

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**O fluido folicular de mulheres inférteis com endometriose leve
pode comprometer o fuso meiótico de oócitos em metáfase II**

Michele Gomes Da Broi

RIBEIRÃO PRETO

2011

Michele Gomes Da Broi

**O fluido folicular de mulheres inférteis com endometriose leve pode
comprometer o fuso meiótico de oócitos em metáfase II**

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

Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia

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

RIBEIRÃO PRETO

2011

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Da Broi, Michele Gomes.

O fluido folicular de mulheres inférteis com endometriose leve pode comprometer o fuso meiótico de oócitos em metáfase II/Michele Gomes Da Broi; Ribeirão Preto, 2011.

102 p. il: 30cm.

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

Orientadora: Navarro, Paula Andrea de Albuquerque Salles.

1. Endometriose leve. 2. Infertilidade feminina. 3. Maturação *in vitro*. 4. Fluido folicular. 5. Fuso meiótico. 6. Qualidade oocitária.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Michele Gomes Da Broi

O fluido folicular de mulheres inférteis com endometriose leve pode comprometer o fuso meiótico de oócitos em metáfase II

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

Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia

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

Banca examinadora:

Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos de Pirassununga – USP

Assinatura _____

Prof. Dr. Rui Alberto Ferriani

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

Assinatura _____

Profa. Dra. Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

Assinatura _____

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Gildo e Maria do Carmo, as pessoas mais importantes da minha vida, eternamente merecedores de meu respeito e admiração, a quem devo tudo que sou e que conquistei. Esta vitória é para vocês.

Às minhas irmãs, Eveline e Laura, exemplos de determinação, superação e garra.

À minha orientadora, Paula, um anjo que surgiu no meu caminho.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, por iluminar meus caminhos e apontar a direção certa. Pela proteção, pelo amparo e pela força sempre concedidos.

À minha família linda, meu porto seguro. Obrigada pelo amor inesgotável, pelo apoio incondicional, pelo incentivo nas dificuldades, fundamentais para que eu chegasse até aqui. Amo vocês!

Às minhas irmãs Eveline e Laura, que me ensinaram que, por mais árduo que seja o caminho, um sonho é sempre passível de realização.

Eve, eu sei que tu me amas e torces por mim!

Laurinha, obrigada pelas conversas, gargalhadas, conselhos, pelo apoio, pela cumplicidade, essenciais para que eu superasse toda e qualquer adversidade.

Serás, para sempre, meu bebê!

Em especial, aos meus pais, Gildo e Maria do Carmo, pessoas maravilhosas, exemplos de vida que, certamente, são também responsáveis por esta conquista.

Sempre me encorajando a superar desafios, a acreditar em mim, amparando nos momentos difíceis, comemorando cada conquista, sonhando junto comigo.

Obrigada pela dedicação e confiança. Vocês são minha maior inspiração!

Ao meu dindo amado, José Pedro, grande incentivador, a quem agradeço por toda a ajuda e dedicação sempre a mim prestadas.

À minha querida e exemplar orientadora, Profa. Dra. Paula Navarro, por ter me proporcionado tamanho crescimento pessoal, intelectual, científico e profissional. Obrigada pela oportunidade, pelo suporte, pela amizade, atenção, confiança e preocupação sempre a mim dedicadas. Terás sempre minha admiração e carinho!

A meus colegas de pós-graduação, Alessandra, Camila, Carolina, Caroline, Daiana, Daiane, Daniel, Elisa, Fernanda, Franciele, Gabriela, Helena, Jacira, Jhenifer, Juliana, Lucia, Luciana Dib, Luciana R., Marcelo, Mary e Tânia pelo acolhimento, companheirismo e colaboração nesta jornada. Por fazerem parte do melhor momento da minha vida, seja conversando nos corredores do laboratório, ajudando diretamente nos meus experimentos, dividindo problemas, compartilhando risadas. Cada um de vocês tem um lugar guardado no meu coração.

Em especial, às minhas amigas Carolina, Daiane e Helena, sem as quais esta etapa não teria sido tão especial. Obrigada pelo colo nos momentos difíceis e por me fazerem sorrir todos os dias desta longa jornada. Levo comigo as lembranças dos momentos que passamos juntas e a certeza de que nossa

*amizade não foi um acaso. Juntas, fizemos desse período um dos melhores de
nossas vidas!*

*À Helena Malvezzi, amiga e companheira de projeto, minha filhota-mãe,
verdadeira, prática e sincera, sempre mostrando outro ponto de vista e trazendo
leveza aos meus dias. Agradeço pela ajuda neste trabalho, pela amizade, pelas
conversas, pelo carinho, pela paciência e por todos os momentos de apoio,
risadas, diversão e cumplicidade.*

*À Daiane Bulgarelli por ser, simplesmente, um exemplo de garra. Por me
acolher, entender, escutar, por me dar ânimo e força, me fazer gargalhar nos
momentos em que nada parecia dar certo, por ter se tornado uma pessoa
imprescindível em minha vida. Obrigada pelos ensinamentos, pela amizade,
sinceridade, atenção e carinho de sempre.*

*À Carolina Campos, vizinha e amiga sempre presente. Agradeço pelo
companheirismo, pela cumplicidade, pelo apoio, pelas gargalhadas estridentes.
Por sempre me ouvir e aconselhar. Por se tornar uma irmã quase gêmea e
dividir tantos momentos felizes.*

*À Jacira Campos, minha primeira amiga aqui, que me acolheu, aconselhou,
ensinou, auxiliou e esteve presente sempre que precisei. Obrigada pela força,
pelas risadas, pela amizade e pelo carinho, fiiia!*

À Jhenifer Rodrigues, amiga e companheira que me recebeu carinhosamente e me orientou nos primeiros passos. Obrigada pela amizade e torcida em todos os momentos.

À doce amiga Lu Dib, pelas boas conversas, pelos conselhos dados, pelos sorrisos, pelas palavras de alento, pelo incentivo e pela paz transmitida.

À Alessandra Vireque, que me acolheu, instruiu, ensinou e acompanhou meu crescimento no laboratório desde o início. Obrigada pela receptividade, dedicação e pelo suporte técnico que possibilitou a realização deste trabalho.

À Elisa Melo Ferreira, pela atenção, prestatividade e pelo treinamento a mim concedidos, fundamentais para a realização dos experimentos.

Às funcionárias do Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia – Setor de Reprodução Humana – HC-FMRP-USP, Camila, Cristina, Cristiana, Débora, Maria Albina, Maria Aparecida, Maria Balbino, Maria Cristina, Maria Auxiliadora, Marilda, Marisa, Océlia, Roberta e Sandra, que, direta ou indiretamente, contribuíram com este projeto. Obrigada pela ajuda, pelas conversas, pelo apoio e acolhimento.

Às secretárias Ilza e Suelen, por estarem me auxiliando desde meu primeiro dia aqui. Agradeço pela receptividade, generosidade, dedicação e amizade, essenciais para a conclusão desta etapa.

À Profa. Dra. Claudia Paro de Paz, pela prestatividade, dedicação e paciência durante o auxílio estatístico.

Ao Laboratório de Microscopia Confocal da FMRP-USP, pela disponibilização do microscópio para leitura das lâminas.

Ao Prof. Dr. Rui Alberto Ferriani, por me proporcionar esta oportunidade, tendo me recebido neste laboratório e acreditado em minha capacidade.

Agradeço pela confiança, pelo apoio e pelo suporte para a realização deste trabalho, assim como, por ter se disponibilizado a participar desta banca examinadora.

Ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, pelo suporte oferecido à realização deste projeto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de Mestrado concedida.

*Ao Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles, pela disponibilidade em participar da
banca examinadora desta dissertação.*

*A todos que torceram por mim e que, direta ou indiretamente, contribuíram
para a realização deste trabalho.*

Epígrafe

*“Se as coisas são inatingíveis
Ora! Não é motivo para não querê-las!
Que tristes os caminhos
Se não fora a presença distante das estrelas”*

Mario Quintana

Resumo

DA BROI, MG. **O fluido folicular de mulheres inférteis com endometriose leve pode comprometer o fuso meiótico de oócitos em metáfase II.** Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Os mecanismos envolvidos na etiopatogênese da infertilidade em pacientes com endometriose não foram totalmente elucidados. A infertilidade apresentada por pacientes com as formas moderada e grave (estádios III e IV, respectivamente) seria, parcialmente, decorrente de alterações anatômicas pélvicas associadas à endometriose. Entretanto, há evidências de que lesões sutis ou implantes endometrióticos em estágios iniciais (estágio mínimo e leve) também poderiam contribuir com a etiopatogênese da infertilidade. Uma pior qualidade oocitária pode estar envolvida nas menores taxas de implantação após fertilização *in vitro* encontradas nessas pacientes. Questionamos a possibilidade de haver alterações no microambiente folicular de pacientes inférteis com endometriose, as quais poderiam afetar a aquisição de competência oocitária e, conseqüentemente, comprometer a fertilidade natural e os resultados dos tratamentos de reprodução assistida em mulheres com esta doença. Sabe-se que, para ser competente e poder ser fertilizado, o oócito precisa estar maduro e ter um fuso morfológicamente funcional, que garanta a fidelidade da segregação cromossômica durante a meiose. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial impacto de diferentes concentrações de fluido folicular (FF) de mulheres inférteis com e sem endometriose leve sobre a integridade do fuso, alinhamento cromossômico e organização dos microfilamentos de actina de oócitos bovinos maturados *in vitro*. Realizou-se um estudo experimental, onde amostras de fluido folicular foram consecutivamente obtidas de 22 pacientes inférteis (11 com endometriose leve e 11 com infertilidade por fator tubário e/ou masculino) submetidas à estimulação ovariana para injeção intracitoplasmática de espermatozóide. Oócitos bovinos imaturos foram submetidos à maturação *in vitro* (MIV) sem adição de fluido folicular (sem fluido) e com 4 concentrações (1%, 5%, 10%, e 15%) de duas amostras de fluido folicular (uma de paciente com endometriose e outra de paciente sem endometriose). Foram realizadas 11 MIVs e cada amostra de fluido folicular foi usada apenas uma vez. Os oócitos foram fixados, marcados por imunofluorescência para visualização morfológica de microtúbulos, cromatina e microfilamentos de actina e, então, analisados por microscopia confocal. A porcentagem de anormalidade de oócitos em MII (fuso normal e cromossomos desalinhados, fuso anormal e cromossomos desalinhados, fuso anormal e cromossomos alinhados) foi significativamente maior naqueles maturados com FF de pacientes com endometriose (1%: 55,56%, 5%: 63,26%, 10%: 54,54%, 15%: 48,84%) quando comparados com oócitos maturados com FF de pacientes controles (1%: 19,15%, 5%: 23,44%, 10%: 25%, 15%: 23,81%) e oócitos maturados sem fluido (23,53%), sem haver diferença entre as concentrações testadas em cada grupo. Pode-se concluir que oócitos bovinos maturados *in vitro* na presença de FF de mulheres inférteis com endometriose leve têm maior frequência de anormalidade meiótica. Estes dados sugerem que o FF de mulheres com endometriose pode comprometer a qualidade oocitária por promover danos ao fuso e/ou cromossomos.

Palavras-chave: endometriose leve; infertilidade feminina; maturação *in vitro*; fluido folicular; fuso meiótico, qualidade oocitária.

Abstract

DA BROI, MG. **Follicular fluid from infertile women with mild endometriosis may compromise the meiotic spindle of metaphase II oocytes.** Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

The mechanisms involved in the etiopathogenesis of infertility in patients with endometriosis have not been fully elucidated. The infertility presented by patients with moderate and severe disease (stages III and IV, respectively) would be partly due to anatomical pelvic changes associated with endometriosis. However, there are evidences that subtle lesions or endometriosis implants in the early stages (stages I and II) might also contribute to the etiopathogenesis of infertility. Impaired oocyte quality may be involved in lower implantation rates after *in vitro* fertilization in these patients. We question if alterations in the follicular microenvironment of infertile patients with endometriosis might affect oocyte competence acquisition and compromise the natural fertility and assisted reproduction treatment outcomes in women with this disease. It is known that to be competent and capable of fertilizing, the oocyte must be mature and have a morphologically functional spindle, which ensure the fidelity of chromosome segregation during meiosis. Thus, the aim of this study was to evaluate the potential impact of different concentrations of follicular fluid (FF) of infertile women with and without mild endometriosis on spindle integrity, chromosomes alignment and actin microfilaments organization of bovine oocytes *in vitro* matured. We performed an experimental study, where FF samples were consecutively obtained from 22 infertile patients (11 with mild endometriosis and 11 with tubal or male factors of infertility) submitted to ovarian stimulation for intracytoplasmic sperm injection. Immature bovine oocytes were submitted to *in vitro* maturation (IVM) without FF and with 4 concentrations (1%, 5%, 10%, and 15%) of 2 samples of FF (1 from a woman with endometriosis and one from a woman without endometriosis). We performed 11 IVM and each FF sample was used only once. The oocytes were then fixed, stained by immunofluorescence for morphological visualization of microtubules, chromatin and actin microfilaments, and then, analyzed by confocal microscopy. The percentage of abnormal MII oocytes was significantly higher for those matured with FF from patients with endometriosis (1%: 55.56%, 5%: 63.26%, 10%: 54.54%, 15%: 48.84%) when compared with oocytes matured with FF from patients without endometriosis (1%: 19.15%, 5%: 23.44%, 10%: 25%, 15%: 23.81%) and those matured without FF (23.53%), with no differences among the tested concentrations in each group. We can conclude that bovine oocytes matured *in vitro* in the presence of FF from infertile women with mild endometriosis have higher frequency of meiotic abnormalities. These data suggest that FF from women with endometriosis may compromise oocyte quality by promoting spindle and/or chromosomal damage.

Key words: mild endometriosis; female infertility; *in vitro* maturation; follicular fluid; meiotic spindle, oocyte quality.

Lista de figuras

- Figura 1.** Esquema de preparo das diluições a fim de manter a suplementação adequada do meio de maturação. pág. 38
- Figura 2.** Microscopia Confocal: oócitos em Metáfase I (normal e normal..... pág. 41
- Figura 3.** Microscopia Confocal: oócitos em Telófase I (normal e normal). pág. 42
- Figura 4.** Microscopia Confocal: oócitos em Metáfase II normais, visão sagital e polar. pág. 43
- Figura 5.** Microscopia Confocal: oócitos em Metáfase II anormais visão sagital..... pág. 44
- Figura 6.** Microscopia Confocal: oócitos em Metáfase II anormais visão sagital e polar.pág. 45
- Figura 7.** Microscopia Confocal: oócitos em Metáfase II anormais visão sagital e polar.pág. 46

Lista de tabelas

Tabela 1 - Estágios de maturação nuclear (metáfase I, telófase I e metáfase II) oocitária nos grupos Sem Fluido, Controle e Endometriose. pág.50

Tabela 2 – Porcentagens de oócitos em metáfase II normais e anormais nos grupos Sem Fluido, Controle e Endometriose. pág.51

Lista de siglas

AI – Anáfase I

ASRM – American Society for Reproductive Medicine

BSA(V) – Albumina sérica bovina fração V

CA – cromossomos alinhados

CD – Cromossomos desalinhados

CG – células da granulosa

COC – Complexo cumulus-oócito

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DTT – Ditioneitol

FACA – Fuso anormal e cromossomos alinhados

FACD – Fuso anormal e cromossomos desalinhados FF – Fluido folicular

FITC – Fluorocromo isotiocianato

FIV – Fertilização *in vitro*

FMRP – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

FNCA – Fuso normal e cromossomos alinhados

FNCD – Fuso normal e cromossomos desalinhados

FP – Fluido peritoneal

FSH – Hormônio folículo estimulante

FSHr – Hormônio folículo estimulante recombinante

GnRHa – Análogo do hormônio liberador de gonadotrofinas

hCG – Gonadotrofina coriônica humana

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

ICSI – Injeção intracitoplasmática de espermatozóide

IL-1 – Interleucina-1

IL-1 β – Interleucina-1 beta

IL-6 – Interleucina-6

IL-10 – Interleucina-10

IMC – Índice de massa corporal

LH – Hormônio luteinizante

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

MHz – Mega hertz

MI – Metáfase I

MII – Metáfase II

MIV – Maturação *in vitro*

MTSB XF – Fixador tampão estabilizador de microtúbulos

NaCl – Cloreto de sódio

NaN₃ – Azida sódica

PBS – Tampão Fosfato- salino

RA – Reprodução assistida

SFB – Soro fetal bovino

TFM – Taxa de fecundidade mensal

TI – Telófase I

TNF- α –Fator de necrose tumoral alfa

TRA – Técnicas de reprodução assistida

UI – Unidade internacional

USP – Universidade de São Paulo

USTV – Ultrassonografia transvaginal

VEGF – Fator de crescimento de endotélio vascular

Sumário

1. Introdução.....	19
Endometriose	20
Endometriose e Infertilidade.....	21
Endometriose e Técnicas de Reprodução Assistida.....	23
Microambiente folicular.....	23
Competência oocitária	25
2. Justificativa	28
3. Objetivos.....	31
Objetivo Geral.....	32
Objetivos Específicos	32
4. Casuística e Métodos	33
Critérios de Inclusão	34
Critérios de exclusão.....	34
Protocolo de Estimulação	35
Coleta e processamento do fluido folicular.....	36
Coleta dos complexos <i>cumulus</i> -oócito de bovinos	36
Maturação <i>in vitro</i>	37
Fixação dos oócitos.....	38
Imunofluorescência.....	39
Avaliação dos oócitos	39
Análise estatística	40
5. Resultados	47
6. Discussão	52
7. Conclusões.....	59
Referências Bibliográficas	61
ANEXOS	66
Anexo 1- Termos de Consentimento Livre e Esclarecido.....	67
Anexo 2- Manuscrito.....	74

1. Introdução

Endometriose

A endometriose é uma doença caracterizada por implante e crescimento de tecido endometrial (glândulas e/ou estroma) fora da cavidade uterina (GUPTA et al., 2006). Embora assintomática em alguns casos, esta doença pode também se manifestar clinicamente, sendo que os diferentes sintomas apresentados variam de intensidade conforme a paciente (BELLELIS et al., 2010). Os implantes endometriais ectópicos podem induzir à ocorrência de reação inflamatória crônica, cicatrizes e adesões (SIGNORILE; BALDI, 2010), distorcendo a anatomia pélvica e promovendo a ocorrência de dor, dismenorréia e dispáurenia, o que tende a afetar o bem-estar físico, psicológico e social dessas mulheres. Além disso, a endometriose é frequentemente associada à infertilidade, sendo que 30 a 50% das suas portadoras são inférteis (BULLETTI et al., 2010).

É importante salientar que a endometriose possui alta prevalência, acometendo de 6 a 10% da população feminina geral (BULLETTI et al., 2010), além de ser uma das maiores causas ginecológicas de admissões hospitalares nos países industrializados. Estima-se que, em todo o mundo, o número de mulheres com endometriose ultrapasse os 70 milhões (BELLELIS et al., 2010). Dessa forma, tanto por seu impacto na saúde física e psicológica das pacientes (BULLETTI et al., 2010), como pelo impacto sócio-econômico diante dos custos de diagnóstico e tratamento, esta doença pode ser considerada um problema atual de saúde pública (SIGNORILE; BALDI, 2010) e merece maior atenção.

A Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (ASRM) classifica a endometriose em 4 estágios, conforme a severidade da doença. A presença de focos endometrióticos isolados e ausência de aderências significativas caracterizam o estágio I ou endometriose mínima, sendo esta a sua forma mais branda. Lesões ectópicas superficiais, com menos de 5 cm e ausência de aderências significativas são características do estágio II ou endometriose leve, não havendo alterações anatômicas da pelve. Presença de múltiplos implantes

endometrióticos, com aderências peritubárias e periovarianas evidentes são características do estágio III ou endometriose moderada. Já a presença de múltiplos implantes superficiais e profundos, incluindo endometriomas, aderências densas e firmes caracterizam o estágio IV ou endometriose grave. (Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996, 1997).

