

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

LUCIANA AZÔR DIB

**Análise não invasiva do fuso celular oocitário e os resultados dos
procedimentos de reprodução assistida em mulheres inférteis com
endometriose**

RIBEIRÃO PRETO

2010

LUCIANA AZÔR DIB

**Análise não invasiva do fuso celular oocitário e os
resultados dos procedimentos de reprodução assistida
em mulheres inférteis com endometriose**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Mestre em
Medicina.

Área de concentração: Tocoginecologia

Orientadora: Profa. Dra. Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro

RIBEIRÃO PRETO

2010

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

Dib, Luciana Azôr

Análise não invasiva do fuso celular de oócitos de mulheres inférteis com endometriose e correlação com os resultados dos procedimentos de reprodução assistida, 2010.

100 p. il., 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Tocoginecologia

Orientador: Navarro, Paula Andrea Albuquerque Salles

1. Endometriose.
2. Fuso meiótico.
3. Qualidade oocitária.
4. Microscopia de polarização.
5. ICSI.
6. Ciclos de estimulação ovariana controlada.

Dedicatória

A minha mãe, **Ana Maria Fraga Azôr Dib** (*in memoriam*), minha fonte inesgotável de fé e otimismo. Mulher determinada que, através de seu exemplo de luta, coragem e perseverança, contribuiu imensamente para minha formação pessoal.

A meu pai, **Carlos Antonio Dib**, médico extremamente dedicado e altruísta.

Com seu jeito amoroso ensinou-me a buscar meus objetivos e batalhar por eles, assim como ele o fez.

É um orgulho enorme ser sua filha e almejo, algum dia, ser metade da pessoa que você é hoje.

A meus irmãos, **Frederico Azôr Dib e Marina Azôr Dib**, meus amigos. Com eles aprendi o valor do amor, da paciência e da união.

A meu noivo, **Marcelo Gondim Rocha**, meu companheiro e ombro amigo desta jornada. Uma pessoa que me fez entender e vivenciar o verdadeiro sentido da palavra felicidade.

A minha orientadora, **Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro**, por ter contribuído indiscutivelmente para a minha formação profissional; por ter sido minha confidente e verdadeira amiga; por ter sido uma mãe, acolhedora, atenciosa e conselheira em todos os momentos difíceis que enfrentei ao longo desta caminhada.

Agradecimientos

À Deus que sempre me deu força e coragem para continuar seguindo meus objetivos, apesar das adversidades encontradas nesta trajetória.

A todos os meus familiares que sempre estiveram ao meu lado dispostos a oferecer todo amor, amizade, carinho e conforto mesmo estando distantes fisicamente.

À Profa. Dra. Anaglória Pontes, pela disponibilidade em participar da minha banca de mestrado, acrescentando sugestões valiosas, que em muito contribuíram para meu aprendizado.

Ao Prof. Dr. Rui Alberto Ferriani, por quem tenho grande admiração, por ter aceitado participar da minha banca de mestrado.

À Comissão de Pós-graduação em Tocoginecologia, pela oportunidade de fazer meu mestrado neste setor. À querida amiga Suelen Bezerra, pela disponibilidade em garantir ajuda sempre que necessária e ao professor Antonio Alberto Nogueira pelos ensinamentos que contribuíram para a minha formação acadêmica.

A todos que compõem o Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (docentes e médicos contratados), pela minha formação profissional.

A todos funcionários do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela disponibilidade em ajudar quando necessário, em especial a Ilza, Ricardo, Reinaldo e Rosane.

A todos que trabalham no Setor de Reprodução Humana, pelos inúmeros ensinamentos e pelas oportunidades proporcionadas ao meu crescimento profissional e pelo despertar para a vida acadêmica.

Aos funcionários do laboratório de Ginecologia e Obstetrícia: Auxiliadora, Marisa e Océlia, pelo auxílio na coleta de sangue das pacientes; Albina, pelo carinho; Roberta, pela ajuda no laboratório; Sandra, Marilda, Cidinha, Débora entre outros, pela amizade dispensada a mim.

À amiga Maria Cristina Araújo, que me ajudou na construção deste trabalho. Além disso, esteve ao meu lado, vibrando com o sucesso e, nas horas mais tristes, oferecendo consolo.

