group on
 575 Endometriosis. *Fertil Steril* 1998;69: 1034-1041.
 576 Da Broi MG, de Albuquerque FO, de Andrade AZ, Cardoso RL, Jordão Junior AA, Navarro PA.
 577 Increased concentration of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in follicular fluid of infertile women with
 578 endometriosis. *Cell Tissue Res* 2016.
 579 Da Broi MG, Giorgi VSI, Wang F, Keefe DL, Albertini D, Navarro PA. Influence of follicular fluid and
 580 cumulus cells on oocyte quality: clinical implications. *J Assist Reprod Genet* 2018;35: 735-751.
 581 Da Broi MG, Malvezzi H, Paz CC, Ferriani RA, Navarro PA. Follicular fluid from infertile women with
 582 mild endometriosis may compromise the meiotic spindles of bovine metaphase II oocytes. *Hum*
 583 *Reprod* 2014;29: 315-323.
 584 de Ziegler D, Borghese B, Chapron C. Endometriosis and infertility: pathophysiology and
 585 management. *Lancet* 2010;376: 730-738.
 586 Díaz I, Díaz I, Navarro J, Blasco L, Simón C, Pellicer A, Remohí J. Impact of stage iii-iv endometriosis on
 587 recipients of sibling oocytes: matched case-control study. *Fertility and Sterility* 2000;74: 31-34.

- 588 Downs SM, Mosey JL, Klinger J. Fatty acid oxidation and meiotic resumption in mouse oocytes. *Mol*
589 *Reprod Dev* 2009;76: 844-853.
- 590 Dunning KR, Anastasi MR, Zhang VJ, Russell DL, Robker RL. Regulation of fatty acid oxidation in
591 mouse cumulus-oocyte complexes during maturation and modulation by PPAR agonists. *PLoS One*
592 2014;9: e87327.
- 593 Dunning KR, Cashman K, Russell DL, Thompson JG, Norman RJ, Robker RL. Beta-oxidation is essential
594 for mouse oocyte developmental competence and early embryo development. *Biol Reprod* 2010;83:
595 909-918.
- 596 Dunning KR, Robker RL. Promoting lipid utilization with l-carnitine to improve oocyte quality. *Anim*
597 *Reprod Sci* 2012;134: 69-75.
- 598 Dunning KR, Russell DL, Robker RL. Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty
599 acids and β -oxidation. *Reproduction* 2014;148: R15-27.
- 600 Evans AM, Fornasini G. Pharmacokinetics of L-carnitine. *Clin Pharmacokinet* 2003;42: 941-967.
- 601 Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Ferriani RA, Navarro PA. Prematuration of bovine oocytes with
602 butyrolactone I reversibly arrests meiosis without increasing meiotic abnormalities after in vitro
603 maturation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009;145: 76-80.
- 604 Giorgi VS, Da Broi MG, Paz CC, Ferriani RA, Navarro PA. N-Acetyl-Cysteine and l-Carnitine Prevent
605 Meiotic Oocyte Damage Induced by Follicular Fluid From Infertile Women With Mild Endometriosis.
606 *Reprod Sci* 2016;23: 342-351.
- 607 Haghiaç M, Yang XH, Presley L, Smith S, Dettelback S, Minium J, Belury MA, Catalano PM, Hauguel-de
608 Mouzon S. Dietary Omega-3 Fatty Acid Supplementation Reduces Inflammation in Obese Pregnant
609 Women: A Randomized Double-Blind Controlled Clinical Trial. *PLoS One* 2015;10: e0137309.
- 610 Hamdan M, Jones KT, Cheong Y, Lane SI. The sensitivity of the DNA damage checkpoint prevents
611 oocyte maturation in endometriosis. *Sci Rep* 2016;6: 36994.
- 612 Hashimoto S, Minami N, Takakura R, Imai H. Bovine immature oocytes acquire developmental
613 competence during meiotic arrest in vitro. *Biol Reprod* 2002;66: 1696-1701.
- 614 Ju JC, Jiang S, Tseng JK, Parks JE, Yang X. Heat shock reduces developmental competence and alters
615 spindle configuration of bovine oocytes. *Theriogenology* 2005;64: 1677-1689.
- 616 Kennedy S, Bergqvist A, Chapron C, D'Hooghe T, Dunselman G, Greb R, Hummelshoj L, Prentice A,
617 Saridogan E, Group ESIGfEaEGD. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis.
618 *Hum Reprod* 2005;20: 2698-2704.
- 619 Liu L, Ju JC, Yang X. Differential inactivation of maturation-promoting factor and mitogen-activated
620 protein kinase following parthenogenetic activation of bovine oocytes. *Biol Reprod* 1998;59: 537-545.
- 621 Malhi PS, Adams GP, Singh J. Bovine model for the study of reproductive aging in women: follicular,
622 luteal, and endocrine characteristics. *Biol Reprod* 2005;73: 45-53.
- 623 Mansour G, Abdelrazik H, Sharma RK, Radwan E, Falcone T, Agarwal A. L-carnitine supplementation
624 reduces oocyte cytoskeleton damage and embryo apoptosis induced by incubation in peritoneal fluid
625 from patients with endometriosis. *Fertil Steril* 2009;91: 2079-2086.
- 626 Mansour G, Sharma RK, Agarwal A, Falcone T. Endometriosis-induced alterations in mouse
627 metaphase II oocyte microtubules and chromosomal alignment: a possible cause of infertility. *Fertil*
628 *Steril* 2010;94: 1894-1899.