Endometriose e Infertilidade

Um aspecto muito interessante em portadoras de endometriose é a sua enigmática associação com a infertilidade, observada em grande parte das pacientes (AGARWAL;GUPTA; SHARMA, 2005; AGARWAL;GUPTA; SIKKA, 2006; MINJAREZ; SCHLAFF, 2000). A literatura afirma que a taxa de fecundidade mensal (TFM) para casais normais em idade reprodutiva corresponde a cerca de 30% nos primeiros 3 ciclos e decai a 4% após 1 ano de tentativas de gestação. Entretanto, a TFM para casais inférteis com endometriose varia de 2 a 10% por mês, podendo mesmo a endometriose mínima estar associada à infertilidade (GUPTA et al., 2008).

Embora estudos apoiem o conceito de diminuição de fecundidade nas portadoras desta doença (BULLETTI et al., 2010; GARRIDO et al., 2002) e muitos mecanismos tenham sido propostos para explicar a presença de infertilidade nestas pacientes, entre eles, defeitos imunológicos e características alteradas do fluido peritoneal envolvendo citocinas e macrófagos (SUZUKI et al., 2005), os exatos mecanismos envolvidos na sua etiopatogênese, principalmente nos casos de endometriose mínima (estágio I) e leve (estágio II), em que não se observa alteração mecânica do trato reprodutivo, ainda não foram precisamente elucidados (HOLOCH; LESSEY, 2010).

A infertilidade apresentada por pacientes com as formas moderada e grave de endometriose (estágios III e IV, respectivamente) poderia ser explicada pela presença de

alterações anatômicas, como adesões pélvicas ou peritubárias que perturbariam a comunicação entre ovário e tuba uterina e, assim, prejudicariam a liberação, captação ou transporte do óvulo (BULLETTI et al., 2010). Entretanto, há crescentes evidências de que lesões sutis ou implantes endometrióticos em estágios iniciais (estágios I e II) também poderiam contribuir com a etiopatogênese da infertilidade, apesar da ausência de danos anatômicos pélvicos. (HOLOCH; LESSEY, 2010).

De acordo com D'Hooghe et al (2003), parece haver uma relação causal entre a presença de endometriose nas formas leves e a ocorrência de subfertilidade nas suas portadoras. Alguns autores relatam uma tendência à taxa de fecundidade mensal estar diminuída em mulheres inférteis com endometriose mínima e leve, em comparação com mulheres com infertilidade sem causa aparente. Além disso, há evidências de menor TFM após a inseminação uterina de mulheres com endometriose mínima e leve em comparação com aquelas sem a doença, bem como, de um aumento na TFM e taxa cumulativa de gravidez após remoção cirúrgica dos focos de endometriose mínima e leve (D'HOOGHE et al., 2003). Entretanto, há controvérsias a respeito da associação entre endometriose mínima (estágio I) e infertilidade. Segundo Matorras et al (2010), as taxas de gestação são semelhantes quando comparadas mulheres normais e mulheres com endometriose mínima (MATORRAS et al., 2010). Além disso, alguns autores sugerem que a forma mínima da doença possa estar presente em grande parte das mulheres, porém, sem a maioria delas apresentar efeitos sobre a fertilidade (HOLOCH; LESSEY, 2010). Diante destes dados, poderia-se conferir maior atenção à endometriose leve, a fim de se elucidar os mecanismos envolvidos na sua relação com a infertilidade.

Endometriose e Técnicas de Reprodução Assistida

Novas abordagens para o tratamento da infertilidade relacionada à endometriose têm surgido, destacando-se a aplicação cada vez mais rotineira das técnicas de reprodução assistida (TRA) de alta complexidade, sendo que seus resultados podem ser utilizados como importante ferramenta para o entendimento da etiopatogênese envolvida nesta doença. A literatura apresenta dados contraditórios acerca dos resultados da fertilização *in vitro* (FIV) em pacientes com endometriose, o que vem sendo foco de diversos estudos e hipóteses nos últimos anos (GARCIA-VELASCO; ARICI, 1999; GARRIDO et al., 2000; KUMBAK et al., 2008). Trabalhos sugerem a ocorrência de menores taxas de fertilização, implantação e de gestação em portadoras dessa afecção (AL-FADHLI et al., 2006; BARNHART; DUNSMOOR-SU; COUTIFARIS, 2002), o que poderia ser decorrente do comprometimento da qualidade oocitária e, conseqüentemente, embrionária e/ou de defeitos endometriais ou da interação entre o endométrio e o embrião (BRIZEK et al., 1995; KUMBAK et al., 2008; PELLICER et al., 1995). Assim, o comprometimento da qualidade embrionária poderia ser decorrente tanto de defeitos relacionados à foliculogênese e qualidade oocitária, como de eventos posteriores à fertilização (GUERIN; EL MOUATASSIM; MENEZO, 2001).

Microambiente folicular

Os fluidos peritoneal, folicular e de hidrossalpinge são microambientes reprodutivos que abrigam gametas, zigotos e embriões por tempo variável, de modo que alterações em sua composição química podem ter efeitos adversos nos processos reprodutivos. (AGARWAL; GUPTA; SHARMA, 2005)

O microambiente folicular pode ter um papel crítico na qualidade oocitária, fertilização e desenvolvimento embrionário. Sabe-se que o fluido folicular, que mantém

íntima relação com o oócito durante a fase de crescimento e maturação celular, constitui um microambiente metabolicamente ativo, contendo hormônios esteróides, fatores de crescimento, citocinas, espécies reativas, antioxidantes, entre outros, produzidos pelas células da granulosa, células endoteliais e leucócitos (ATTARAN et al., 2000; PASQUALOTTO et al., 2004).

Diferentes estudos avaliando os níveis de constituintes dos fluidos peritoneal (BERBIC et al., 2009; GUPTA et al., 2008; MANSOUR et al., 2009; MANSOUR et al., 2010) e folicular (ANDRADE et al., 2010; JOZWIK;WOLCZYNSKI; SZAMATOWICZ, 1999; PELLICER et al., 1998; PELLICER et al., 1998) apontam à existência de alterações em pacientes com endometriose. Segundo Bulletti et al (2010), mulheres com a doença possuem um maior volume de fluido peritoneal, com altas concentrações de macrófagos ativados, prostaglandinas, interleucina-1 (IL-1), Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e proteases, podendo ter efeito adverso na função oocitária, do espermatozóide, embrião, ou trompa de falópio (BULLETTI et al., 2010). Outros estudos evidenciaram diferenças em constituintes do fluido folicular, como aumento dos níveis de interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10), interleucina-1 beta (IL-1 β), TNF- α e diminuição de fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF) quando comparadas portadoras de endometriose e controles (GARRIDO et al., 2000; GUPTA et al., 2008; PASQUALOTTO et al., 2004; WUNDER et al., 2005). Entretanto, a maioria dos autores não faz distinção entre os estágios de endometriose, o que impossibilita uma avaliação precisa do papel da progressão da doença sobre a infertilidade.

Questionamos a possibilidade de ocorrência de alguma alteração no microambiente folicular de pacientes inférteis com endometriose, que poderia afetar a aquisição de competência oocitária (AGARWAL;GUPTA; SIKKA, 2006; BARCELOS et al., 2009; FERREIRA et al., 2009) e, conseqüentemente, comprometer a fertilidade natural e os resultados dos tratamentos de reprodução assistida em mulheres com esta doença

(AGARWAL;SALEH; BEDAIWY, 2003; AL-FADHLI et al., 2006; BARNHART;DUNSMOOR-SU; COUTIFARIS, 2002).

Competência oocitária

O fuso meiótico de oócitos humanos em metáfase II (MII) é uma estrutura temporária e dinâmica, em forma de barril, composta por microtúbulos formados por dímeros de tubulina que se polimerizam e despolimerizam nos diversos estágios do ciclo celular (CHOI et al., 2007) e está associada ao córtex oocitário e sua rede de microfilamentos subcorticais (KIM et al., 1998; MANDELBAUM et al., 2004; WANG; KEEFE, 2002), sendo essencial para garantir a fidelidade da segregação cromossômica durante a meiose (DE SANTIS et al., 2005; VAN BLERKOM; DAVIS, 2001; VOLARCIK et al., 1998). 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 (EICHENLAUB-RITTER;SHEN; TINNEBERG, 2002; HU et al., 2001; MULLEN et al., 2004), entre os quais o estresse oxidativo, passível de promover anomalias meióticas, instabilidade cromossômica, aumento da apoptose e comprometimento do desenvolvimento embrionário pré-implantação (LIU et al., 2003; NAVARRO et al., 2006; NAVARRO;LIU; KEEFE, 2004). Estudos avaliando os potenciais mecanismos envolvidos na gênese das alterações do fuso celular relacionadas ao estresse oxidativo, evidenciaram que o mesmo pode danificar diversas proteínas intracelulares (BERLETT; STADTMAN, 1997; STADTMAN, 1992), algumas das quais, importantes para a organização do fuso celular (ABRIEU et al., 2001; ANTONIO et al., 2000; FUNABIKI; MURRAY, 2000) 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 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 (ARMSTRONG, 2001; LONERGAN et al., 1994; PAVLOK; LUCAS-HAHN; NIEMANN, 1992).

Um estudo de Mansour et al (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 neste modelo animal. Estas anomalias foram reduzidas após suplementação do meio de cultivo com *L-carnitina*, um antioxidante, sugerindo que substâncias presentes no fluido peritoneal de portadoras desta doença promovem comprometimento da qualidade oocitária e embrionária, tendo o estresse oxidativo como provável mediador (MANSOUR et al., 2009). Recentemente, o mesmo grupo publicou novo trabalho avaliando o efeito do FP de mulheres com endometriose sobre o citoesqueleto de oócitos de camundongos em MII, sendo novamente encontrada uma maior frequência de fuso meiótico anormal e cromossomos desalinhados em oócitos incubados com fluido destas pacientes, quando comparadas a controles. Além disso, o dano ao citoesqueleto oocitário foi positivamente correlacionado com a duração da infertilidade e o estágio da doença (MANSOUR et al., 2010). Estes achados sugerem haver alterações no FP de portadoras de endometriose, as quais estariam comprometendo a qualidade oocitária, podendo o estresse oxidativo ter participação neste processo.

Embora haja trabalhos avaliando o efeito do FP de mulheres com endometriose sobre a qualidade oocitária (MANSOUR et al., 2009; MANSOUR et al., 2010) e dosando diferentes componentes em soro, FF ou FP de pacientes com a doença, não encontramos nenhum estudo que tenha avaliado o efeito do fluido folicular de mulheres inférteis com endometriose leve na

gênese de anomalias meióticas oocitárias. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial impacto de diferentes concentrações de fluido folicular de mulheres inférteis com e sem endometriose sobre a gênese de anomalias meióticas oocitárias, durante maturação *in vitro* (MIV), utilizando modelo experimental bovino.

2. Justificativa

A endometriose, doença caracterizada por implante e crescimento de tecido endometrial fora da cavidade uterina (GUPTA et al., 2006), apresenta elevada prevalência populacional (BULLETTI et al., 2010). Entre suas manifestações clínicas mais freqüentemente relacionadas, destaca-se a infertilidade, presente em 30 a 50% das suas portadoras (BULLETTI et al., 2010), as quais parecem ter uma menor taxa de fecundidade mensal em ciclos naturais (GUPTA et al., 2008) e piores resultados de FIV em tratamentos de reprodução assistida (AL-FADHLI et al., 2006; BARNHART; DUNSMOOR-SU; COUTIFARIS, 2002) quando comparadas a mulheres sem a doença.

Alterações anatômicas parecem estar relacionadas à infertilidade em pacientes com as formas graves de endometriose (BULLETTI et al., 2010), porém, em casos de doença leve, sem alterações anatômicas pélvicas, os mecanismos envolvidos na sua etiopatogênese ainda não foram precisamente elucidados (HOLOCH; LESSEY, 2010).

Embora haja trabalhos avaliando o efeito do FP de mulheres com endometriose sobre a qualidade oocitária (MANSOUR et al., 2009; MANSOUR et al., 2010) e dosando diferentes componentes em soro, FF ou FP de pacientes com a doença, não encontramos nenhum estudo que tenha avaliado o potencial impacto do fluido folicular de mulheres inférteis com endometriose leve na gênese de anomalias meióticas oocitárias.

A observação de maior incidência de anomalias meióticas em oócitos incubados com fluido folicular de mulheres inférteis com endometriose leve poderia colaborar com a elucidação dos mecanismos envolvidos na etiopatogênese da infertilidade relacionada a este estágio da doença, assim como, sugerir uma possível justificativa, ao menos parcial, para as menores taxas de implantação observadas neste grupo de mulheres, abrindo perspectivas para novas abordagens terapêuticas.

Diante do número reduzido de oócitos humanos destinados à pesquisa, a experimentação com animais torna-se relevante em estudos de maturação *in vitro*. Dessa

forma, o uso de modelo experimental bovino neste estudo se justifica pela similaridade no tamanho e morfologia dos ovários humano e bovino, por ambas as espécies serem monovulatórias e policíclicas e por ser um material abundante, barato, de fácil manipulação (MALHI;ADAMS; SINGH, 2005).

3. Objetivos

Objetivo Geral

Avaliar o potencial impacto de diferentes concentrações (15%, 10%, 5%, 1%) de fluido folicular de mulheres inférteis com endometriose leve e sem endometriose submetidas à estimulação ovariana controlada para a realização de injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI) sobre a integridade do fuso celular, a distribuição cromossômica e a organização dos microfilamentos de actina oocitários, em modelo experimental bovino.

Objetivos Específicos

1. Comparar o grau de maturidade nuclear oocitária (estágios da Meiose) entre as diferentes concentrações de fluido folicular dentro de cada grupo (endometriose leve e controle).
2. Comparar o grau de maturidade nuclear oocitária (estágios da Meiose) de cada concentração de fluido folicular entre os grupos endometriose, controle e sem fluido.
3. Comparar a integridade do fuso celular, o alinhamento cromossômico e a organização dos microfilamentos de actina oocitários entre as diferentes concentrações de fluido folicular dentro de cada grupo (endometriose leve e controle).
4. Comparar a integridade do fuso celular, o alinhamento cromossômico e a organização dos microfilamentos de actina oocitários de cada concentração de fluido folicular entre os grupos endometriose leve, controle e sem fluido.

4. Casuística e Métodos

Realizou-se um estudo prospectivo de fevereiro de 2009 a fevereiro de 2011 junto ao Setor de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP-USP. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP) e pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP). As pacientes que preencheram os critérios de inclusão e manifestaram o desejo de participar do projeto e concordaram em ceder amostras de fluido folicular, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1) previamente à inclusão no estudo.

Critérios de Inclusão

No grupo endometriose, foram selecionadas pacientes com infertilidade associada à endometriose diagnosticada e classificada por videolaparoscopia (segundo os critérios da American Society for Reproductive Medicine, 1997), com estadiamento da doença definido como grau II (endometriose leve). No grupo controle, incluíram-se pacientes apenas com infertilidade por fator masculino e/ou tubário. Todas as pacientes do grupo controle foram submetidas à videolaparoscopia diagnóstica como procedimento de rotina para investigação da infertilidade conjugal, sendo excluída a presença de endometriose.

Critérios de exclusão

Foram critérios de exclusão: idade maior ou igual a 38 anos, índice de massa corporal (IMC) maior que 30 Kg/m², nível sérico de hormônio folículo estimulante (FSH) no terceiro dia do ciclo menstrual maior ou igual a 10mUI/ml, anovulação crônica, presença de hidrossalpinge e doenças crônicas como *diabetes mellitus* ou outras endocrinopatias, doença cardiovascular,

dislipidemia, lúpus eritematoso sistêmico e outras doenças reumatológicas, infecção pelo vírus HIV, qualquer infecção ativa, tabagismo, uso constante de medicações hormonais e de antiinflamatórios hormonais e não-hormonais nos seis meses anteriores à inclusão no estudo.

Protocolo de Estimulação

Com o objetivo de sincronizar e programar o início do ciclo de estimulação ovariana controlada utilizou-se a programação da menstruação, que consiste em se administrar diariamente anticoncepcionais orais combinados, iniciados no período menstrual do ciclo precedente até cinco dias antes do previsto para o início da estimulação ovariana, suspendendo sua administração de tal forma que o início do sangramento menstrual coincida com a realização da ultrassonografia transvaginal (USTV) basal para se observar o padrão endometrial e afastar a presença de cistos ovarianos que pudessem interferir na resposta à administração das gonadotrofinas exógenas e na monitorização ultrassonográfica do crescimento folicular.

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

A hiperestimulação ovariana controlada foi iniciada entre o segundo e o quarto dia do ciclo menstrual. As pacientes receberam 150 a 300 UI por dia de FSH recombinante (FSHr) (Gonal-F®, Serono, Brasil; Puregon®, Organon, Brasil), via intramuscular, nos primeiros 6 dias da indução. A partir do sétimo dia da indução da ovulação, a dose foi ajustada de acordo com o crescimento folicular e a espessura endometrial, monitorados com USTV diariamente ou em dias alternados.

Na presença de, pelo menos, dois folículos com 18 mm de diâmetro médio, foram administrados 250 µg de hCG recombinante (Ovidrel®, Serono, Brasil) às 22:00. A captação dos oócitos foi realizada 34 a 36h após a administração do hCG recombinante.

Coleta e processamento do fluido folicular

Cerca de 34 a 36 horas após a administração do hCG, as pacientes foram submetidas à captação oocitária, sob sedação endovenosa com propofol. A aspiração folicular foi realizada por meio de ultra-sonografia com transdutor transvaginal de 5 MHz, acoplado a guia de punção.

Para a coleta de fluido folicular, utilizaram-se tubos estéreis, individuais, aquecidos a 37°C, sem meio de cultura. Foi aspirado todo o conteúdo do primeiro folículo com diâmetro médio ≥ 15 mm do primeiro ovário puncionado de cada paciente. Apenas os fluidos foliculares livres de contaminação sanguínea à inspeção visual e que apresentaram células da granulosa (CG) ou células da granulosa e um oócito maduro foram selecionados para o trabalho. Desta forma, não foram incluídas no estudo amostras de fluido folicular contaminadas com sangue ou meio de cultivo, ou que não continham CG e/ou oócitos maduros.

As amostras de fluido foram centrifugadas a 1500 rpm por 7 minutos e armazenadas a -80°C, em tubo individual, para posterior utilização nos experimentos.

Coleta dos complexos *cumulus*-oócito de bovinos

Os ovários, provenientes de vacas abatidas em frigorífico, foram imediatamente transportados ao laboratório, mantidos em solução fisiológica (0,9% NaCl) acrescida de 0,05 g/L de sulfato de estreptomicina, a uma temperatura de 35-38,5°C. Posteriormente, foram borrifados com álcool 70%, lavados em solução fisiológica pré-aquecida a 38,5°C e mantidos nesta mesma solução, em banho-maria, até o final da aspiração. Os complexos *cumulus*-oócito

(COC) imaturos foram aspirados de folículos de 2 a 8 mm de diâmetro, utilizando-se agulhas 25 x 7 acopladas a seringas de 20ml e, então, selecionados sob estereomicroscópio em placas de Petri de 100 mm contendo o meio de lavagem Talp Hepes. Para o cultivo *in vitro*, somente os COCs morfologicamente saudáveis foram selecionados, ou seja, aqueles com citoplasma homogêneo e pelo menos três camadas de células do *cumulus-oophorus*.

Maturação *in vitro*

Utilizou-se o meio de maturação padrão TCM-199 com sais Earle e bicarbonato (Invitrogen, Gibco Laboratories Life Technologies Inc., Grand Island, NY), suplementado com 0,2 μ M de piruvato, 100 UI/ml de Penicilina, 0,1 mg/ml de Estreptomicina, 0,5 μ g/ml de FSH, 5,0 μ g/ml de LH e 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (FERREIRA et al., 2009).