Aos amigos da Pós-graduação pela convivência diária e sempre divertida, pelo companheirismo e pela troca de aprendizado e favores durante esse período de especialização.

A todos os meus amigos que conheci em Ribeirão Preto em especial a Aline, Erci, o Anderson, a Jhenifer e Jacira, que muito me ajudaram para concretização desta etapa de vida.

À minha grande amiga e vizinha Milena, irmã de coração, pela demonstração diária de carinho e afeto.

Aos meus eternos amigos: Ilka, Monique, Silvana e Bruno pela presença constante em todos os momentos da minha vida, me apoiando incondicionalmente.

Às mulheres que participaram deste estudo como voluntárias, pela colaboração e pela confiança depositada.

À FAPESP, CNPq e a CAPES pelo apoio financeiro imprescindível na confecção desta pesquisa.

A todos os que contribuíram, direta ou indiretamente, para realização deste trabalho, o meu eterno agradecimento.

"Não faças do amanhã o sinônimo de nunca,
nem o ontem te seja o mesmo que nunca mais.

Teus passos ficaram.

Olhes para trás... mas vá em frente
pois há muitos que precisam
que chegues para poderem seguir-te."

Charles Chaplin

DIB, LA. “Análise não invasiva do fuso celular oocitário e os resultados dos procedimentos de reprodução assistida em mulheres inférteis com endometriose” Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Introdução: Apesar de controverso, questiona-se um papel deletério da endometriose nos resultados de procedimentos de reprodução assistida, o que pode estar relacionado ao comprometimento da qualidade oocitária. Para que o oócito maduro esteja preparado para a fertilização, é necessário que o fuso meiótico mantenha a sua integridade e funcionabilidade.

Objetivos: Comparar a presença e localização do fuso meiótico e o estágio de maturação nuclear de oócitos com o primeiro corpúsculo polar (CP) visível de pacientes inférteis sem e com endometriose. Comparar os resultados de Injeção Intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI) entre os oócitos em telófase I e metáfase II, e entre aqueles com e sem fuso celular visível, nos grupos analisados.

Metodologia: Estudo prospectivo e controlado com pacientes inférteis, submetidas à estimulação ovariana para realização de ICSI, selecionadas consecutivamente e divididas em dois grupos: Controle (fator tubário e/ou masculino) e Endometriose (subdividido em endometriose mínima e leve – I/II versus moderada e severa – III/IV). Os oócitos com extrusão do primeiro CP foram avaliados pela microscopia de polarização imediatamente antes da realização da ICSI e caracterizados quanto à presença/localização do fuso celular em relação ao primeiro CP e ao estágio de maturação nuclear (telófase I ou metáfase II). Foram analisados as taxas de fertilização, clivagem, número de embriões de boa qualidade no segundo (D2) e terceiro (D3) dia de desenvolvimento oriundos dos oócitos em telófase I versus metáfase II, e metáfase II com fuso visível versus sem fuso visível, nos grupos controle, endometriose, endometriose I/II e endometriose III/IV.

Resultados: Foram analisados 441 oócitos, sendo 254 do grupo controle e 187 do grupo endometriose (115 do grupo endometriose I/II e 72 do grupo endometriose III/IV). Não observamos diferença significativa entre a percentagem de oócitos em metáfase II com fuso

celular visível e não visível (88,6%, 91,3%, 88,2%, respectivamente, nos grupos controle, endometriose I/II e endometriose III/IV) e entre a percentagem de oócitos com fuso celular nas diferentes localizações nos grupos avaliados. Entre os oócitos aparentemente maduros, observamos um aumento significativo de oócitos em telófase I no grupo endometriose III/IV (5,6%) quando comparado ao grupo endometriose I/II (0%). Observamos uma tendência a menores taxas de fertilização dos oócitos injetados em telófase I quando comparados aos em metáfase II, nos grupos controle ($p=0,08$), endometriose ($p=0,05$) e endometriose III/IV ($p=0,09$). Comparando-se os oócitos com e sem fuso celular visível, não observamos diferença significativa nos resultados de ICSI entre os grupos analisados.