- 629 Missmer SA, Hankinson SE, Spiegelman D, Barbieri RL, Marshall LM, Hunter DJ. Incidence of
630 laparoscopically confirmed endometriosis by demographic, anthropometric, and lifestyle factors. *Am*
631 *J Epidemiol* 2004;160: 784-796.
- 632 Nadjarzadeh A, Dehghani-Firouzabadi R, Daneshbodi H, Lotfi MH, Vaziri N, Mozaffari-Khosravi H.
633 Effect of Omega-3 Supplementation on Visfatin, Adiponectin, and Anthropometric Indices in Women
634 with Polycystic Ovarian Syndrome. *J Reprod Infertil* 2015;16: 212-220.
- 635 Nehra D, Le HD, Fallon EM, Carlson SJ, Woods D, White YA, Pan AH, Guo L, Rodig SJ, Tilly JL *et al.*
636 Prolonging the female reproductive lifespan and improving egg quality with dietary omega-3 fatty
637 acids. *Aging Cell* 2012;11: 1046-1054.
- 638 Nikoloff N, Pascua AM, Anchordoquy JM, Anchordoquy JP, Sirini MA, Seoane A, Furnus CC. Effect of
639 eicosapentaenoic acid on bovine cumulus-oocyte complex in vitro. *Cell Biol Int* 2017;41: 505-513.

- 640 Oseikria M, Elis S, Maillard V, Corbin E, Uzbekova S. N-3 polyunsaturated fatty acid DHA during IVM
641 affected oocyte developmental competence in cattle. *Theriogenology* 2016;85: 1625-1634.e1622.
- 642 Paczkowski M, Silva E, Schoolcraft WB, Krisher RL. Comparative importance of fatty acid beta-
643 oxidation to nuclear maturation, gene expression, and glucose metabolism in mouse, bovine, and
644 porcine cumulus oocyte complexes. *Biol Reprod* 2013;88: 111.
- 645 Parazzini F. Ablation of lesions or no treatment in minimal-mild endometriosis in infertile women: a
646 randomized trial. Gruppo Italiano per lo Studio dell'Endometriosi. *Hum Reprod* 1999;14: 1332-1334.
- 647 Pellicer A, Navarro J, Bosch E, Garrido N, Garcia-Velasco JA, Remohí J, Simón C. Endometrial quality in
648 infertile women with endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2001;943: 122-130.
- 649 Rahbar N, Asgharzadeh N, Ghorbani R. Effect of omega-3 fatty acids on intensity of primary
650 dysmenorrhea. *Int J Gynaecol Obstet* 2012;117: 45-47.
- 651 Regiani T, Cordeiro FB, da Costa LoV, Salgueiro J, Cardozo K, Carvalho VM, Perkel KJ, Zylbersztejn DS,
652 Cedenho AP, Lo Turco EG. Follicular fluid alterations in endometriosis: label-free proteomics by MS(E)
653 as a functional tool for endometriosis. *Syst Biol Reprod Med* 2015;61: 263-276.
- 654 Salvi A, Carrupt P, Tillement J, Testa B. Structural damage to proteins caused by free radicals:
655 assessment, protection by antioxidants, and influence of protein binding. *Biochem Pharmacol*
656 2001;61: 1237-1242.
- 657 Sanchez AM, Viganò P, Somigliana E, Panina-Bordignon P, Vercellini P, Candiani M. The distinguishing
658 cellular and molecular features of the endometriotic ovarian cyst: from pathophysiology to the
659 potential endometrioma-mediated damage to the ovary. *Hum Reprod Update* 2014;20: 217-230.
- 660 Santos RR, Schoevers EJ, Roelen BA. Usefulness of bovine and porcine IVM/IVF models for
661 reproductive toxicology. *Reprod Biol Endocrinol* 2014;12: 117.
- 662 Sharma RK, Azeem A, Agarwal A. Spindle and chromosomal alterations in metaphase II oocytes.
663 *Reprod Sci* 2013;20: 1293-1301.
- 664 Simón C, Gutiérrez A, Vidal A, de los Santos MJ, Tarín JJ, Remohí J, Pellicer A. Outcome of patients
665 with endometriosis in assisted reproduction: results from in-vitro fertilization and oocyte donation.
666 *Hum Reprod* 1994;9: 725-729.
- 667 Simón C, Gutiérrez A, Vidal A, de los Santos MJ, Tarín JJ, Remohí J, Pellicer A. Outcome of patients
668 with endometriosis in assisted reproduction: results from in-vitro fertilization and oocyte donation.
669 *Human Reproduction* 1994;9: 725-729.
- 670 Valsangkar D, Downs SM. A requirement for fatty acid oxidation in the hormone-induced meiotic
671 maturation of mouse oocytes. *Biol Reprod* 2013;89: 43.
- 672 Waters SM, Coyne GS, Kenny DA, Morris DG. Effect of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on
673 transcription factor regulation in the bovine endometrium. *Mol Biol Rep* 2014;41: 2745-2755.
- 674 Wathes DC, Abayasekara DR, Aitken RJ. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction.
675 *Biol Reprod* 2007;77: 190-201.
- 676 Wittmann T, Hyman A, Desai A. The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors. *Nat*
677 *Cell Biol* 2001;3: E28-34.
- 678 Zhang X, Wu XQ, Lu S, Guo YL, Ma X. Deficit of mitochondria-derived ATP during oxidative stress
679 impairs mouse MII oocyte spindles. *Cell Res* 2006;16: 841-850.