A fim de manter a concentração adequada de suplementação após a adição de fluido folicular, eliminando-se, assim, o efeito da diluição dos suplementos, optou-se por preparar um TCM 15% mais concentrado, ao qual, de acordo com cada diluição, foi adicionado fluido folicular e/ou meio TCM filtrado não suplementado, conforme esquema apresentado na figura 1.

Imediatamente após a seleção, os COCs foram randomicamente divididos em 9 grupos: 1) COCs cultivados em meio padrão (sem suplementação de fluido folicular); 2) COCs cultivados em meio padrão + fluido folicular de mulheres com endometriose leve nas concentrações 15%, 10%, 5% e 1%; 3) COCs cultivados em meio padrão + fluido folicular das pacientes controle nas concentrações 15%, 10%, 5% e 1%. O cultivo foi feito em placas *Nunc* de 24 poços, em um volume total de 200 μ l de meio ou meio acrescido de fluido folicular, sem óleo mineral, a 38,5°C, 95% de umidade, 5% de CO₂ em ar, por um período de 22 a 24 horas. Após a maturação, os oócitos foram desnudados por agitação mecânica, em meio tamponado Talp Hepes.

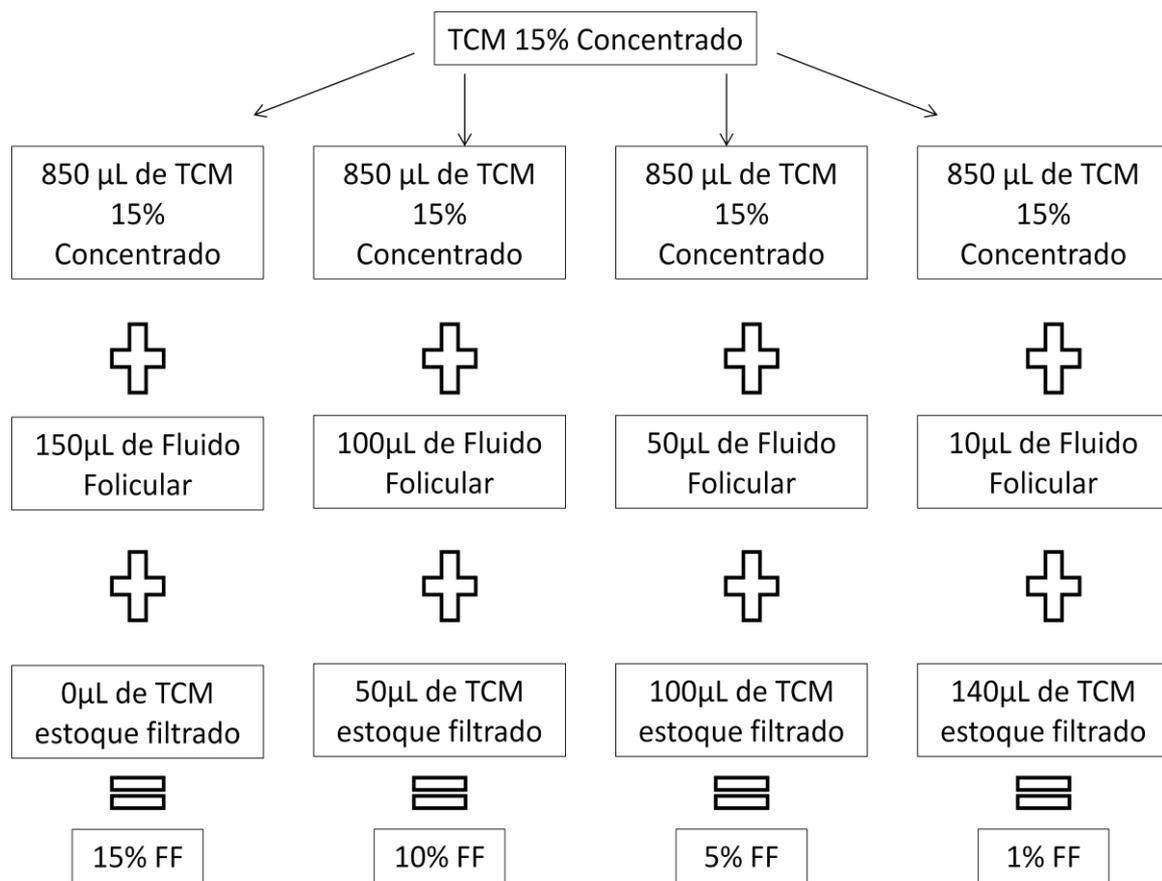


Figura 1. Esquema de preparo das diluições a fim de manter a concentração adequada de suplementação após a adição de fluido folicular.

Fixação dos oócitos

Ocorrido o desnudamento, os oócitos foram colocados em solução fixadora MTSB XF, composta por 1X de Tampão Estabilizador (0,1M de Pipes, 5mM de $MgCl_2$ e 2,5mM de EGTA), 50% de Óxido de Deutério, 0,01% de Aprotinina de pulmão bovino, 1 mM de DTT, 1 µM de Taxol, 0,5% de Triton-X, 2% de Formaldeído e água de MilliQ, aquecida previamente por 30 minutos em estufa a 37°C, permanecendo nesta solução a 4°C até o processamento da imunofluorescência e confecção das lâminas.

Imunofluorescência

Os oócitos previamente fixados foram lavados em solução tampão composta por 0,02% de NaN_3 , 0,01% de Triton-X, 0,2% de leite desnatado, 2% de Soro Normal de Cabra, 0,1M de Glicina, 2% de BSA(V) e tampão PBS, onde permaneceram a 4°C *overnight*. Passado esse período, foram novamente lavados em solução tampão e incubados *overnight*, a 4°C, com o anticorpo primário anti- β -tubulina de camundongo (diluição 1:1000). Após nova lavagem em solução tampão, foram incubados com o anticorpo secundário imunoglobulina de cabra anti-camundongo conjugada com Fluoresceína isotiocianato (FITC) (Zymed Laboratories, Invitrogen Corporation, Calsbad, CA, USA, diluição 1:500) por 2 horas a 37°C. Depois de lavadas, as amostras foram marcadas para os filamentos de actina com faloidina conjugada a rodamina (1:1000), lavadas novamente e, então, os cromossomos foram marcados com Hoechst 33342 (10 $\mu\text{g/ml}$), em meio de montagem composto por 50% de glicerol e 25 mg/ml de NaN_3 , durante 10 minutos, à temperatura ambiente e montados entre lâmina e lamínula.

As lâminas foram estocadas a 4°C até observação em Microscópio Confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Mannheim, Germany), sendo 7 dias o intervalo máximo entre a confecção e a leitura das mesmas.

Avaliação dos oócitos

Os oócitos visualizados foram, primeiramente, classificados quanto à fase da divisão meiótica em que se encontravam: metáfase I (MI - Figura 2), anáfase I (AI), telófase I (TI - Figura 3) ou metáfase II (MII – Figuras 4, 5, 6 e 7). Posteriormente, aqueles em MII foram classificados quanto à posição de visualização do fuso meiótico, sendo considerados fusos analisáveis apenas aqueles em visão sagital, permitindo avaliação global de fuso, cromossomos e microfilamentos de actina (Figura 4A e 4B). Aqueles em visão polar foram considerados não analisáveis devido à impossibilidade de avaliação dos microtúbulos, tendo

apenas os cromossomos e microfilamentos de actina analisados (Figura 4C e 4D). Os oócitos considerados analisáveis foram avaliados quanto à integridade do fuso (microtúbulos), alinhamento e condensação dos cromossomos e organização dos microfilamentos de actina, enquanto os não analisáveis foram avaliados apenas quanto ao alinhamento e condensação dos cromossomos e organização dos microfilamentos de actina.

Considerou-se o fuso como normal quando em forma de barril, com pólos definidos e tamanho adequado (Figura 4A e 4B), e anormal quando desorganizado, com tamanho e forma anormais, integridade comprometida e/ou pólos não-definidos (Figuras 5, 6 e 7). Os cromossomos foram considerados normais quando alinhados na placa metafásica (Figura 4) e anormais quando desalinhados (Figuras 5, 6 e 7). Os microfilamentos de actina foram considerados normais quando distribuídos homoganeamente no citoplasma oocitário (Figura 4) e anormais, quando superconcentrados na região do fuso (Figuras 7A e 7D).

Os fluidos foliculares utilizados nas maturações *in vitro* foram provenientes de 22 pacientes inférteis, sendo 11 com endometriose leve e 11 com fator masculino e/ou tubário.

Análise estatística

As análises foram realizadas pelo procedimento GENMOD do programa estatístico SAS 2003 (2002-2003, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Para comparação inter e intra-grupos das variáveis de contagem (oócitos em MI, TI e MII, actina normal) considerou-se a Distribuição de Poisson.

Para comparação inter e intra-grupos das variáveis de percentagem (proporção de fuso normal e cromossomos alinhados, fuso normal e cromossomos desalinhados, fuso anormal e cromossomos desalinhados, fuso anormal e cromossomos alinhados, cromossomos alinhados, cromossomos desalinhados, total de normais e total de anormais) utilizou-se a Distribuição Gama.

Foi considerado significativo $p < 0,05$.

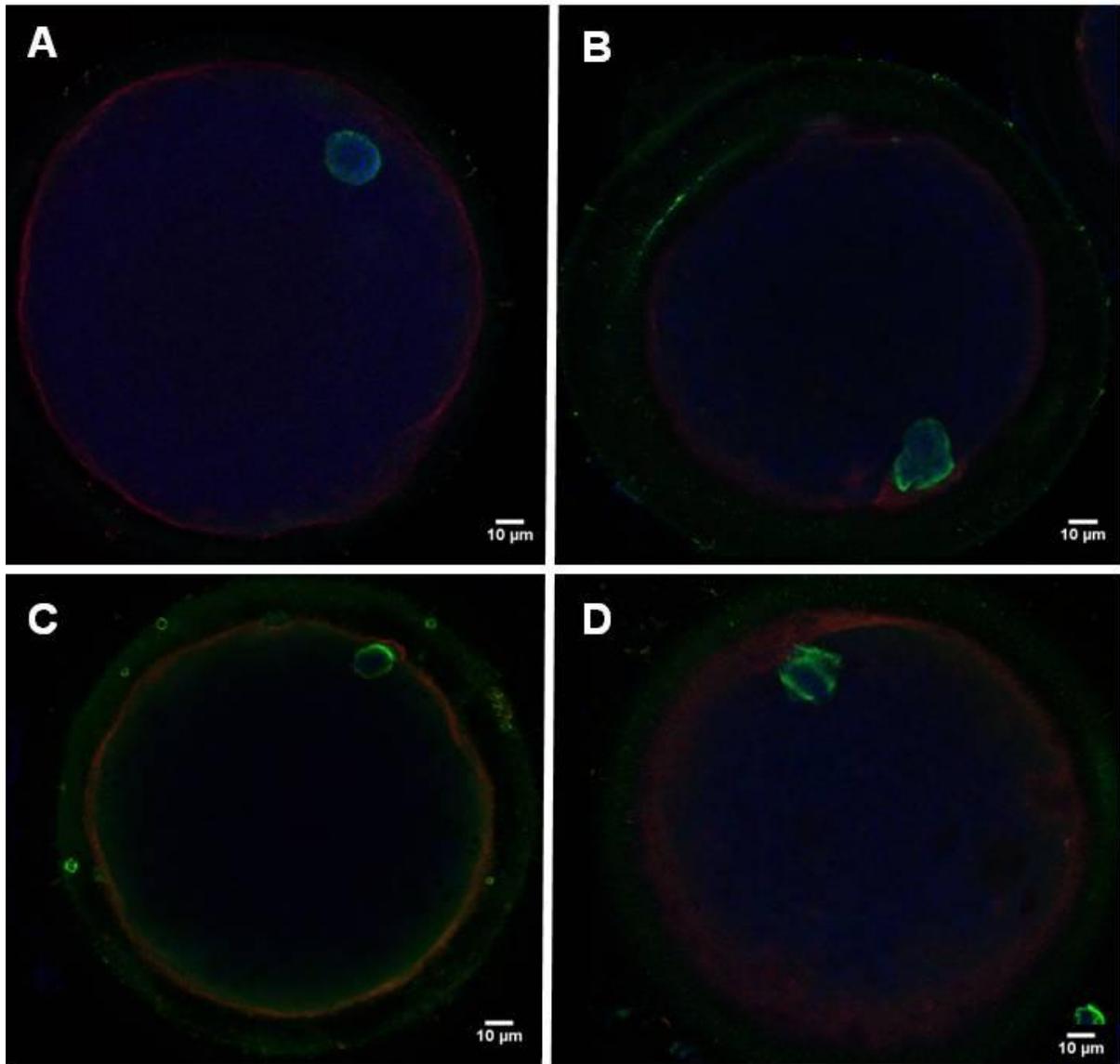


Figura 2. Imagens de microscopia confocal evidenciando microtúbulos (verde), cromossomos (azul) e microfilamentos de actina (vermelho), em oócitos bovinos em Metáfase I. A - Metáfase I normal (visão polar). B- Metáfase I anormal (visão polar). C- Metáfase I normal (visão sagital). D- Metáfase I anormal (visão sagital).

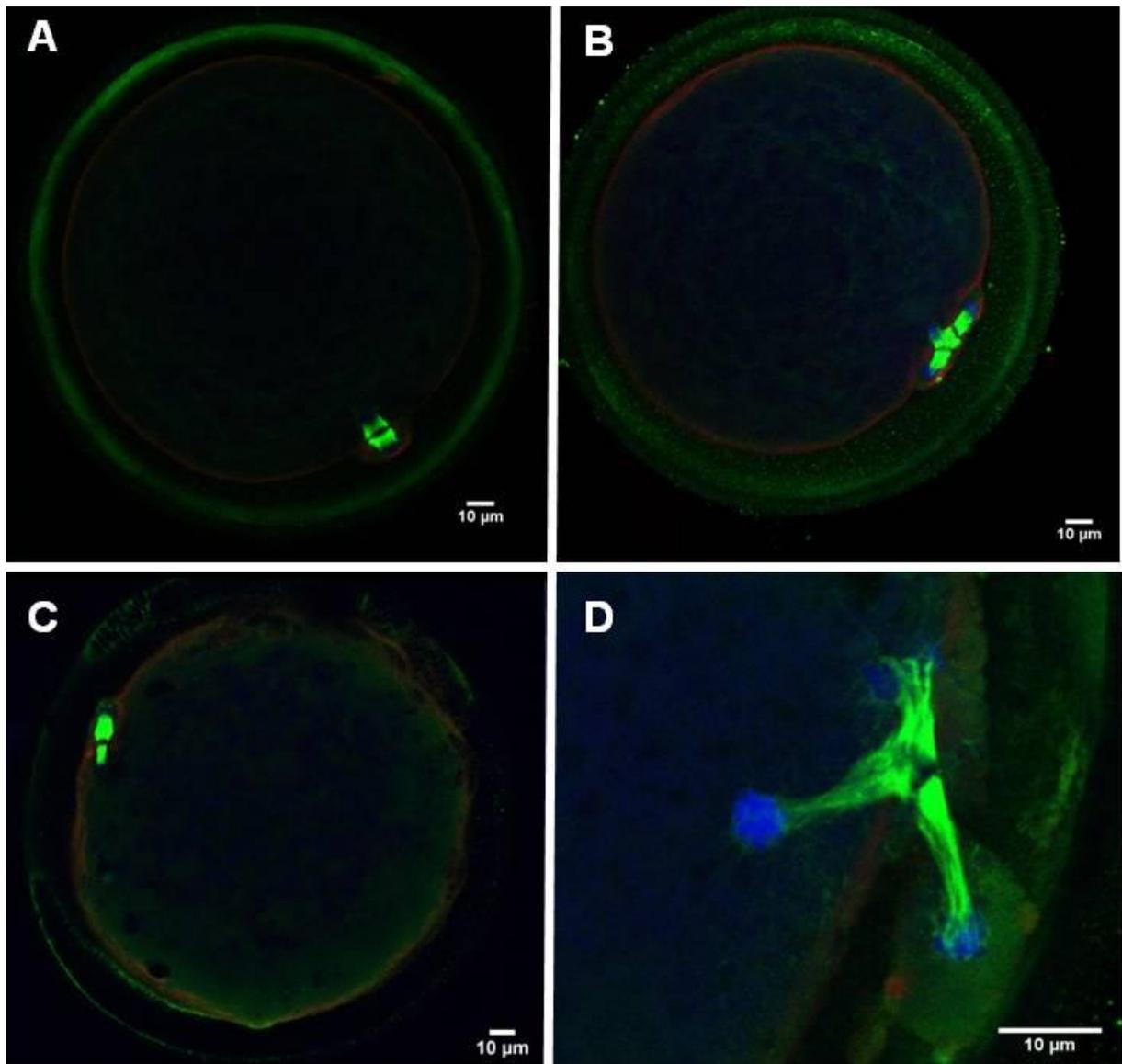


Figura 3. Imagens de microscopia confocal evidenciando microtúbulos (verde), cromossomos (azul) e microfilamentos de actina (vermelho), em oócitos bovinos em Telófase I. A e C - Telófase I normal . B e D- Telófase I anormal.

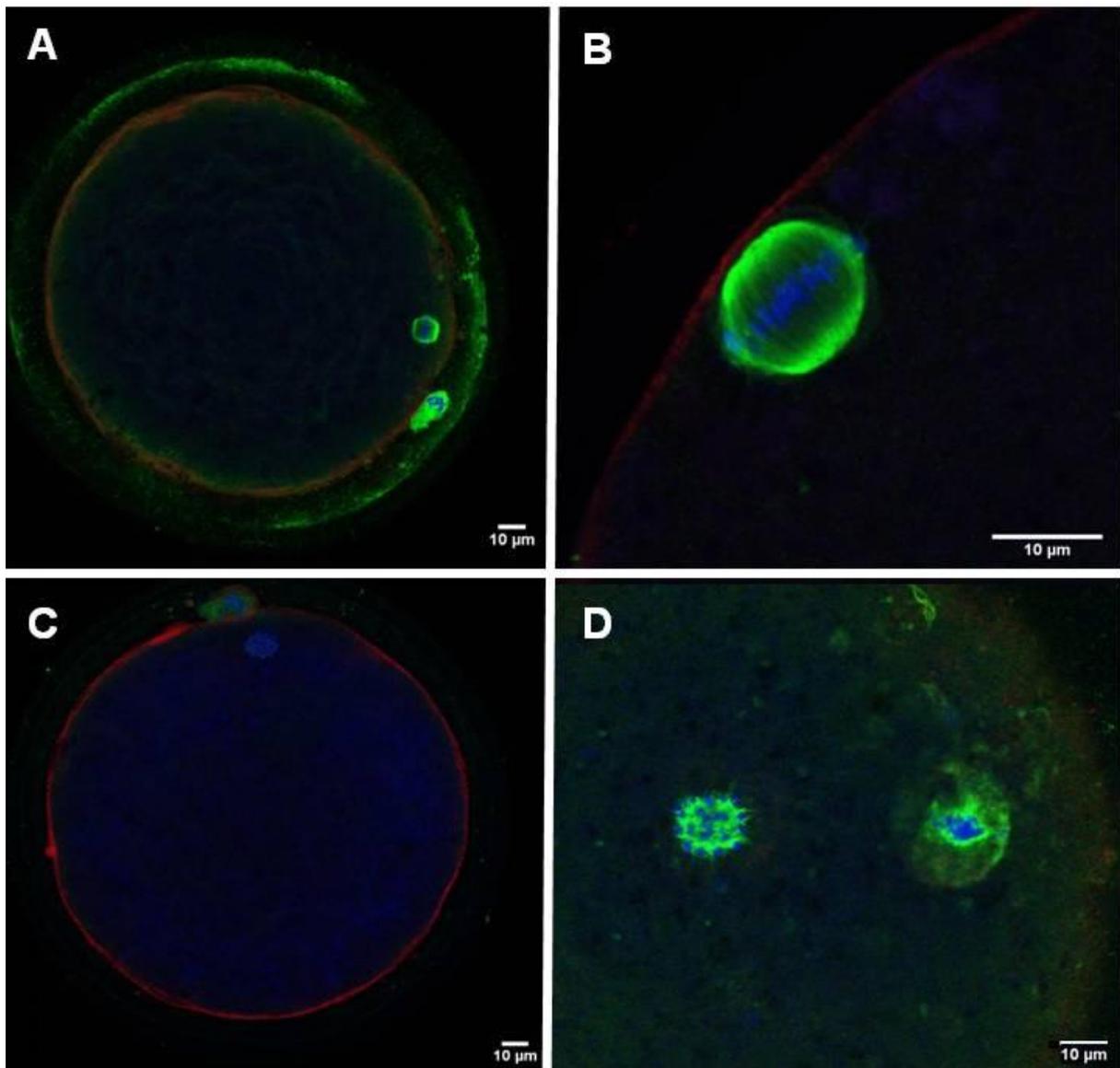


Figura 4. Imagens de microscopia confocal evidenciando microtúbulos (verde), cromossomos (azul) e microfilamentos de actina (vermelho), em oócitos bovinos em Metáfase II normal. A e B: Fuso normal e cromossomos alinhados (visão sagital). C e D: Cromossomos alinhados (visão polar).