Conclusão: Não observamos diferença significativa entre os grupos analisados quanto à visualização e localização do fuso celular em oócitos maturados *in vivo* com o primeiro CP visível. Todavia, observamos um aumento significativo de oócitos em telófase I nas portadoras de endometriose moderada e severa, sugerindo um retardo ou comprometimento na conclusão da meiose I. Considerando que os oócitos injetados em telófase I apresentam piores taxas de fertilização do que os injetados em metáfase II, este achado poderia justificar o comprometimento dos resultados de reprodução assistida em mulheres inférteis com endometriose moderada e severa, além de ser utilizado com ferramenta prognóstica pós-ICSI.

Palavras-chave: Endometriose; fuso meiótico; qualidade oocitária; microscopia de polarização; ICSI; ciclos de estimulação ovariana controlada.

Abstract

DIB, LA. **Living human oocytes with first polar body extrusion from patients with moderate and severe endometriosis contain a higher percentage of telophase I oocytes.** Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Introduction: Although it has been a controversial issue for decades, a deleterious role of endometriosis on assisted reproductive techniques (ART) outcomes is questioned, which may be related to oocyte quality. For a mature oocyte be prepared for fertilization is necessary that the meiotic spindle keeps its integrity and its function.

Objectives: To compare the presence and localization of the meiotic spindle and the oocyte nuclear maturation with the visible first polar body of infertile patients with and without endometriosis. To compare ICSI outcomes between oocytes on telophase I and metaphase II, and the ones with and without visible meiotic spindle, on those two groups.

Methodology: A prospective and controlled study with infertile patients who underwent ovarian stimulation for purposes of ICSI, selected consecutively and divided into two groups: control (tubal and/or male factor) and endometriosis (subdivided in minimum and mild stage – I/II versus moderate and severe stage – III/IV). The oocytes with the first polar body extruded (*in vivo* matured oocytes) were imaged using a polarization microscopy immediately before ICSI and characterized according to the presence and localization of meiotic spindle and its relation to the first polar body and the nuclear maturation stage (telophase I and metaphase II). We have analyzed the fertilization rates, clivage, number of good quality embryos on the second (D2) and third (D3) day of development from oocytes on telophase I versus the ones on metaphase II, and metaphase II visible spindle versus the non-visible ones, on the control groups, endometriosis, endometriosis stage I/II and endometriosis stage III/IV.

Results: A total of 441 oocytes were analyzed, 254 oocytes form the control group and 187 from the endometriosis one (115 from endometriosis stage I/II and 72 from endometriosis stage III/IV). No significant differences between the percentage of metaphase II with visible and non-visible meiotic spindle were found (88,6%, 91,3%, and 88,2%, in the control,

endometriosis I/II and endometriosis III/IV groups, respectively). Among the apparently matured oocytes, we have observed a significant increase of oocytes on telophase I on the endometriosis III/IV group (5,6%) when compared with the endometriosis I/II group (0%). We have observed a tendency to fewer fertilization rates from the injected oocytes on telophase I when compared with the ones on metaphase II, on the control group ($p=0,08$), endometriosis ($p=0,05$) and endometriosis III/IV group ($p=0,09$). When we compared oocytes with and without visible meiotic spindle, we found no significant difference on ICSI outcomes among the studied groups.

Conclusions: We have found no significant difference among the studied groups regarding the visualization and localization of the meiotic spindle from *in vivo* matured oocytes with a visible first polar body. However, we have observed a significant increase on the number of oocytes on telophase I from patients with moderate and severe endometriosis, suggesting a delay or an impairment in the completion of meiosis I. Since the injected oocytes on telophase I present a worse fertilization rates than the ones injected on metaphase II, this finding could explain the impairment on the outcomes of ART in infertile women with moderate and severe endometriosis, besides it could be used as a prognosis tool after ICSI procedures.

KEYWORDS: Endometriosis; meiotic spindle; human oocyte quality; polarization microscopy; ICSI; stimulated cycles.

Figura 1. Esquema representativo de oócitos humanos com extrusão do primeiro corpúsculo polar (CP) avaliados pela microscopia de polarização imediatamente antes da realização da Injeção Intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI) 47

Tabela 1 - Comparação dos parâmetros da estimulação ovariana controlada e os resultados de Injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) entre mulheres inférteis do grupo controle (fatores tubários e/ou masculinos) e do grupo endometriose..... 48

Tabela 2 - Análise não invasiva do grau de maturação nuclear e presença/localização do fuso celular de oócitos com o primeiro corpúsculo polar visível obtidos de ciclos estimulados de pacientes inférteis do grupo controle (fatores tubários e/ou masculinos) e do grupo endometriose 49