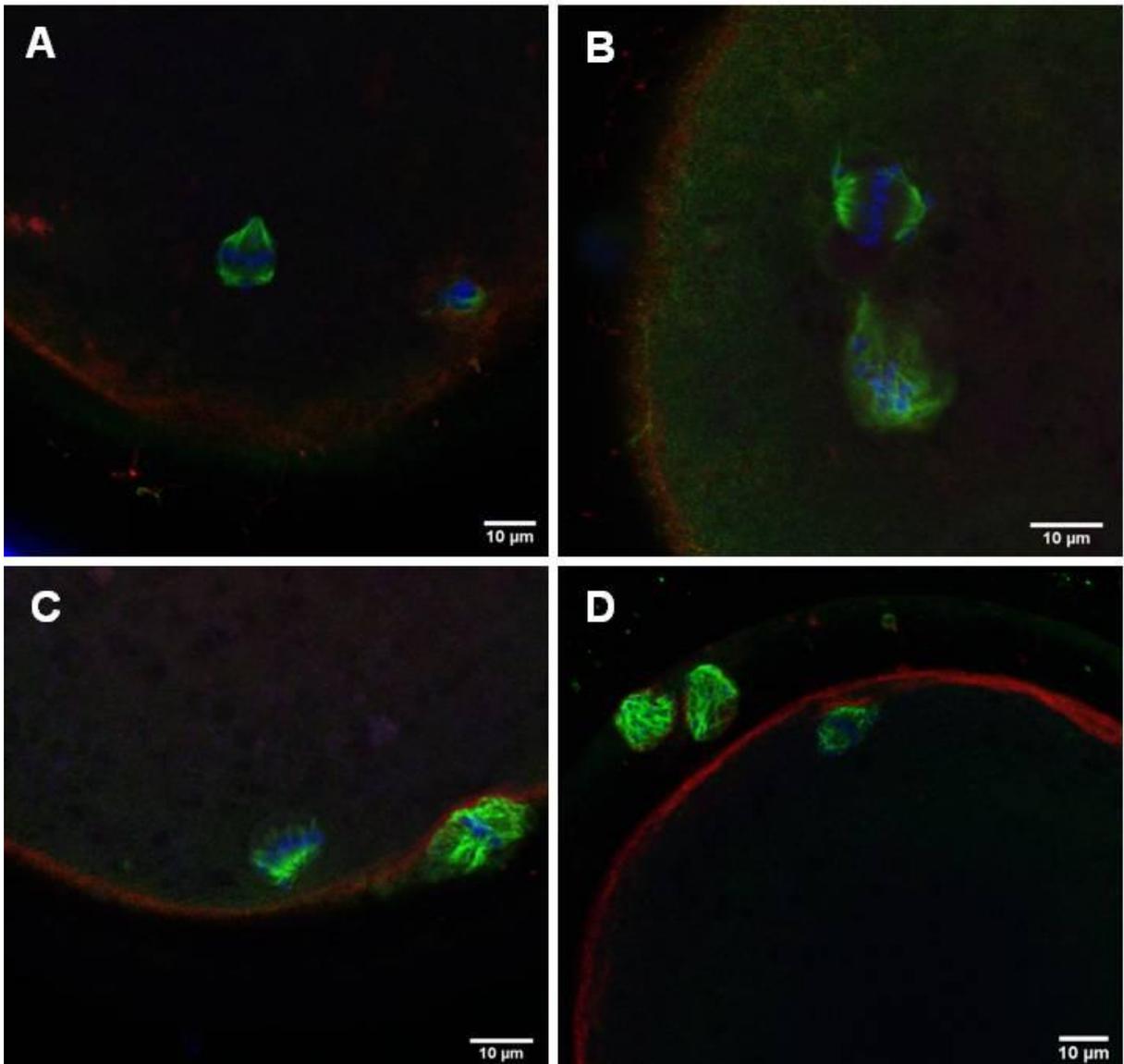


Figura 5. Imagens de microscopia confocal evidenciando microtúbulos (verde), cromossomos (azul) e microfilamentos de actina (vermelho), em oócitos bovinos em Metáfase II anormal. A-D: Fuso anormal e cromossomos desalinhados (visão sagital).

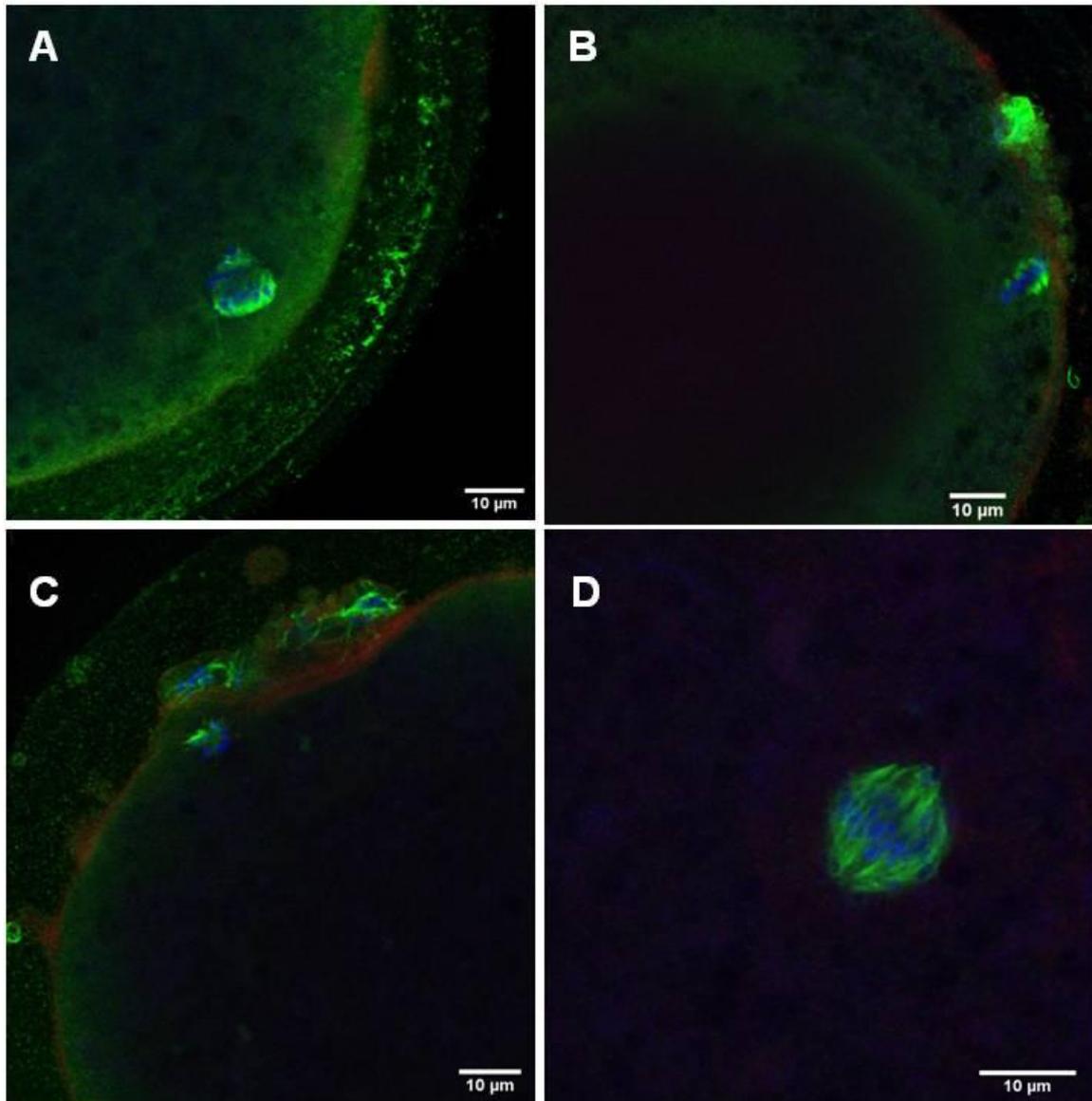


Figura 6. Imagens de microscopia confocal evidenciando microtúbulos (verde), cromossomos (azul) e microfilamentos de actina (vermelho), em oócitos bovinos em Metáfase II anormal. A e C: Cromossomos desalinhados / anormais (visão polar). B: Fuso anormal e cromossomos alinhados (visão sagital). D: Fuso anormal e cromossomos desalinhados (visão sagital).

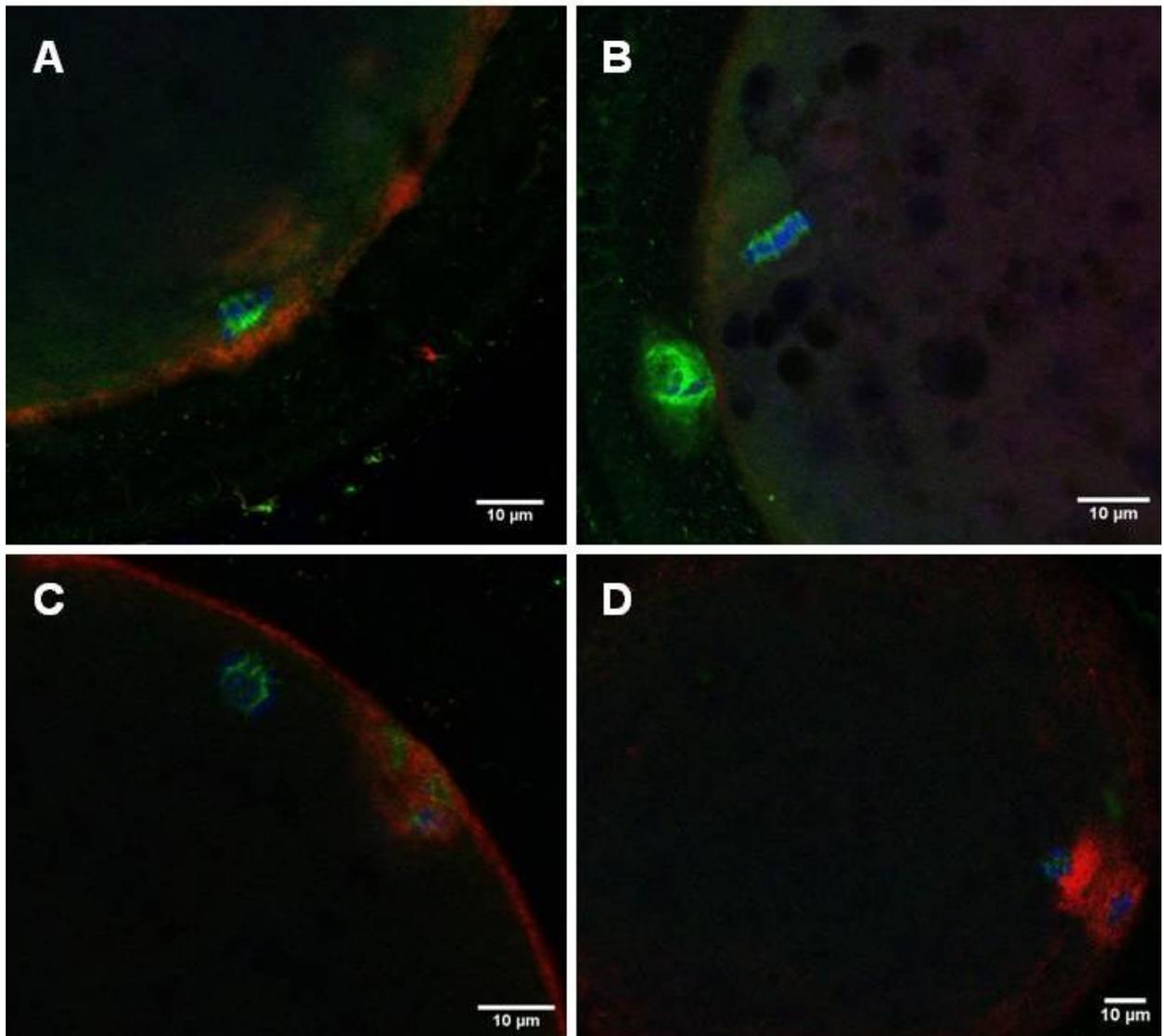


Figura 7. Imagens de microscopia confocal evidenciando microtúbulos (verde), cromossomos (azul) e microfilamentos de actina (vermelho), em oócitos bovinos em Metáfase II anormal. A: Fuso anormal, cromossomos desalinhados e actina anormal (visão sagital). B: Fuso anormal, cromossomos alinhados (visão sagital). C: Cromossomos anormais (visão polar). D: actina anormal, cromossomos anormais (visão polar).

5. Resultados

Os resultados obtidos são apresentados nas tabelas 1 e 2.

Um total de 1324 complexos *cumulus*-oócito foram maturados *in vitro*, randomicamente divididos entre os 9 grupos (sem fluido, FF controle nas concentrações 1%, 5%, 10% e 15% e FF endometriose nas concentrações 1%, 5%, 10% e 15%). Deste total, 1128 foram fixados e 1038 visualizados em microscopia confocal. Um total de 921 oócitos foi classificado em MII, sendo 466 considerados com fuso analisável (visão sagital) e 455 com fuso não-analisável (visão polar, apenas avaliação de cromossomos e actina).

Não houve diferença significativa para nenhuma das variáveis analisadas quando comparadas as concentrações de fluido folicular de mulheres com endometriose entre si. Da mesma forma, não se encontrou diferença significativa para nenhuma das variáveis analisadas quando comparadas as concentrações de fluido folicular de pacientes controles entre si (Tabelas 1 e 2).

Com relação ao estágio de maturação, não foi observada diferença significativa no total de oócitos em TI, MI e MII entre os grupos endometriose, controle e sem fluido, bem como, não houve diferença significativa entre os grupos quanto à porcentagem de oócitos normais nos estágios MI e TI (Tabela 1).

Não se encontrou oócitos em AI em nenhum dos grupos estudados.

Daqueles em estágio de MII, quando considerados conjuntamente os oócitos analisáveis e não analisáveis (em visão sagital e visão polar, respectivamente), não houve diferença significativa nas porcentagens de normalidade (fuso normal + cromossomos alinhados e cromossomos alinhados) entre os grupos endometriose, controle e sem fluido (Tabela 2).

Quando considerados apenas os oócitos MII analisáveis (visão sagital), foi encontrado maior percentual de anormalidades meióticas (fuso anormal + cromossomos alinhados, fuso anormal + cromossomos desalinhados, fuso normal + cromossomos desalinhados) nos oócitos

maturados em meio padrão acrescido de fluido folicular de mulheres com endometriose leve quando comparados aos maturados em meio padrão acrescido de fluido folicular de mulheres controle e àqueles maturados sem adição de fluido ($p < 0,01$). Conseqüentemente, houve uma maior porcentagem de fuso + distribuição cromossômica normais entre os oócitos do grupo controle com relação aos do grupo endometriose, entretanto, sem apresentar diferença significativa para o grupo sem fluido ($p < 0,01$). Da mesma forma, encontrou-se significativamente maior porcentagem de oócitos com fuso e distribuição cromossômica normais entre os maturados em meio padrão (sem fluido) quando comparados aos maturados em meio padrão acrescido de fluido folicular de mulheres com endometriose leve ($p < 0,01$).

(Tabela 2)

Não foi encontrada diferença significativa na distribuição cromossômica normal de oócitos em visão polar entre nenhum dos grupos estudados (Tabela 2). A análise das anormalidades dos oócitos em visão polar (CD) não convergiu devido ao pequeno número de ocorrências.

Não foi encontrada diferença significativa para a organização dos microfilamentos de actina entre os grupos.

Tabela1 – Estágios de maturação nuclear (metáfase I, telófase I e metáfase II) oocitária nos grupos Sem Fluido, Controle e Endometriose.

	Concentração FF (%)	Total Oócitos fixados (n)	Total oócitos visualizados (n)	Metáfase I		Telófase I		Metáfase II
				Total	Normal n (%)	Total	Normal n (%)	Total
Sem Fluido	0	119	115	9 (7,82)	7 (77,78)	6 (5,22)	5 (83,34)	100 (86,96)
FF Controle	1	129	117	6 (5,12)	6 (100)	4 (3,42)	2 (50)	107 (91,46)
	5	133	118	4 (3,38)	4 (100)	1 (0,85)	1 (100)	113 (95,77)
	10	126	119	13 (10,92)	8 (61,54)	5 (4,20)	4 (80)	101 (84,88)
	15	124	111	6 (5,40)	4 (66,67)	4 (3,60)	2 (50)	101 (91)
FF Endometriose	1	125	115	12 (10,43)	8 (66,67)	2 (1,74)	1 (50)	101 (87,83)
	5	124	113	16 (14,16)	8 (50)	1 (0,088)	0	96 (84,96)
	10	125	118	13 (11,01)	11 (84,62)	2 (1,70)	2 (100)	103 (87,29)
	15	123	112	9 (8,03)	6 (66,67)	4 (3,58)	3 (75)	99 (88,39)

Nota. Não houve diferença significativa entre os grupos. Nível de significância de 5%.

Tabela 2 – Porcentagens de oócitos em metáfase II normais e anormais nos grupos Sem Fluido, Controle e Endometriose.

	Concentração FF (%)	Total de MII	Analisáveis						Não Analisáveis		
			Total n (%)	Normais	Anormais n (%)				Total n (%)	Normais	Anormais
				FNCA n (%)	Total n (%)	FACA n (%)	FACD n (%)	FNCD n (%)		CA n (%)	CD n (%)
Sem Fluido	0	100	51 (51)	39 (76,47)	12 (23,53)	3 (25)	6 (50)	3 (25)	49 (49)	49 (100)	0
FF Controle	1	107	47 (43,93)	38 (80,85)	9 (19,15)	3 (33,33)	6 (66,67)	0	60 (56,07)	59 (98,33)	1 (1,67)
	5	113	64 (56,64)	49 (76,56)	15 (23,44)	6 (40)	8 (53,34)	1 (6,66)	49 (43,36)	48 (97,96)	1 (2,04)
	10	101	60 (59,40)	45 (75)	15 (25)	6 (40)	7 (46,67)	2 (13,33)	41 (40,60)	40 (97,56)	1 (2,44)
	15	101	63 (62,38)	48 (76,19)	15 (23,81)	8 (53,34)	6 (40)	1 (6,66)	38 (37,62)	38 (100)	0
FF Endometriose	1	101	45 (44,55)	20 (44,44)	25 (55,56)	9 (36)	15(60)	1 (4)	56 (55,45)	52 (92,56)	4 (7,14)
	5	96	49 (51,04)	18 (36,74)	31 (63,26)	17 (54,84)	14 (45,16)	0	47 (48,96)	45 (95,75)	2 (4,25)
	10	103	44 (42,72)	20 (45,46)	24 (54,54)	12 (50)	12(50)	0	59 (57,28)	59 (100)	0
	15	99	43 (43,43)	22 (51,16)	21 (48,84)	11 (52,38)	9 (42,85)	1 (4,77)	56 (56,57)	55 (98,21)	1 (1,79)

Nota. Analisáveis: oócitos com fuso em visão sagital. Não analisáveis: oócitos com fuso em visão polar. FNCA: fuso normal e cromossomos alinhados. FACA: fuso anormal e cromossomos alinhados. FACD: fuso anormal e cromossomos desalinhados. FNCD: fuso normal e cromossomos desalinhados. CA: cromossomos alinhados. CD: cromossomos desalinhados.

$p < 0,01$ quando comparados FNCA e total de anormais entre os grupos Controle e Endometriose e entre os grupos Sem Fluido e Endometriose nas concentrações 1%, 5%, 10% e 15%. A análise dos CD não convergiu.

6. Discussão

A endometriose é uma doença caracterizada por implante e crescimento de tecido endometrial ectópico (GUPTA et al., 2006), destacando-se a infertilidade como uma de suas manifestações clínicas mais frequentes (BULLETTI et al., 2010). Entretanto, os mecanismos envolvidos na sua etiopatogênese, principalmente nos casos de doença mínima e leve, ainda não foram precisamente elucidados (HOLOCH; LESSEY, 2010). Sendo o ambiente folicular extremamente importante para o processo de maturação oocitária, possíveis alterações nos componentes do fluido folicular podem ter influência sobre maturidade e qualidade oocitárias e, assim, afetar fertilização, desenvolvimento embrionário inicial e taxas de gestação (MA et al., 2010), o que poderia explicar, parcialmente, a infertilidade e os piores resultados nos TRA apresentados por mulheres com endometriose.

Embora haja trabalhos reportando o efeito do fluido peritoneal de mulheres com endometriose sobre a qualidade oocitária (MANSOUR et al., 2009; MANSOUR et al., 2010) e diferenças nos níveis de componentes em soro (ANDRADE et al., 2010; CAMPOS PETEAN et al., 2008; JACKSON et al., 2005), fluido folicular (ATTARAN et al., 2000; BEDAIWY et al., 2007; CAMPOS PETEAN et al., 2008; GARRIDO et al., 2000; PASQUALOTTO et al., 2004; WIENER-MEGNAZI et al., 2004) ou fluido peritoneal (BULLETTI et al., 2010; FUJII; NAKAYAMA; NAKAGAWA, 2008; GUPTA et al., 2008; MINICI et al., 2008) de pacientes com a doença, não se encontrou nenhum estudo que tenha avaliado o efeito do fluido folicular de mulheres inférteis com endometriose sobre fuso, cromossomos e microfilamentos de actina oocitários. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial impacto de diferentes concentrações de fluido folicular de mulheres inférteis com e sem endometriose sobre a gênese de anomalias meióticas oocitárias, durante maturação *in vitro* (MIV), utilizando modelo experimental bovino. Diante da inconsistência dos dados relacionando endometriose mínima e infertilidade (HOLOCH; LESSEY, 2010;

MATORRAS et al., 2010), o presente estudo restringiu-se a apenas avaliar o efeito do fluido folicular de mulheres com endometriose leve sobre qualidade oocitária.

É importante salientar que, idealmente, para correlacionar a presença de anormalidades meióticas oocitárias com o ambiente folicular na endometriose, o fuso celular, a distribuição cromossômica e os microfilamentos de actina deveriam ser analisados em oócitos humanos maturados *in vivo* (BARCELOS et al., 2009). Entretanto, diante da baixa quantidade de oócitos captados em MII, do número reduzido de oócitos humanos destinados à pesquisa, e, sendo a análise por imunofluorescência um método invasivo que necessita de fixação da amostra, a utilização de modelo animal tornou-se importante alternativa neste estudo. O uso de oócitos bovinos pode ser justificado pela similaridade no tamanho e morfologia dos ovários humanos e bovinos, por ambas as espécies serem monovulatórias e policíclicas e por ser um material abundante, barato, de fácil manipulação (MALHI;ADAMS; SINGH, 2005). Sabe-se, também, que a maturação *in vitro*, por si só, pode promover aumento significativo da ocorrência de anormalidades meióticas oocitárias (BARCELOS et al., 2009). Todavia, a mesma metodologia de MIV foi aplicada para os três diferentes grupos, de modo que as diferenças encontradas provavelmente são decorrentes de diferenças nos constituintes do fluido folicular (obtidos das mulheres inférteis com endometriose leve e controles: fatores masculino e/ou tubário) e não devido ao processo de maturação *in vitro*.

De acordo com os resultados obtidos, não foi observada diferença significativa no número de oócitos em estágio de MI, TI e MII entre os grupos, o que demonstra não haver comprometimento da maturação nuclear dos oócitos cultivados com adição de FF de mulheres com endometriose leve. Estes achados discordam de outro estudo anteriormente realizado no mesmo serviço de RA, que avaliou maturação, integridade do fuso meiótico e distribuição cromossômica de oócitos de mulheres inférteis com endometriose e controles maturados *in vitro* e encontrou uma tendência a maior proporção de oócitos em telófase I no grupo

endometriose, apesar de não ter evidenciado anomalias meióticas, o que sugere possível retardo no processo de meiose I (BARCELOS et al., 2009). Entretanto, Barcelos et al (2009) não analisaram separadamente os diferentes estágios de endometriose. No referido estudo foram incluídos na análise oócitos maturados *in vitro* oriundos de ciclos estimulados de mulheres inférteis com endometriose mínima, leve, moderada e grave, de modo que a severidade da doença pode ter sido responsável pelo atraso na maturação, o que explicaria esta divergência.

Quando avaliada a estrutura de divisão celular de oócitos em MII com visão sagital, observou-se maior porcentagem de anormalidades meióticas entre aqueles maturados com FF de pacientes com endometriose leve quando comparados aos maturados com FF de mulheres sem a doença ou em meio de cultivo padrão apenas. A hipótese de que a qualidade oocitária pode ser prejudicada em mulheres com endometriose não é nova, mas não há um consenso geral a respeito. De acordo com Gianaroli et al (2010), o tipo de infertilidade tem efeito significativo sobre erros meióticos oocitários, sendo estes com maior incidência na presença de endometriose ou fator ovulatório (GIANAROLI et al., 2010), o que foi confirmado pelo presente estudo com relação à endometriose. Um estudo de Mansour et al (2009) demonstrou que o fluido peritoneal de mulheres com endometriose pode promover anomalias nos microtúbulos e cromossomos de oócitos de camundongos maturados *in vivo*, as quais foram reduzidas após suplementação do meio de cultivo com o antioxidante *L-carnitina*, sugerindo que componentes presentes no fluido peritoneal de portadoras desta doença promoveriam comprometimento da qualidade oocitária e embrionária, tendo o estresse oxidativo como provável mediador. Recentemente, o mesmo grupo publicou novo trabalho avaliando o efeito do FP de mulheres com endometriose sobre o citoesqueleto de oócitos de camundongos em MII, sendo novamente encontrada uma maior frequência de fuso meiótico anormal e cromossomos desalinhados em oócitos incubados com fluido destas pacientes quando

comparadas a controles (MANSOUR et al., 2010). Como o oócito permanece no microambiente folicular durante o processo de maturação, em íntima relação com o fluido folicular e mantém contato com FP após a ovulação e durante o trajeto inicial pela tuba uterina (MA et al., 2010), os efeitos destes dois microambientes poderiam se somar e promover possível efeito cumulativo sobre a estrutura de divisão meiótica. Assim, os achados do presente estudo, evidenciando que oócitos bovinos imaturos submetidos à maturação *in vitro* na presença de fluido folicular de mulheres inférteis com endometriose leve apresentam maior frequência de anomalias meióticas do que os maturados na ausência de fluido folicular ou na presença de fluido folicular de mulheres inférteis sem a doença, corroboram os de Mansour et al (2009, 2010) e agregam mais evidências à literatura acerca do potencial efeito deletério destes dois microambientes reprodutivos de mulheres inférteis com endometriose sobre a gênese de anomalias meióticas oocitárias, contribuindo para o entendimento de mais um possível mecanismo da infertilidade relacionada à endometriose. Por outro lado, os resultados do presente estudo contrariam os obtidos por Barcelos et al (2009), os quais não demonstraram diferenças significativas na frequência de anormalidades meióticas entre oócitos em MII de pacientes com endometriose *versus* controles. Porém, estes autores utilizaram oócitos humanos maturados *in vitro*, oriundos de ciclos estimulados de mulheres inférteis com diferentes estágios de endometriose, incluindo uma pequena casuística, não sendo passível extrapolar os dados obtidos em virtude destas diferenças metodológicas e potenciais vieses.

É importante salientar que os efeitos deletérios sobre a estrutura de divisão meiótica oocitária encontrados foram promovidos diante da incubação com fluidos foliculares apenas de pacientes com endometriose leve, indicando haver possível relação entre este estágio da doença e infertilidade, de modo que estes achados poderiam justificar os piores resultados de RA em portadoras da doença, como conseqüência de um comprometimento da aquisição de

competência e, assim, piora da qualidade oocitárias. Dessa forma, o presente estudo corrobora a hipótese de D'Hooghe et al (2003), que afirma haver evidências de uma relação causal entre a presença de endometriose nas formas leves e a ocorrência de subfertilidade nas suas portadoras (D'HOOGHE et al., 2003).

Sendo o fuso celular essencial para garantir a fidelidade da segregação cromossômica durante a meiose (DE SANTIS et al., 2005; VAN BLERKOM; DAVIS, 2001; VOLARCIK et al., 1998) e podendo as anomalias meióticas contribuir para a inabilidade do oócito em completar a maturação tornando-se incapaz de ser fertilizado, assim como, para a ocorrência de erros que não impossibilitem a fertilização, mas comprometam o desenvolvimento embrionário pré e/ou pós-implantação ou a viabilidade futura do conceito (ARMSTRONG, 2001; LONERGAN et al., 1994; PAVLOK; LUCAS-HAHN; NIEMANN, 1992), as anormalidades meióticas encontradas neste estudo podem ser a explicação para os relatados piores resultados de RA em pacientes com a doença (AL-FADHLI et al., 2006; BARNHART; DUNSMOOR-SU; COUTIFARIS, 2002).

O fato de não ter se encontrado diferença significativa para a frequência de distribuição cromossômica normal quando avaliados os oócitos em MII com visão polar pode ser explicado pela impossibilidade de análise fidedigna do fuso e cromossomos nesta posição. Por outro lado, os danos cromossômicos podem não aparecer necessariamente neste estágio da meiose e só se tornarem evidentes nos estágios seguintes, com segregação inadequada das cromátides-irmãs (FRAGOULI et al., 2011). Como não se encontrou diferença para porcentagem de normalidade quando avaliados conjuntamente os oócitos em visão polar e sagital, apenas havendo diferença significativa desta variável para os oócitos em visão sagital, sugere-se que a posição do fuso seja extremamente importante para a avaliação da divisão celular, de modo que a visão polar parece mascarar os danos aos microtúbulos e/ou cromossomos possivelmente observados em visão sagital.

Com relação às concentrações de fluido folicular testadas, não foi observada diferença significativa na frequência de normalidade do fuso em MII entre 1%, 5%, 10% e 15% de fluido folicular no grupo endometriose, assim como, no grupo controle, evidenciando que as concentrações não interferiram nos resultados e podendo-se inferir que 1% de FF de pacientes com endometriose é a menor concentração testada capaz de promover dano meiótico e, possivelmente, comprometer a qualidade oocitária em mulheres com endometriose leve.

7. Conclusões

A adição de fluido folicular de mulheres inférteis com endometriose leve submetidas à estimulação da ovulação, nas quatro concentrações utilizadas, não promoveu atraso ou bloqueio no processo de maturação oocitária em modelo experimental bovino.

Observou-se um efeito deletério do fluido folicular de mulheres inférteis com endometriose leve sobre o fuso meiótico e a distribuição cromossômica de oócitos bovinos em MII, submetidos à MIV na presença de FF. Não se observou diferença significativa nas frequências de anomalias meióticas encontradas nas quatro concentrações de fluido folicular (1%, 5%, 10% e 15%) adicionadas ao meio de cultivo padrão, de modo que o efeito não foi dependente da concentração utilizada. Assim, 1% de fluido folicular apresentou-se como a menor concentração testada capaz de promover aumento significativo na frequência de danos meióticos oocitários.

O fluido folicular de mulheres inférteis com endometriose leve submetidas à estimulação ovariana, adicionado ao meio de maturação *in vitro* de oócitos bovinos, é capaz de promover anomalias meióticas, o que pode ocasionar potencial piora da qualidade oocitária. Sugerimos que este mecanismo possa estar envolvido tanto na redução da fecundidade, como na piora dos resultados dos procedimentos de reprodução assistida em portadoras de infertilidade relacionada à endometriose leve, o que precisa ser avaliado com metodologias pertinentes.

Futuros estudos, com maior casuística, que analisem possíveis componentes alterados no fluido folicular de mulheres inférteis com endometriose, correlacionem esses dados com os resultados de RA dessas pacientes, dosem diferentes marcadores de estresse oxidativo no FF e proponham a adição de antioxidantes às MIVs, são imprescindíveis para se tentar elucidar potenciais fatores promotores dos danos meióticos oocitários encontrados no presente estudo, em decorrência da adição de FF de mulheres com a doença ao meio de maturação.

Referências Bibliográficas

- ABRIEU, A. et al. Mps1 is a kinetochore-associated kinase essential for the vertebrate mitotic checkpoint. **Cell**, v.106, n.1, Jul 13, p.83-93. 2001.
- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R.K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reprod Biol Endocrinol**, v.3, p.28. 2005.
- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SIKKA, S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. **Curr Opin Obstet Gynecol**, v.18, n.3, Jun, p.325-32. 2006.
- AGARWAL, A.; SALEH, R.A.; BEDAIWY, M.A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertil Steril**, v.79, n.4, Apr, p.829-43. 2003.
- AL-FADHLI, R. et al. Effects of different stages of endometriosis on the outcome of in vitro fertilization. **J Obstet Gynaecol Can**, v.28, n.10, Oct, p.888-91. 2006.
- ANDRADE, A.Z. et al. [Serum markers of oxidative stress in infertile women with endometriosis]. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v.32, n.6, Jun, p.279-85. 2010.
- ANTONIO, C. et al. Xkid, a chromokinesin required for chromosome alignment on the metaphase plate. **Cell**, v.102, n.4, Aug 18, p.425-35. 2000.
- ARMSTRONG, D.T. Effects of maternal age on oocyte developmental competence. **Theriogenology**, v.55, n.6, Apr 1, p.1303-22. 2001.
- ATTARAN, M. et al. The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of in vitro fertilization. **Int J Fertil Womens Med**, v.45, n.5, Sep-Oct, p.314-20. 2000.
- BARCELOS, I.D. et al. Comparative analysis of the spindle and chromosome configurations of in vitro-matured oocytes from patients with endometriosis and from control subjects: a pilot study. **Fertil Steril**, v.92, n.5, Nov, p.1749-52. 2009.
- BARNHART, K.; DUNSMOOR-SU, R.; COUTIFARIS, C. Effect of endometriosis on in vitro fertilization. **Fertil Steril**, v.77, n.6, Jun, p.1148-55. 2002.
- BECKMAN, K.B.; AMES, B.N. The free radical theory of aging matures. **Physiol Rev**, v.78, n.2, Apr, p.547-81. 1998.
- BEDAIWY, M. et al. Differential expression of follicular fluid cytokines: relationship to subsequent pregnancy in IVF cycles. **Reprod Biomed Online**, v.15, n.3, Sep, p.321-5. 2007.
- BELLELIS, P. et al. Epidemiological and clinical aspects of pelvic endometriosis-a case series. **Rev Assoc Med Bras**, v.56, n.4, Jul-Aug, p.467-71. 2010.
- BERBIC, M. et al. Macrophage expression in endometrium of women with and without endometriosis. **Hum Reprod**, v.24, n.2, Feb, p.325-32. 2009.

BERLETT, B.S.; STADTMAN, E.R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. **J Biol Chem**, v.272, n.33, Aug 15, p.20313-6. 1997.

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

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

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

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, Oct, p.1220-31. 2007.

D'HOOGHE, T.M. et al. Endometriosis and subfertility: is the relationship resolved? **Semin Reprod Med**, v.21, n.2, May, p.243-54. 2003.

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

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, Sep-Oct, p.117-24. 2002.

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

FRAGOULI, E. et al. The cytogenetics of polar bodies: insights into female meiosis and the diagnosis of aneuploidy. **Mol Hum Reprod**, Apr 14. 2011.

FUJII, E.Y.; NAKAYAMA, M.; NAKAGAWA, A. Concentrations of receptor for advanced glycation end products, VEGF and CML in plasma, follicular fluid, and peritoneal fluid in women with and without endometriosis. **Reprod Sci**, v.15, n.10, Dec, p.1066-74. 2008.

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, Aug 18, 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, Dec, p.77-89. 1999.

- GARRIDO, N. et al. The endometrium versus embryonic quality in endometriosis-related infertility. **Hum Reprod Update**, v.8, n.1, Jan-Feb, p.95-103. 2002.
- GARRIDO, N. et al. Follicular hormonal environment and embryo quality in women with endometriosis. **Hum Reprod Update**, v.6, n.1, Jan-Feb, p.67-74. 2000.
- GIANAROLI, L. et al. Predicting aneuploidy in human oocytes: key factors which affect the meiotic process. **Hum Reprod**, v.25, n.9, Sep, p.2374-86. 2010.
- GUERIN, P.; EL MOUATASSIM, S.; MENEZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Hum Reprod Update**, v.7, n.2, Mar-Apr, p.175-89. 2001.
- GUPTA, S. et al. Role of oxidative stress in endometriosis. **Reprod Biomed Online**, v.13, n.1, Jul, p.126-34. 2006.
- GUPTA, S. et al. Pathogenic mechanisms in endometriosis-associated infertility. **Fertil Steril**, v.90, n.2, Aug, p.247-57. 2008.
- HOLOCH, K.J.; LESSEY, B.A. Endometriosis and infertility. **Clin Obstet Gynecol**, v.53, n.2, Jun, p.429-38. 2010.
- HU, Y. et al. Effects of low O₂ and ageing on spindles and chromosomes in mouse oocytes from pre-antral follicle culture. **Hum Reprod**, v.16, n.4, Apr, p.737-48. 2001.
- JACKSON, L.W. et al. Oxidative stress and endometriosis. **Hum Reprod**, v.20, n.7, Jul, p.2014-20. 2005.
- JOZWIK, M.; WOLCZYNSKI, S.; SZAMATOWICZ, M. Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans. **Mol Hum Reprod**, v.5, n.5, May, p.409-13. 1999.
- KIM, N.H. et al. Microtubule and microfilament organization in maturing human oocytes. **Hum Reprod**, v.13, n.8, Aug, p.2217-22. 1998.
- KUMBAK, B. et al. In vitro fertilization in normoresponder patients with endometriomas: comparison with basal simple ovarian cysts. **Gynecol Obstet Invest**, v.65, n.3, p.212-6. 2008.
- 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, Aug 15, p.3712-8. 1998.
- LIU, L. et al. Oxidative stress contributes to arsenic-induced telomere attrition, chromosome instability, and apoptosis. **J Biol Chem**, v.278, n.34, Aug 22, 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, Jan, p.48-53. 1994.
- MA, C.H. et al. Effects of tumor necrosis factor-alpha on porcine oocyte meiosis progression, spindle organization, and chromosome alignment. **Fertil Steril**, v.93, n.3, Feb, p.920-6. 2010.
- 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, Jul, 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, Apr 5, p.S17-23. 2004.
- 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, May, p.2079-86. 2009.
- MANSOUR, G. et al. Endometriosis-induced alterations in mouse metaphase II oocyte microtubules and chromosomal alignment: a possible cause of infertility. **Fertil Steril**, v.94, n.5, Oct, p.1894-9. 2010.
- MATORRAS, R. et al. Fertility in women with minimal endometriosis compared with normal women was assessed by means of a donor insemination program in unstimulated cycles. **Am J Obstet Gynecol**, v.203, n.4, Oct, p.345 e1-6. 2010.
- MINICI, F. et al. Endometriosis and human infertility: a new investigation into the role of ectopic endometrium. **Hum Reprod**, v.23, n.3, Mar, p.530-7. 2008.
- MINJAREZ, D.A.; SCHLAFF, W.D. Update on the medical treatment of endometriosis. **Obstet Gynecol Clin North Am**, v.27, n.3, Sep, p.641-51. 2000.
- 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, May, p.1148-54. 2004.
- NAVARRO, P.A. et al. Arsenite induces aberrations in meiosis that can be prevented by coadministration of N-acetylcysteine in mice. **Fertil Steril**, v.85 Suppl 1, Apr, 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, Apr, p.980-5. 2004.
- PASQUALOTTO, E.B. et al. Effect of oxidative stress in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive procedures. **Fertil Steril**, v.81, n.4, Apr, p.973-6. 2004.