Tabela 3 - Taxas de fertilização, clivagem e número de embriões de boa qualidade no segundo e terceiro dia de desenvolvimento provenientes de oócitos humanos injetados em metáfase II ou telófase I nos grupos controle, endometriose, grupo endometriose mínima e leve e endometriose moderada e severa 50

Tabela 4 - Taxas de fertilização, clivagem e número de embriões de boa qualidade no segundo e terceiro dia de desenvolvimento provenientes de oócitos humanos injetados em metáfase II com ou sem fuso celular visível pela microscopia de polarização nos grupos controle, endometriose, grupo endometriose mínima e leve e endometriose moderada e severa 51

Lista de Abreviaturas

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa

TRA – Técnicas de reprodução assistida

FIV – Fertilização *in vitro*

FMP – Fator promotor de metáfase

MAP-K – Quinase ativadora de mitogênese

DNA – ácido desoxirribonucléico

MII – Metáfase II

HGC – Hibridização genômica comparativa

FISH – Hibridização por fluorescência *in situ*

VEGF – Fator de crescimento endotélio vascular

ICSI – Injeção Intracitoplasmática de espermatozoides

RA – Reprodução assistida

IMC – Índice de massa corporal

FSH – Hormônio Folículo Estimulante

HCG – Gonadotrofina coriônica humana

CP – Corpúsculo polar

1. INTRODUÇÃO	26
2. JUSTIFICATIVA	34
3. OBJETIVOS	36
3.1. Objetivos principais.....	37
3.2. Objetivos secundários.....	37
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS	38
4.1 Análise Estatística	43
5. RESULTADOS	44
6. DISCUSSÃO	52
7. CONCLUSÕES.....	58
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
ANEXOS	68
ARTIGO CIENTÍFICO.....	78

1. Introdução

A endometriose é uma doença que afeta a mulher em idade reprodutiva e é caracterizada por implante e crescimento de tecido endometrial (glândulas e/ou estroma) fora da cavidade uterina. Tem sido observada em 10% a 50% das pacientes submetidas a laparotomias ginecológicas. A fisiopatologia dessa doença ainda permanece obscura. As teorias mais comuns são (a) menstruação retrógrada com implantação subsequente, (b) metaplasia celômica, e (c) transporte hematogênico ou linfático de tecido endometrial (SANTANAM et al., 2002)

A maioria dos estudos sobre endometriose pélvica são baseados na teoria da implantação de Sampson (SAMPSON, 1927). De acordo com essa teoria, as células endometriais descamadas são transportadas até a cavidade peritoneal após a menstruação retrógrada e as células viáveis implantam e crescem.

Estudos mais recentes sugerem que o fluido menstrual contém fatores que induzem alterações na morfologia do mesotélio peritoneal (KOKS et al., 2000), podendo criar sítios de adesão para as células endometriais. A adesão dessas células parece ser estimulada pela indução da adesão de moléculas e seus receptores (SOMIGLIANA et al., 1996; BELIARD et al., 1997; SELAM e ARICI, 2000) e pela expressão exagerada de ativadores de metaloproteinases e plasminogênio da matriz celular, que estimulam a destruição local da matriz extracelular, favorecendo o aparecimento dos implantes de endometriose (VAN LANGENDONCKT et al., 2002).

Após a adesão, as células endometriais proliferam e, gradualmente, invadem o tecido peritoneal. Alguns fatores induzem a vascularização de implantes endometriais, permitindo o seu desenvolvimento futuro. Já foi sugerido que esse processo leva à formação de lesões vasculares avermelhadas com grande atividade vascular e metabólica. As citocinas e fatores de crescimento, como o fator de crescimento- β , interleucina-8, interleucina-1, fator de necrose tumoral (TNF- α), Interferon- γ , fator de crescimento endotelial (vascular), têm sido implicados

como indutores de adesão, proliferação, e neovascularização (DONNEZ et al., 1998; VINATIER et al., 2000). A endometriose também parece estar associada com o aumento no recrutamento e ativação de macrófagos, que parecem ter importante papel no desenvolvimento da doença (HALME et al., 1984; VAN LANGENDONCKT et al., 2002).