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, Jan, p.63-7. 1992.

PELLICER, A. et al. The follicular and endocrine environment in women with endometriosis: local and systemic cytokine production. **Fertil Steril**, v.70, n.3, Sep, p.425-31. 1998.

PELLICER, A. et al. Exploring the mechanism(s) of endometriosis-related infertility: an analysis of embryo development and implantation in assisted reproduction. **Hum Reprod**, v.10 Suppl 2, Dec, p.91-7. 1995.

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, Jun, p.1135-41. 1998.

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

SIGNORILE, P.G.; BALDI, A. Endometriosis: new concepts in the pathogenesis. **Int J Biochem Cell Biol**, v.42, n.6, Jun, p.778-80. 2010.

STADTMAN, E.R. Protein oxidation and aging. **Science**, v.257, n.5074, Aug 28, p.1220-4. 1992.

SUZUKI, T. et al. Impact of ovarian endometrioma on oocytes and pregnancy outcome in in vitro fertilization. **Fertil Steril**, v.83, n.4, Apr, p.908-13. 2005.

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, Apr, p.757-64. 2001.

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, Jan, p.154-60. 1998.

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, Nov, p.1077-81. 2002.

WIENER-MEGNAZI, Z. et al. Oxidative stress indices in follicular fluid as measured by the thermochemiluminescence assay correlate with outcome parameters in in vitro fertilization. **Fertil Steril**, v.82 Suppl 3, Oct, p.1171-6. 2004.

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, Jun, p.257-64. 2005.

Anexos

Anexo 1- Termos de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Fluido Folicular - Grupo CONTROLE)

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

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

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

Assim, a avaliação do efeito do fluido folicular (fluido contido no folículo onde os óvulos se desenvolvem) de mulheres inférteis com endometriose sobre a qualidade dos óvulos e embriões poderia auxiliar a descoberta de alguns dos mecanismos envolvidos na causa da infertilidade, o que ajudaria na identificação de tratamentos futuros. Contudo, para podermos dizer se o efeito do fluido folicular de mulheres inférteis com endometriose é diferente daquele

de mulheres inférteis sem a doença, precisamos de um grupo tido como controle, composto por fluido folicular de mulheres com outra causa de infertilidade, onde você estaria incluída.

Para estudarmos o possível efeito prejudicial do fluido folicular de mulheres com endometriose e compará-lo com o que ocorre em mulheres sem a doença, propomos avaliar o efeito da adição de fluido folicular no cultivo *in vitro* de óvulos e embriões bovinos (de vacas). Assim, para a realização dessa pesquisa, será necessária uma amostra de fluido folicular coletada no dia da captação dos óvulos, sem necessidade de intervenções complementares, já que este é um procedimento padrão, sem riscos adicionais à paciente. O fluido folicular colhido junto com o oócito é normalmente descartado, não tendo utilidade no procedimento de reprodução assistida, de modo que seu uso neste estudo não prejudicará o tratamento, pois os óvulos obtidos serão normalmente utilizados no seu tratamento da infertilidade.

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

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

Fui informada de que, após o isolamento dos óvulos, o fluido folicular é desprezado, uma vez que não apresenta qualquer utilidade para o procedimento de reprodução ao qual serei submetida. Fui informada, também, de que o fluido será utilizado para cultivo de óvulos e embriões bovinos. Desta forma, autorizo a utilização do fluido folicular obtido durante o procedimento de captação dos óvulos, após a identificação e separação dos óvulos pela bióloga

responsável, como realizado na prática do laboratório de reprodução, exclusivamente no presente estudo.

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

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

Ribeirão Preto _____ / _____ / _____

Assinatura- Paciente

Assinatura do Pesquisador

4. PESQUISADORAS RESPONSÁVEIS:

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

Michele Gomes Da Broi

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

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

1. NOME DA PESQUISA: “Avaliação do potencial impacto dos fluidos folicular e peritoneal de pacientes inférteis com endometriose na gênese de anomalias meióticas oocitárias e no desenvolvimento embrionário, utilizando modelo experimental bovino”

2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Prof. Dra. Paula Andrea de A. Salles Navarro

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

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

Desta forma, a avaliação do efeito do fluido folicular (fluido contido no folículo onde os óvulos se desenvolvem) de mulheres inférteis com endometriose sobre a qualidade dos óvulos e embriões poderia auxiliar a descoberta de alguns dos mecanismos envolvidos na causa da infertilidade, o que ajudaria na identificação de tratamentos futuros.

Para estudarmos o possível efeito prejudicial do fluido folicular de mulheres com endometriose e compará-lo com o que ocorre em mulheres sem a doença, propomos avaliar o efeito da adição de fluido folicular no cultivo *in vitro* de óvulos e embriões bovinos (de vacas). Assim, para a realização dessa pesquisa, será necessária uma amostra de fluido

folicular coletada no dia da captação dos óvulos, sem necessidade de intervenções complementares, já que este é um procedimento padrão, sem riscos adicionais à paciente. O fluido folicular colhido junto com o oócito é normalmente descartado, não tendo utilidade no procedimento de reprodução assistida, de modo que seu uso neste estudo não prejudicará o tratamento, pois os óvulos obtidos serão normalmente utilizados no seu tratamento da infertilidade.

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

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

Fui informada de que, após o isolamento dos óvulos, o fluido folicular é desprezado, uma vez que não apresenta qualquer utilidade para o procedimento de reprodução ao qual serei submetida. Fui informada, também, de que o fluido será utilizado para cultivo de óvulos e embriões bovinos. Desta forma, autorizo a utilização do fluido folicular obtido durante o procedimento de captação dos óvulos, após a identificação e separação dos óvulos pela bióloga responsável, como realizado na prática do laboratório de reprodução, exclusivamente no presente estudo.

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

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

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

Ribeirão Preto _____ / _____ / _____

Assinatura- Paciente

Assinatura do Pesquisador

4. PESQUISADORA RESPONSÁVEL:

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

Telefone de contato: 16-3602-2231

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

Michele Gomes Da Broi

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

Telefone de contato: 16-3602-2231

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

Anexo 2- Manuscrito

Follicular fluid from infertile women with mild endometriosis may compromise the meiotic spindle of methaphase II oocytes

Michele Gomes Da Broi^a, Helena Malvezzi^a, Rui Alberto Ferriani^{a,b}, MD, PhD, Claudia Paro de Paz^c, PhD, Paula Andrea Navarro^{a,b*}, MD, PhD.

^a Human Reproduction Division, Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

^b National Institute of Hormones and Woman's Health, CNPq, Brazil

^c Department of Genetics, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

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

***Corresponding author:**

Paula A. Navarro
Avenida Bandeirantes, 3900 - Ribeirão Preto, SP, Brazil.
CEP: 14049-900
Tel.: +55 16 3602 28 21
Fax: +55 16 3633 1028
E-mail: pnavarro@fmrp.usp.br

FINANCIAL SUPPORT

This study received financial support from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

ABSTRACT

Objective: The mechanisms involved in the etiopathogenesis of infertility in patients with endometriosis have not been fully elucidated. Impaired oocyte quality may be involved in lower implantation rates after *in vitro* fertilization in these patients. We question if alterations in the follicular microenvironment of infertile patients with endometriosis might affect oocyte competence acquisition and compromise natural fertility and assisted reproduction treatment outcomes in women with this disease. It is known that to be competent and capable of fertilizing, the oocyte must be mature and have a morphologically functional spindle, which ensure the fidelity of chromosome segregation during meiosis. Thus, this study aimed to evaluate the potential impact of different concentrations of follicular fluid (FF) from infertile women with and without mild endometriosis on spindle integrity, chromosomes alignment and actin microfilaments organization of bovine oocytes *in vitro* matured. **Design:** Experimental study. **Material and Methods:** FF samples were consecutively obtained from 22 infertile patients (11 with mild endometriosis and 11 with tubal or male factors of infertility) submitted to ovarian stimulation for intracytoplasmic sperm injection. Immature bovine oocytes were submitted to *in vitro* maturation (IVM) without FF (control) and with 4 concentrations (1%, 5%, 10%, and 15%) of 2 samples of FF (1 from a woman with endometriosis and one from a woman without endometriosis). We performed 11 IVM and each FF sample was used only once. The oocytes were then fixed, stained by immunofluorescence for morphological visualization of microtubules, chromatin and actin microfilaments, and, then, analyzed by confocal microscopy. **Results:** The percentage of abnormal MII oocytes was significantly higher for those matured with FF from patients with endometriosis (1%: 55.56%, 5%: 63.26%, 10%: 54.54%, 15%: 48.84%) when compared with oocytes matured with FF from patients without endometriosis (1%: 19.15%, 5%: 23.44%,

10%: 25%, 15%: 23.81%) and those matured without FF (23.53%), with no differences among the tested concentrations in each group. **Conclusions:** We can conclude that bovine oocytes matured *in vitro* in the presence of FF from infertile women with mild endometriosis have higher frequency of meiotic abnormalities. These data suggest that FF from women with endometriosis may compromise oocyte quality by promoting spindle and/or chromosomal damage.

Key words: mild endometriosis; female infertility; *in vitro* maturation; follicular fluid; meiotic spindle, oocyte quality.

Support: CNPq, Brasil

INTRODUÇÃO

A endometriose é caracterizada por implante e crescimento de tecido endometrial (glândulas e/ou estroma) fora da cavidade uterina (1). Esta doença possui alta prevalência, chegando a acometer de 6 a 10% da população feminina geral (2). Além disso, é freqüentemente associada à infertilidade, sendo que 30 a 50% das suas portadoras são inférteis (2). Entretanto, os exatos mecanismos envolvidos na etiopatogênese da infertilidade associada à endometriose, principalmente nos casos de endometriose mínima (estágio I) e leve (estágio II), em que não se observa alteração mecânica do trato reprodutivo, ainda não foram precisamente elucidados (3).

A literatura apresenta dados contraditórios acerca dos resultados da fertilização *in vitro* (FIV) em pacientes com endometriose, o que vem sendo foco de diversos estudos e hipóteses nos últimos anos (4-6). Trabalhos sugerem a ocorrência de menores taxas de fertilização, implantação e de gestação em portadoras dessa afecção (7-8), o que poderia ser decorrente do comprometimento da qualidade oocitária e, conseqüentemente, embrionária e/ou de defeitos endometriais ou da interação entre o endométrio e o embrião (6, 9-10). Entretanto, o achado de taxas de implantação em pacientes com endometriose semelhantes às do grupo controle em ciclos de doação de oócitos, reforça o papel crucial da qualidade embrionária no comprometimento da implantação verificado neste grupo de pacientes (4, 11-12).

A infertilidade apresentada por pacientes com as formas moderada e grave de endometriose (estágios III e IV, respectivamente) poderia ser explicada pela presença de alterações anatômicas, como adesões pélvicas ou peritubárias que perturbariam a comunicação entre ovário e tuba uterina e, assim, prejudicariam a liberação, captação ou transporte do óvulo (2). Entretanto, há crescentes evidências de que lesões sutis, ou mesmo

implantes endometrióticos iniciais poderiam contribuir com a infertilidade nos estágios I e II, apesar da ausência de danos anatômicos pélvicos. (3, 13).

Diferentes estudos apontam à existência de alterações nos níveis de constituintes dos fluidos peritoneal (14-17) e folicular (18-21) de pacientes com endometriose, o que poderia ter efeitos adversos nos processos reprodutivos (22). Segundo Mansour et al (2009), o fluido peritoneal de mulheres com a doença promove anomalias meióticas oocitárias e apoptose embrionária, tendo sido encontrada maior frequência de fuso meiótico anormal e cromossomos desalinhados em oócitos incubados com fluido peritoneal de pacientes com endometriose (16-17). Sendo o ambiente folicular extremamente importante para o processo de maturação oocitária, possíveis alterações nos componentes do fluido folicular podem ter influência sobre a maturidade e qualidade a oocitárias e, assim, afetar a fertilização, o desenvolvimento embrionário inicial e as taxas de gestação (23).

O fuso meiótico de oócitos humanos em metáfase II (MII) é uma estrutura temporária e dinâmica, associada ao córtex oocitário e sua rede de microfilamentos subcorticais (24-26), sendo essencial para garantir a fidelidade da segregação cromossômica durante a meiose (27-29). Além disso, é extremamente sensível à ação de diversos fatores (30-32), que podem promover anomalias meióticas, instabilidade cromossômica, aumento da apoptose e comprometimento do desenvolvimento embrionário pré-implantação (33-35). Assim, danos estruturais do fuso meiótico poderiam estar relacionados com possível piora da qualidade oocitária de pacientes com endometriose.

Não se encontrou nenhum estudo que tenha avaliado o efeito do fluido folicular de mulheres inférteis com estágios iniciais de endometriose sobre a integridade do fuso, os microfilamentos de actina e a distribuição cromossômica oocitários. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial impacto de diferentes concentrações de fluido folicular de

mulheres inférteis com e sem endometriose leve sobre a gênese de anomalias meióticas oocitárias, durante maturação *in vitro* (MIV), utilizando modelo experimental bovino.

METODOLOGIA

Realizou-se um estudo prospectivo de fevereiro de 2009 a fevereiro de 2011 junto ao Setor de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP-USP. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP) e pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP). As pacientes que preencheram os critérios de inclusão e manifestaram o desejo de participar do projeto assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido previamente à inclusão no estudo.

No grupo endometriose, foram selecionadas pacientes com infertilidade associada à endometriose diagnosticada e classificada por videolaparoscopia (segundo os critérios da American Society for Reproductive Medicine, 1997), com estadiamento da doença definido como grau II (endometriose leve). No grupo controle, incluíram-se pacientes apenas com infertilidade por fator masculino e/ou tubário. Todas as pacientes do grupo controle foram submetidas à videolaparoscopia diagnóstica como procedimento de rotina para investigação da infertilidade conjugal, sendo excluída a presença de endometriose.

Foram critérios de exclusão: idade maior ou igual a 38 anos, índice de massa corporal (IMC) maior que 30 Kg/m², nível sérico de hormônio folículo estimulante (FSH) no terceiro dia do ciclo menstrual maior ou igual a 10mUI/ml, anovulação crônica, presença de hidrossalpinge e doenças crônicas como *diabetes mellitus* ou outras endocrinopatias, doença cardiovascular, dislipidemia, lúpus eritematoso sistêmico e outras doenças reumatológicas, infecção pelo vírus

HIV, qualquer infecção ativa, tabagismo, uso constante de medicações hormonais e de antiinflamatórios hormonais e não-hormonais nos seis meses anteriores à inclusão no estudo.

Protocolo de estimulação ovariana controlada

O bloqueio hipofisário foi iniciado usando análogo do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRHa) 10 dias antes do dia de realização da USTV basal (protocolo longo), por meio da administração de acetato de leuprolide (Lupron®, Abott, Brasil). As pacientes receberam 150 a 300 UI por dia de FSH recombinante (FSHr) (Gonal-F®, Serono, Brasil; Puregon®, Organon, Brasil), nos primeiros 6 dias da indução. Quando pelo menos dois folículos atingiram 18 mm de diâmetro médio, foi administrada gonadotrofina coriônica humana (hCG) recombinante (Ovidrel®, Serono, Brasil). A captação dos oócitos foi realizada 34 a 36h após a administração do hCG recombinante.

Coleta e processamento das amostras de fluido folicular

Para a coleta de fluido folicular, utilizaram-se tubos estéreis, individuais, aquecidos a 37°C, sem meio de cultura. Foi aspirado individualmente todo o conteúdo do primeiro folículo com diâmetro médio ≥ 15 mm do primeiro ovário puncionado de cada paciente. Apenas os fluidos foliculares livres de contaminação sanguínea à inspeção visual e que apresentaram células da granulosa (CG) ou células da granulosa e um oócito maduro foram processados para dosagem dos marcadores de estresse oxidativo. As amostras de fluido foram centrifugadas a 1500 rpm por 7 minutos e armazenadas a - 80°C, em duas alíquotas, para posterior análise.

Coleta dos complexos cumulus-oócito de bovinos

Os ovários, provenientes de vacas abatidas em frigorífico, foram imediatamente transportados ao laboratório, mantidos em solução fisiológica (0,9% NaCl) acrescida de 0,05

g/L de sulfato de estreptomicina, a uma temperatura de 35-38,5°C. Posteriormente, foram borrifados com álcool 70% e lavados em solução fisiológica pré-aquecida 38,5°C e mantidos nesta mesma solução, em banho-maria, até o final da aspiração. Os complexos *cumulus*-oócito (COCs) imaturos foram aspirados de folículos de 2 a 8 mm de diâmetro, utilizando-se agulhas 25 x 7 acopladas a seringas de 20ml e, então, selecionados sob estereomicroscópio, em placas de Petri de 100 mm contendo o meio de lavagem Talp Hapes. Para o cultivo *in vitro*, somente os COCs morfologicamente saudáveis foram selecionados, ou seja, aqueles com citoplasma homogêneo e, pelo menos, três camadas de células do *cumulus-oophorus*.

Maturação in vitro

Utilizou-se o meio de maturação padrão TCM-199 com sais Earle e bicarbonato (Invitrogen, Gibco Laboratories Life Technologies Inc., Grand Island, NY), suplementado com 0,2 µM de piruvato, 100 UI/ml de Penicilina, 0,1 mg/ml de Estreptomicina, 0,5 µg/ml de FSH, 5,0 µg/ml de LH e 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (36).

A fim de manter a concentração adequada de suplementação após a adição de fluido folicular, eliminando-se, assim, o efeito da diluição dos suplementos, optou-se por preparar um TCM 15% mais concentrado, ao qual, de acordo com cada diluição, foi adicionado fluido folicular e/ou meio TCM filtrado não suplementado.

Imediatamente após a seleção, os COCs foram randomicamente divididos em 9 grupos: 1) COCs cultivados em meio padrão (sem suplementação de fluido folicular); 2) COCs cultivados em meio padrão + fluido folicular de mulheres com endometriose leve nas concentrações 15%, 10%, 5% e 1%; 3) COCs cultivados em meio padrão + fluido folicular das pacientes controle nas concentrações 15%, 10%, 5% e 1%. O cultivo foi feito em placas *Nunc* de 24 poços, em um volume total de 200 µl de meio ou meio acrescido de fluido folicular, sem óleo mineral, a 38,5°C, 95% de umidade, 5% de CO₂ em ar, por um período de

22 a 24 horas. Após a maturação, os oócitos foram desnudados por agitação mecânica, em meio tamponado Talp Hapes.

Fixação dos oócitos

Ocorrido o desnudamento, os oócitos foram colocados em solução fixadora MTSB XF, composta por 1X de Tampão Estabilizador (0,1M de Pipes, 5mM de MgCl₂ e 2,5mM de EGTA), 50% de Óxido de Deutério, 0,01% de Aprotinina de pulmão bovino, 1 mM de DTT, 1 µM de Taxol, 0,5% de Triton-X, 2% de Formaldeído e água de MilliQ, aquecida previamente por 30 minutos em estufa a 37°C, permanecendo nesta solução a 4°C até o processamento da imunofluorescência e confecção das lâminas.

Imunofluorescência

Os oócitos previamente fixados foram lavados em solução tampão composta por 0,02% de NaN₃, 0,01% de Triton-X, 0,2% de leite desnatado, 2% de Soro Normal de Cabra, 0,1M de Glicina, 2% de BSA(V) e tampão PBS, onde permaneceram a 4°C *overnight*. Passado esse período, foram novamente lavados em solução tampão e incubados *overnight*, a 4°C, com o anticorpo primário anti-β-tubulina de camundongo (diluição 1:1000). Após nova lavagem em solução tampão, foram incubados com o anticorpo secundário imunoglobulina de cabra anti-camundongo conjugada com Fluoresceína isotiocianato (FITC) (Zymed Laboratories, Invitrogen Corporation, Calsbad, CA, USA, diluição 1:500) por 2 horas a 37°C. Depois de lavadas, as amostras foram marcadas para os filamentos de actina com faloidina conjugada a rodamina (1:1000), lavadas novamente e, então, os cromossomos foram marcados com Hoechst 33342 (10 µg/ml), em meio de montagem composto por 50% de glicerol e 25 mg/ml de NaN₃, durante 10 minutos, à temperatura ambiente e montados entre lâmina e lamínula.

As lâminas foram estocadas a 4°C até observação em Microscópio Confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Mannheim, Germany), sendo 7 dias o intervalo máximo entre a confecção e a leitura das mesmas.

Avaliação dos oócitos

Os oócitos visualizados foram, primeiramente, classificados quanto à fase da divisão meiótica em que se encontravam: metáfase I (MI), anáfase I (AI), telófase I (TI) ou metáfase II (MII). Posteriormente, aqueles em MII foram classificados quanto à posição de visualização do fuso meiótico, sendo considerados fusos analisáveis apenas aqueles em visão sagital, permitindo avaliação global de fuso, cromossomos e microfilamentos de actina (Figura 1A e B). Aqueles em visão polar foram considerados não analisáveis devido à impossibilidade de avaliação dos microtúbulos, tendo apenas os cromossomos e microfilamentos de actina analisados (Figura 1C e D). Os oócitos considerados analisáveis foram avaliados quanto à integridade do fuso (microtúbulos), alinhamento e condensação dos cromossomos e organização dos microfilamentos de actina, enquanto os não analisáveis foram avaliados apenas quanto ao alinhamento e condensação dos cromossomos e organização dos microfilamentos de actina.

Considerou-se o fuso como normal quando em forma de barril, com pólos definidos e tamanho normal. Os cromossomos foram considerados normais quando alinhados na placa metafásica. Os microfilamentos de actina foram considerados normais quando distribuídos homogeneamente no citoplasma oocitário (Figura 1). Fuso, cromossomos e actina com características diferentes das acima citadas foram considerados anormais (Figura 2).

Os fluidos foliculares utilizados nas maturações *in vitro* foram provenientes de 22 pacientes inférteis, sendo 11 com endometriose leve e 11 com fator masculino e/ou tubário.

Análise estatística

As análises foram realizadas pelo procedimento GENMOD do programa estatístico SAS 2003 (2002-2003, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Para comparação inter e intra-grupos das variáveis de contagem (oócitos em MI, TI e MII, actina normal) considerou-se a Distribuição de Poisson.

Para comparação inter e intra-grupos das variáveis de porcentagem (proporção de fuso normal e cromossomos alinhados, fuso normal e cromossomos desalinhados, fuso anormal e cromossomos desalinhados, fuso anormal e cromossomos alinhados, cromossomos alinhados, cromossomos desalinhados, total de normais e total de anormais) utilizou-se a Distribuição Gama.

Foi considerado significativo $p < 0,05$.

RESULTADOS

Os resultados obtidos são apresentados nas tabelas 1 e 2.

Um total de 1324 complexos cummulus-oócito (COC) foram maturados *in vitro*, randomicamente divididos entre os 9 grupos (TCM-199 puro, FF controle e FF endometriose nas concentrações 1%, 5%, 10% e 15%). Deste total, 1128 foram fixados e 1038 visualizados em microscopia confocal. Um total de 921 oócitos foram classificados em MII, sendo 466 considerados com fuso analisável (visão sagital) e 455 com fuso não-analisável (visão polar, apenas avaliação de cromossomos e actina).

Não houve diferença significativa para nenhuma das variáveis analisadas quando comparadas as concentrações de fluido folicular de mulheres com endometriose entre si. Da mesma forma, não se encontrou diferença significativa para nenhuma das variáveis analisadas quando comparadas as concentrações de fluido folicular de pacientes controles entre si (Tabelas 1 e 2).

Com relação ao estágio de maturação, não foi observada diferença significativa no total de oócitos em TI, MI e MII entre os grupos endometriose, controle e sem fluido, bem como, não houve diferença significativa entre os grupos quanto à porcentagem de oócitos normais nos estágios MI e TI (Tabela 1).

Não se encontrou oócitos em AI em nenhum dos grupos estudados.

Daqueles em estágio de MII, quando considerados apenas os oócitos MII analisáveis (visão sagital), foi encontrado maior percentual de anormalidades meióticas (fuso anormal + cromossomos alinhados, fuso anormal + cromossomos desalinhados, fuso normal + cromossomos desalinhados) nos oócitos maturados em meio padrão acrescido de fluido folicular de mulheres com endometriose leve quando comparados aos maturados em meio padrão acrescido de fluido folicular de mulheres controle e àqueles maturados sem adição de fluido ($p < 0,01$).

Não foi encontrada diferença significativa na distribuição cromossômica normal de oócitos em visão polar entre nenhum dos grupos estudados (Tabela 2). A análise das anormalidades dos oócitos em visão polar (CD) não convergiu devido ao pequeno número de ocorrências.

Quando considerados conjuntamente os oócitos analisáveis e não analisáveis (em visão sagital e visão polar, respectivamente), não houve diferença significativa nas porcentagens de normalidade (fuso normal + cromossomos alinhados e cromossomos alinhados) entre os grupos endometriose, controle e sem fluido (Tabela 2).

Não foi encontrada diferença significativa para a organização dos microfilamentos de actina entre os grupos.

DISCUSSÃO

Embora haja trabalhos reportando o efeito do fluido peritoneal de mulheres com endometriose sobre a qualidade oocitária (16-17) e diferenças nos níveis de componentes em soro (21, 37-38), fluido folicular (4, 37, 39-42) ou fluido peritoneal (2, 14, 43-44) de pacientes com a doença, não se encontrou nenhum estudo que tenha avaliado o efeito do fluido folicular de mulheres inférteis com endometriose sobre fuso e cromossomos oocitários. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial impacto de diferentes concentrações de fluido folicular de mulheres inférteis com e sem endometriose sobre a gênese de anomalias meióticas oocitárias, durante maturação *in vitro* (MIV), utilizando modelo experimental bovino. Diante da inconsistência dos dados relacionando endometriose mínima e infertilidade (3, 45), o presente estudo restringiu-se a apenas avaliar o efeito do fluido folicular de mulheres com endometriose leve sobre qualidade oocitária.

É importante salientar que, idealmente, para correlacionar a presença de anormalidades meióticas oocitárias com o ambiente folicular na endometriose, o fuso celular e a distribuição cromossômica deveriam ser analisados em oócitos humanos maturados *in vivo* (46). Entretanto, diante da baixa quantidade de oócitos captados em MII, do número reduzido de oócitos humanos destinados à pesquisa, e, sendo a análise por imunofluorescência um método invasivo, que necessita de fixação da amostra, a utilização de modelo animal tornou-se importante alternativa neste estudo. O uso de oócitos bovinos pode ser justificado pela similaridade no tamanho e morfologia dos ovários humanos e bovinos, por ambas as espécies serem monovulatórias e policíclicas e por ser um material abundante, barato, de fácil manipulação (47). Sabe-se, também, que a maturação *in vitro*, por si só, pode promover aumento significativo da ocorrência de anormalidades meióticas oocitárias (46). Todavia, a mesma metodologia de MIV foi aplicada para os três diferentes grupos, de modo que as diferenças encontradas provavelmente são decorrentes de diferenças nos constituintes do

fluido folicular (obtidos das mulheres inférteis com endometriose leve e controles: fatores masculino e/ou tubário) e não devido ao processo de maturação *in vitro*.

De acordo com os resultados obtidos, não foi observada diferença significativa no número de oócitos em estágio de MI e MII entre os grupos, o que demonstra não haver comprometimento da maturação nuclear dos oócitos cultivados com adição de FF de mulheres com endometriose leve. Estes achados discordam de outro estudo anteriormente realizado no mesmo serviço de RA, que avaliou maturação, integridade do fuso meiótico e distribuição cromossômica de oócitos de mulheres inférteis com endometriose e controles maturados *in vitro* e encontrou uma tendência a maior proporção de oócitos em telófase I no grupo endometriose, apesar de não ter evidenciado anomalias meióticas, sugerindo possível retardo no processo de meiose I (46). Entretanto, Barcelos et al (2009) não analisaram separadamente os diferentes estágios de endometriose. No referido estudo foram incluídos na análise oócitos maturados *in vitro* oriundos de ciclos estimulados de mulheres inférteis com endometriose mínima, leve, moderada e grave, de modo que a severidade da doença pode ter sido responsável pelo atraso na maturação, o que explicaria esta divergência.

Quando avaliada a estrutura de divisão celular de oócitos em MII com visão sagital, observou-se maior frequência de anormalidades meióticas entre aqueles maturados com FF de pacientes com endometriose leve quando comparados aos maturados com FF de mulheres sem a doença ou em meio de cultivo padrão apenas. A hipótese de que a qualidade oocitária pode ser prejudicada em mulheres com endometriose não é nova, mas não há um consenso geral a respeito. De acordo com Gianaroli et al (2010), o tipo de infertilidade tem efeito significativo sobre erros meióticos oocitários, sendo estes com maior incidência na presença de endometriose ou fator ovulatório (48), o que foi confirmado pelo presente estudo com relação à endometriose. Um estudo de Mansour et al (2009) demonstrou que o fluido peritoneal de mulheres com endometriose pode promover anomalias nos microtúbulos e

cromossomos de oócitos de camundongos maturados *in vivo*, as quais foram reduzidas após suplementação do meio de cultivo com o antioxidante *L-carnitina*, sugerindo que componentes presentes no fluido peritoneal de portadoras desta doença promoveriam comprometimento da qualidade oocitária e embrionária, tendo o estresse oxidativo como provável mediador. Recentemente, o mesmo grupo publicou novo trabalho avaliando o efeito do FP de mulheres com endometriose sobre o citoesqueleto de oócitos de camundongos em MII, sendo novamente encontrada uma maior frequência de fuso meiótico anormal e cromossomos desalinhados em oócitos incubados com fluido destas pacientes quando comparadas a controles (17). Como o oócito permanece no microambiente folicular durante o processo de maturação, em íntima relação com o fluido folicular e mantém contato com FP após a ovulação e durante o trajeto inicial pela tuba uterina (23), os efeitos destes dois microambientes poderiam se somar e promover possível efeito cumulativo sobre a estrutura de divisão meiótica. Assim, os achados do presente estudo corroboram os de Mansour et al (2009, 2010) e agregam mais evidências à literatura acerca do potencial efeito deletério destes dois microambientes reprodutivos de mulheres inférteis com endometriose sobre a gênese de anomalias meióticas oocitárias, contribuindo para o entendimento de mais um possível mecanismo da infertilidade relacionada à endometriose. Por outro lado, os resultados do presente estudo contrariam os obtidos por Barcelos et al (2009), os quais não demonstraram diferenças significativas na frequência de anormalidades meióticas entre oócitos em MII de pacientes com endometriose *versus* controles. Porém, estes autores utilizaram oócitos humanos maturados *in vitro*, oriundos de ciclos estimulados de mulheres inférteis com diferentes estágios de endometriose, incluindo uma pequena casuística, não sendo passível extrapolarmos os dados obtidos em virtude destas diferenças metodológicas e potenciais vieses.

É importante salientar que os efeitos deletérios sobre a estrutura de divisão meiótica oocitária encontrados foram promovidos diante da incubação com fluidos foliculares apenas de pacientes com endometriose leve, indicando haver possível relação entre este estágio da doença e infertilidade, de modo que estes achados poderiam justificar os piores resultados de RA em portadoras da doença, como consequência de comprometimento da aquisição de competência e, assim, piora da qualidade oocitárias. Dessa forma, o presente estudo corrobora a hipótese de D'Hooghe et al (2003), que afirma haver evidências de uma relação causal entre a presença de endometriose nas formas leves e a ocorrência de subfertilidade nas suas portadoras (13).

Sendo o fuso celular essencial para garantir a fidelidade da segregação cromossômica durante a meiose (27-29) e podendo as anomalias meióticas contribuir para a inabilidade do oócito em completar a maturação tornando-se incapaz de ser fertilizado, assim como, para a ocorrência de erros que não impossibilitem a fertilização, mas comprometam o desenvolvimento embrionário pré e/ou pós-implantação ou a viabilidade futura do concepto (49-51), as anormalidades meióticas encontradas neste estudo podem ser a explicação para os relatados piores resultados de RA em pacientes com a doença (7-8).

O fato de não ter se encontrado diferença significativa para a frequência de distribuição cromossômica normal quando avaliados os oócitos em MII com visão polar pode ser explicado pela impossibilidade de análise fidedigna do fuso e cromossomos nesta posição. Como não se encontrou diferença para porcentagem de normalidade quando avaliados conjuntamente os oócitos em visão polar e sagital, apenas havendo diferença significativa desta variável para os oócitos em visão sagital, sugere-se que a posição do fuso seja extremamente importante para a avaliação da divisão celular, de modo que a visão polar parece mascarar os danos aos microtúbulos e/ou cromossomos possivelmente observados em visão sagital.

Com relação às concentrações de fluido folicular testadas, não foi observada diferença significativa na frequência de anormalidade do fuso em MII entre 1%, 5%, 10% e 15% de fluido folicular no grupo endometriose, assim como, no grupo controle, evidenciando que as concentrações não interferiram nos resultados e podendo-se inferir que 1% de FF de pacientes com endometriose é a menor concentração testada capaz de promover dano meiótico e, possivelmente, comprometer a qualidade oocitária em mulheres com endometriose leve.

CONCLUSÕES

A adição de fluido folicular de mulheres inférteis com endometriose leve submetidas à estimulação da ovulação, nas quatro concentrações utilizadas, não promoveu atraso ou bloqueio no processo de maturação oocitária em modelo experimental bovino.

Observou-se haver um efeito deletério do fluido folicular de mulheres inférteis com endometriose leve sobre o fuso meiótico e a distribuição cromossômica de oócitos bovinos em MII, submetidos à MIV na presença de FF. Não se observou diferença significativa nas frequências de anomalias meióticas encontradas nas quatro concentrações de fluido folicular (1%, 5%, 10% e 15%) adicionadas ao meio de cultivo padrão, de modo que o efeito não foi dependente da concentração utilizada. Assim, 1% de fluido folicular apresentou-se como a menor concentração testada capaz de promover aumento significativo na frequência de danos meióticos oocitários.

O fluido folicular de mulheres inférteis com endometriose leve submetidas à estimulação ovariana, adicionado ao meio de maturação *in vitro* de oócitos bovinos, é capaz de promover anomalias meióticas, o que pode ocasionar potencial piora da qualidade oocitária. Sugerimos que este mecanismo possa estar envolvido tanto na redução da fecundidade, como na piora dos resultados dos procedimentos de reprodução assistida em

portadoras de infertilidade relacionada à endometriose leve, o que precisa ser avaliado com metodologias pertinentes.

Futuros estudos, com maior casuística, que analisem possíveis componentes alterados no fluido folicular de mulheres inférteis com endometriose, correlacionem esses dados com os resultados de RA dessas pacientes, dosem diferentes marcadores de estresse oxidativo no FF e proponham a adição de antioxidantes às MIVs, são imprescindíveis para se tentar elucidar potenciais fatores promotores dos danos meióticos oocitários encontrados no presente estudo, em decorrência da adição de FF de mulheres com a doença ao meio de maturação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gupta S, Agarwal A, Krajcir N, Alvarez JG. Role of oxidative stress in endometriosis. *Reprod Biomed Online*. 2006 Jul;13(1):126-34.
2. Bulletti C, Coccia ME, Battistoni S, Borini A. Endometriosis and infertility. *J Assist Reprod Genet*. 2010 Aug;27(8):441-7.
3. Holoch KJ, Lessey BA. Endometriosis and infertility. *Clin Obstet Gynecol*. 2010 Jun;53(2):429-38.
4. Garrido N, Navarro J, Remohi J, Simon C, Pellicer A. Follicular hormonal environment and embryo quality in women with endometriosis. *Hum Reprod Update*. 2000 Jan-Feb;6(1):67-74.
5. Garcia-Velasco JA, Arici A. Is the endometrium or oocyte/embryo affected in endometriosis? *Hum Reprod*. 1999 Dec;14 Suppl 2:77-89.
6. Kumbak B, Kahraman S, Karlikaya G, Lacin S, Guney A. In vitro fertilization in normoresponder patients with endometriomas: comparison with basal simple ovarian cysts. *Gynecol Obstet Invest*. 2008;65(3):212-6.
7. Barnhart K, Dunsmoor-Su R, Coutifaris C. Effect of endometriosis on in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2002 Jun;77(6):1148-55.
8. Al-Fadhli R, Kelly SM, Tulandi T, Tanr SL. Effects of different stages of endometriosis on the outcome of in vitro fertilization. *J Obstet Gynaecol Can*. 2006 Oct;28(10):888-91.
9. Brizek CL, Schlaff S, Pellegrini VA, Frank JB, Worrilow KC. Increased incidence of aberrant morphological phenotypes in human embryogenesis--an association with endometriosis. *J Assist Reprod Genet*. 1995 Feb;12(2):106-12.
10. Pellicer A, Oliveira N, Ruiz A, Remohi J, Simon C. Exploring the mechanism(s) of endometriosis-related infertility: an analysis of embryo development and implantation in assisted reproduction. *Hum Reprod*. 1995 Dec;10 Suppl 2:91-7.
11. Pellicer A, Navarro J, Bosch E, Garrido N, Garcia-Velasco JA, Remohi J, et al. Endometrial quality in infertile women with endometriosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2001 Sep;943:122-30.
12. Katsoff B, Check JH, Davies E, Wilson C. Evaluation of the effect of endometriosis on oocyte quality and endometrial environment by comparison of donor and recipient

outcomes following embryo transfer in a shared oocyte program. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2006;33(4):201-2.

13. D'Hooghe TM, Debrock S, Hill JA, Meuleman C. Endometriosis and subfertility: is the relationship resolved? *Semin Reprod Med*. 2003 May;21(2):243-54.

14. Gupta S, Goldberg JM, Aziz N, Goldberg E, Krajcir N, Agarwal A. Pathogenic mechanisms in endometriosis-associated infertility. *Fertil Steril*. 2008 Aug;90(2):247-57.

15. Berbic M, Schulke L, Markham R, Tokushige N, Russell P, Fraser IS. Macrophage expression in endometrium of women with and without endometriosis. *Hum Reprod*. 2009 Feb;24(2):325-32.

16. Mansour G, Abdelrazik H, Sharma RK, Radwan E, Falcone T, Agarwal A. L-carnitine supplementation reduces oocyte cytoskeleton damage and embryo apoptosis induced by incubation in peritoneal fluid from patients with endometriosis. *Fertil Steril*. 2009 May;91(5 Suppl):2079-86.

17. Mansour G, Sharma RK, Agarwal A, Falcone T. Endometriosis-induced alterations in mouse metaphase II oocyte microtubules and chromosomal alignment: a possible cause of infertility. *Fertil Steril*. 2010 Oct;94(5):1894-9.

18. Pellicer A, Albert C, Mercader A, Bonilla-Musoles F, Remohi J, Simon C. The follicular and endocrine environment in women with endometriosis: local and systemic cytokine production. *Fertil Steril*. 1998 Sep;70(3):425-31.

19. Pellicer A, Valbuena D, Bauset C, Albert C, Bonilla-Musoles F, Remohi J, et al. The follicular endocrine environment in stimulated cycles of women with endometriosis: steroid levels and embryo quality. *Fertil Steril*. 1998 Jun;69(6):1135-41.

20. Jozwik M, Wolczynski S, Szamatowicz M. Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans. *Mol Hum Reprod*. 1999 May;5(5):409-13.

21. Andrade AZ, Rodrigues JK, Dib LA, Romao GS, Ferriani RA, Jordao Junior AA, et al. [Serum markers of oxidative stress in infertile women with endometriosis]. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2010 Jun;32(6):279-85.

22. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol*. 2005;3:28.

23. Ma CH, Yan LY, Qiao J, Sha W, Li L, Chen Y, et al. Effects of tumor necrosis factor- α on porcine oocyte meiosis progression, spindle organization, and chromosome alignment. *Fertil Steril*. 2010 Feb;93(3):920-6.

24. Kim NH, Chung HM, Cha KY, Chung KS. Microtubule and microfilament organization in maturing human oocytes. *Hum Reprod*. 1998 Aug;13(8):2217-22.

25. Wang WH, Keefe DL. Prediction of chromosome misalignment among in vitro matured human oocytes by spindle imaging with the PolScope. *Fertil Steril*. 2002 Nov;78(5):1077-81.

26. Mandelbaum J, Anastasiou O, Levy R, Guerin JF, de Larouziere V, Antoine JM. Effects of cryopreservation on the meiotic spindle of human oocytes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2004 Apr 5;113 Suppl 1:S17-23.

27. De Santis L, Cino I, Rabellotti E, Calzi F, Persico P, Borini A, et al. Polar body morphology and spindle imaging as predictors of oocyte quality. *Reprod Biomed Online*. 2005 Jul;11(1):36-42.

28. Volarcik K, Sheean L, Goldfarb J, Woods L, Abdul-Karim FW, Hunt P. 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*. 1998 Jan;13(1):154-60.

29. 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*. 2001 Apr;16(4):757-64.

30. Hu Y, Betzendahl I, Cortvrindt R, Smits J, Eichenlaub-Ritter U. Effects of low O₂ and ageing on spindles and chromosomes in mouse oocytes from pre-antral follicle culture. *Hum Reprod.* 2001 Apr;16(4):737-48.
31. Eichenlaub-Ritter U, Shen Y, Tinneberg HR. Manipulation of the oocyte: possible damage to the spindle apparatus. *Reprod Biomed Online.* 2002 Sep-Oct;5(2):117-24.
32. Mullen SF, Agca Y, Broermann DC, Jenkins CL, Johnson CA, Critser JK. The effect of osmotic stress on the metaphase II spindle of human oocytes, and the relevance to cryopreservation. *Hum Reprod.* 2004 May;19(5):1148-54.
33. Liu L, Trimarchi JR, Navarro P, Blasco MA, Keefe DL. Oxidative stress contributes to arsenic-induced telomere attrition, chromosome instability, and apoptosis. *J Biol Chem.* 2003 Aug 22;278(34):31998-2004.
34. Navarro PA, Liu L, Keefe DL. In vivo effects of arsenite on meiosis, preimplantation development, and apoptosis in the mouse. *Biol Reprod.* 2004 Apr;70(4):980-5.
35. Navarro PA, Liu L, Ferriani RA, Keefe DL. Arsenite induces aberrations in meiosis that can be prevented by coadministration of N-acetylcysteine in mice. *Fertil Steril.* 2006 Apr;85 Suppl 1:1187-94.
36. Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Ferriani RA, Navarro PA. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I reversibly arrests meiosis without increasing meiotic abnormalities after in vitro maturation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2009 Jul;145(1):76-80.
37. Campos Petean C, Ferriani RA, dos Reis RM, de Moura MD, Jordao AA, Jr., Navarro PA. Lipid peroxidation and vitamin E in serum and follicular fluid of infertile women with peritoneal endometriosis submitted to controlled ovarian hyperstimulation: a pilot study. *Fertil Steril.* 2008 Dec;90(6):2080-5.
38. Jackson LW, Schisterman EF, Dey-Rao R, Browne R, Armstrong D. Oxidative stress and endometriosis. *Hum Reprod.* 2005 Jul;20(7):2014-20.
39. Attaran M, Pasqualotto E, Falcone T, Goldberg JM, Miller KF, Agarwal A, et al. The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of in vitro fertilization. *Int J Fertil Womens Med.* 2000 Sep-Oct;45(5):314-20.
40. Bedaiwy M, Shahin AY, AbulHassan AM, Goldberg JM, Sharma RK, Agarwal A, et al. Differential expression of follicular fluid cytokines: relationship to subsequent pregnancy in IVF cycles. *Reprod Biomed Online.* 2007 Sep;15(3):321-5.
41. Pasqualotto EB, Agarwal A, Sharma RK, Izzo VM, Pinotti JA, Joshi NJ, et al. Effect of oxidative stress in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive procedures. *Fertil Steril.* 2004 Apr;81(4):973-6.
42. Wiener-Megnazi Z, Vardi L, Lissak A, Shnizer S, Reznick AZ, Ishai D, et al. Oxidative stress indices in follicular fluid as measured by the thermochemiluminescence assay correlate with outcome parameters in in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2004 Oct;82 Suppl 3:1171-6.
43. Fujii EY, Nakayama M, Nakagawa A. Concentrations of receptor for advanced glycation end products, VEGF and CML in plasma, follicular fluid, and peritoneal fluid in women with and without endometriosis. *Reprod Sci.* 2008 Dec;15(10):1066-74.
44. Minici F, Tiberi F, Tropea A, Orlando M, Gangale MF, Romani F, et al. Endometriosis and human infertility: a new investigation into the role of eutopic endometrium. *Hum Reprod.* 2008 Mar;23(3):530-7.
45. Matorras R, Corcostegui B, Esteban J, Ramon O, Prieto B, Exposito A, et al. Fertility in women with minimal endometriosis compared with normal women was assessed by means of a donor insemination program in unstimulated cycles. *Am J Obstet Gynecol.* 2010 Oct;203(4):345 e1-6.

46. Barcelos ID, Vieira RC, Ferreira EM, Martins WP, Ferriani RA, Navarro PA. Comparative analysis of the spindle and chromosome configurations of in vitro-matured oocytes from patients with endometriosis and from control subjects: a pilot study. *Fertil Steril*. 2009 Nov;92(5):1749-52.
47. Malhi PS, Adams GP, Singh J. Bovine model for the study of reproductive aging in women: follicular, luteal, and endocrine characteristics. *Biol Reprod*. 2005 Jul;73(1):45-53.
48. Gianaroli L, Magli MC, Cavallini G, Crippa A, Capoti A, Resta S, et al. Predicting aneuploidy in human oocytes: key factors which affect the meiotic process. *Hum Reprod*. 2010 Sep;25(9):2374-86.
49. Armstrong DT. Effects of maternal age on oocyte developmental competence. *Theriogenology*. 2001 Apr 1;55(6):1303-22.
50. Lonergan P, Monaghan P, Rizos D, Boland MP, Gordon I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Mol Reprod Dev*. 1994 Jan;37(1):48-53.
51. Pavlok A, Lucas-Hahn A, Niemann H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol Reprod Dev*. 1992 Jan;31(1):63-7.

Tabela1. Estágios de maturação nuclear (metáfase I, telófase I e metáfase II) oocitária nos grupos Sem Fluido, Controle e Endometriose.

	Concentração FF (%)	Total Oócitos fixados (n)	Total oócitos visualizados (n)	Metáfase I		Telófase I		Metáfase II
				Total	Normal n (%)	Total	Normal n (%)	Total
Sem Fluido	0	119	115	9 (7,82)	7 (77,78)	6 (5,22)	5 (83,34)	100 (86,96)
FF Controle	1	129	117	6 (5,12)	6 (100)	4 (3,42)	2 (50)	107 (91,46)
	5	133	118	4 (3,38)	4 (100)	1 (0,85)	1 (100)	113 (95,77)
	10	126	119	13 (10,92)	8 (61,54)	5 (4,20)	4 (80)	101 (84,88)
	15	124	111	6 (5,40)	4 (66,67)	4 (3,60)	2 (50)	101 (91)
FF Endometriose	1	125	115	12 (10,43)	8 (66,67)	2 (1,74)	1 (50)	101 (87,83)
	5	124	113	16 (14,16)	8 (50)	1 (0,088)	0	96 (84,96)
	10	125	118	13 (11,01)	11 (84,62)	2 (1,70)	2 (100)	103 (87,29)
	15	123	112	9 (8,03)	6 (66,67)	4 (3,58)	3 (75)	99 (88,39)

Tabela 2. Porcentagens de oócitos em metáfase II normais e anormais nos grupos Sem Fluido, Controle e Endometriose.

	Concentração FF (%)	Total de MII	Analisáveis						Não Analisáveis		
			Total n (%)	Normais	Anormais n (%)				Total n (%)	Normais	Anormais
					FNCA n (%)	Total n (%)	FACA n (%)	FACD n (%)			
Sem Fluido	0	100	51 (51)	39 (76,47)	12 (23,53)	3 (25)	6 (50)	3 (25)	49 (49)	49 (100)	0
FF Controle	1	107	47 (43,93)	38 (80,85)	9 (19,15)	3 (33,33)	6 (66,67)	0	60 (56,07)	59 (98,33)	1 (1,67)
	5	113	64 (56,64)	49 (76,56)	15 (23,44)	6 (40)	8 (53,34)	1 (6,66)	49 (43,36)	48 (97,96)	1 (2,04)
	10	101	60 (59,40)	45 (75)	15 (25)	6 (40)	7 (46,67)	2 (13,33)	41 (40,60)	40 (97,56)	1 (2,44)
	15	101	63 (62,38)	48 (76,19)	15 (23,81)	8 (53,34)	6 (40)	1 (6,66)	38 (37,62)	38 (100)	0
FF Endometriose	1	101	45 (44,55)	20 (44,44)	25 (55,56)	9 (36)	15(60)	1 (4)	56 (55,45)	52 (92,56)	4 (7,14)
	5	96	49 (51,04)	18 (36,74)	31 (63,26)	17 (54,84)	14 (45,16)	0	47 (48,96)	45 (95,75)	2 (4,25)
	10	103	44 (42,72)	20 (45,46)	24 (54,54)	12 (50)	12(50)	0	59 (57,28)	59 (100)	0
	15	99	43 (43,43)	22 (51,16)	21 (48,84)	11 (52,38)	9 (42,85)	1 (4,77)	56 (56,57)	55 (98,21)	1 (1,79)

Legenda Tabela 1.

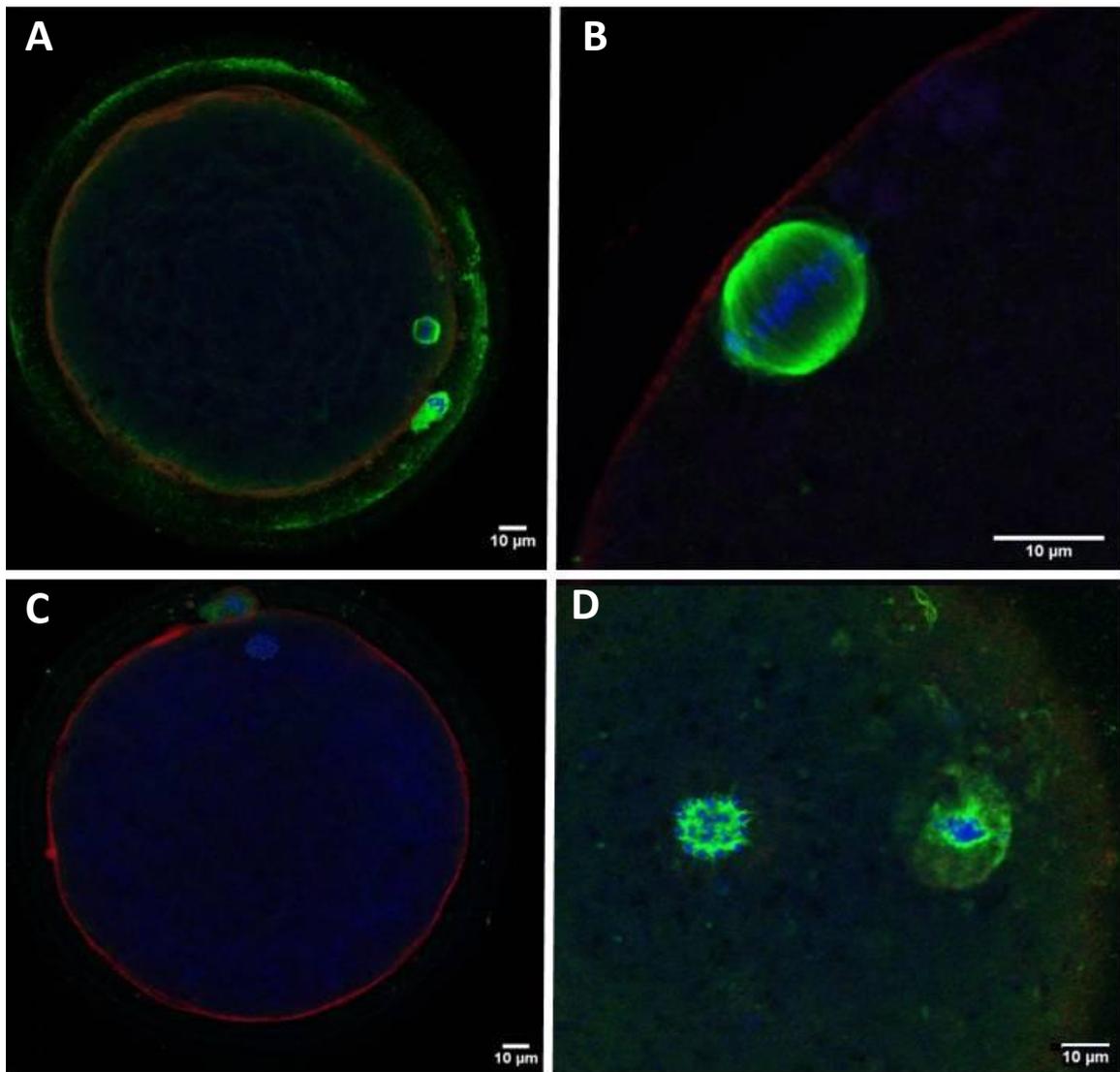
Nota. Não houve diferença significativa entre os grupos. Nível de significância de 5%.

Legenda Tabela 2.

Nota. Analisáveis: oócitos com fuso em visão sagital. Não analisáveis: oócitos com fuso em visão polar. FNCA: fuso normal e cromossomos alinhados. FACA: fuso anormal e cromossomos alinhados. FACD: fuso anormal e cromossomos desalinhados. FNCD: fuso normal e cromossomos desalinhados. CA: cromossomos alinhados. CD: cromossomos desalinhados.

$p < 0,01$ quando comparados FNCA e total de anormais entre os grupos Controle e Endometriose e entre os grupos Sem Fluido e Endometriose nas concentrações 1%, 5%, 10% e 15%. A análise dos CD não convergiu.

Figura 1.



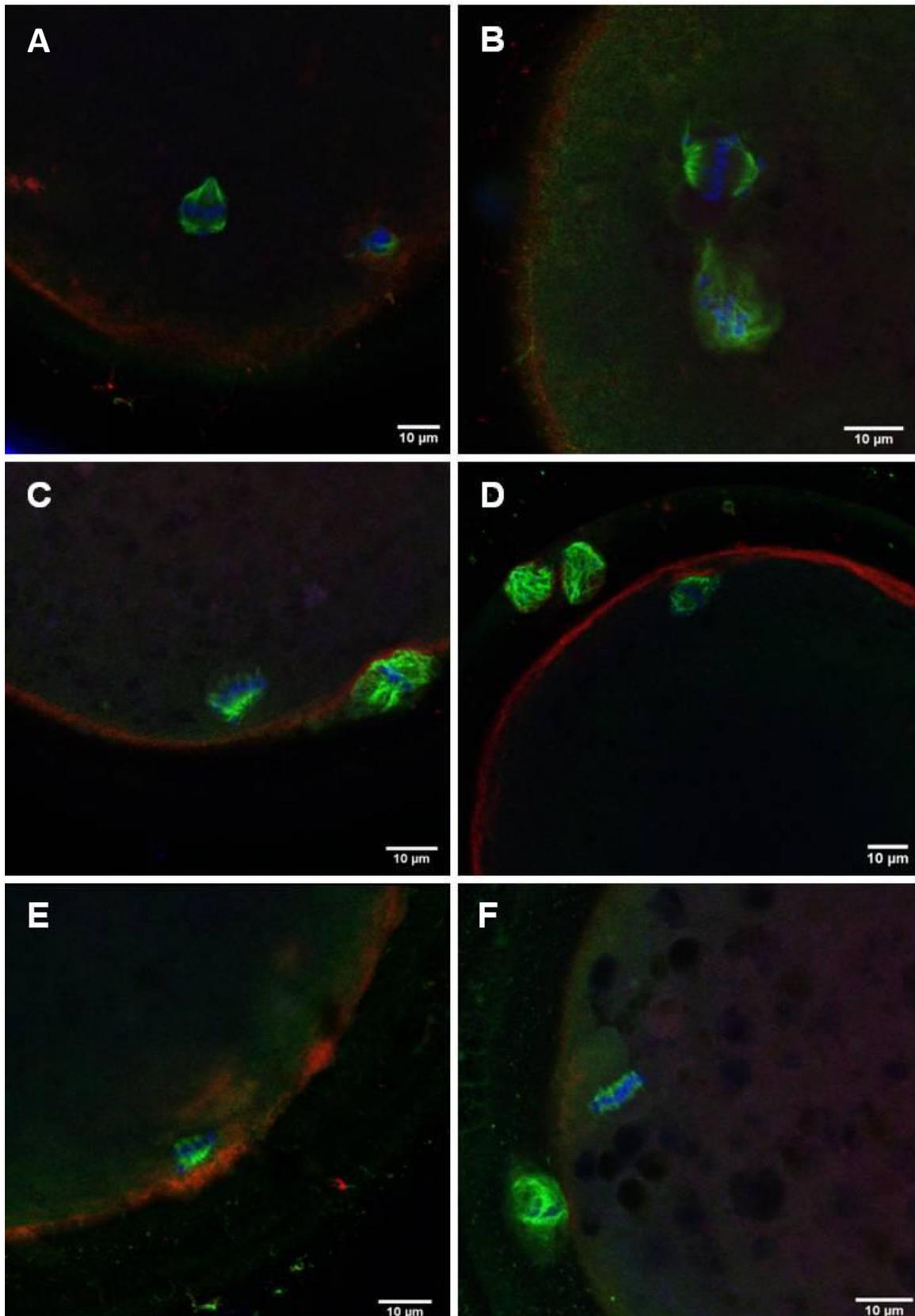
Título Figura 1.

Imagens de microscopia confocal evidenciando microtúbulos (verde), cromossomos (azul) e microfilamentos de actina (vermelho), em oócitos bovinos em Metáfase II normal.

Legenda Figura 1.

A-B: Fuso normal e cromossomos alinhados (visão sagital). C-D: Cromossomos alinhados (visão polar).

Figura 2.



Título Figura 2.

Imagens de microscopia confocal evidenciando microtúbulos (verde), cromossomos (azul) e microfilamentos de actina (vermelho), em oócitos bovinos em Metáfase II anormal.

Legenda Figura 2.

A-E: Fuso anormal e cromossomos desalinhados (visão sagital). F: Fuso anormal e cromossomos alinhados.