Esta afecção pode cursar com uma grande diversidade de manifestações clínicas. Podemos encontrar desde pacientes assintomáticas, até quadros de dor pélvica intensa, sintomas decorrentes de lesões em órgãos não reprodutivos e infertilidade. Contudo, dentre o espectro de sintomas relacionados à endometriose, um dos mais intrigantes é a associação da doença com a infertilidade, principalmente naqueles casos em que não há alteração mecânica do trato reprodutivo. É uma questão controversa há várias décadas, mas vários dados têm apoiado o conceito de diminuição de fecundidade mesmo neste grupo de pacientes com endometriose (GARRIDO et al., 2000; GARRIDO et al., 2002).

Novas abordagens terapêuticas ao problema da infertilidade relacionada a esta afecção têm surgido, destacando-se a aplicação, cada vez mais rotineira, das técnicas de reprodução assistida (TRA) de alta complexidade. A introdução da fertilização *in vitro* (FIV) no tratamento da infertilidade secundária à endometriose tornou-se uma importante ferramenta para o estudo dos efeitos potenciais da endometriose em alguns estágios específicos do processo reprodutivo, incluindo a foliculogênese, a fertilização, o desenvolvimento embrionário e a implantação.

Resultados conflitantes de alguns estudos têm sugerido a ocorrência de menores taxas de fertilização, implantação e de gestação em portadoras de endometriose (BARNHART et al., 2002; AL-FADHLI et al., 2006). Três alterações distintas poderiam ser as responsáveis por estes achados: a) comprometimento da qualidade oocitária e, conseqüentemente, embrionária; b) defeitos endometriais; e c) defeitos da interação entre o endométrio e o embrião. Os achados conflitantes da presença de algumas alterações no endométrio eutópico

de pacientes com endometriose, poderiam explicar, pelo menos em parte, distúrbios na interação entre o embrião e o endométrio, gerando anomalias no processo de implantação (GARCIA-VELASCO e ARICI, 1999). Entretanto, o achado de taxas de implantação semelhantes as do grupo controle, em ciclos de transferência de embriões resultantes de oócitos doados por mulheres sem esta afecção para o útero de portadoras de endometriose, tem reforçado o papel crucial da qualidade embrionária no comprometimento da implantação verificado neste grupo de pacientes (GARRIDO *et al.*, 2000; (PELLICER *et al.*, 2001; KATSOFF *et al.*, 2006).

Sabemos que embriões de boa qualidade (aqueles com habilidade para implantar e desenvolver adequadamente), originam-se de oócitos de boa qualidade, que, por sua vez, são provenientes de folículos com um adequado meio ambiente, condicionado tanto pelo conteúdo do fluido folicular, como pela influência das células vizinhas (CANIPARI, 2000). Desta forma, o comprometimento da qualidade embrionária pode ser induzido tanto por defeitos prévios à foliculogênese, como por eventos posteriores à fertilização. Alguns estudos têm sugerido a potencial influência do estresse oxidativo na etiopatogênese da endometriose e infertilidade associada a esta doença (JACKSON *et al.*, 2005; GUPTA *et al.*, 2006), o que poderia, pelo menos teoricamente, promover um comprometimento da qualidade oocitária nestas pacientes. Foram descritas alterações na qualidade do oócito, levando ao comprometimento (BRIZEK *et al.*, 1995) ou completo bloqueio do desenvolvimento embrionário (PELLICER *et al.*, 1995), em mulheres com endometriose, quando comparadas a controles saudáveis. Corroborando estes achados, dados clínicos de programas de doação de oócitos parecem apoiar, como descrito previamente, a teoria de que mulheres afetadas por endometriose produzem oócitos de qualidade comprometida (GARRIDO *et al.*, 2000).

A qualidade oocitária é decorrente de fatores correlacionados às competências nuclear e citoplasmática. A maturação citoplasmática pode ser considerada como o resultado do

processo de desenvolvimento de uma célula incompetente para uma célula com capacidade de fertilização e desenvolvimento embrionário inicial (FERREIRA et al., 2009). A competência nuclear é caracterizada pela qualidade da cromatina e do fuso oocitário (MATTSON e ALBERTINI, 1990; ALBERTINI, 1992), que é essencialmente regulada pela atividade do Fator Promotor de Metáfase (FPM) (HASHIMOTO e KISHIMOTO, 1988; VERDE et al., 1990; VERDE et al., 1992) e pela Quinase Ativadora de Mitogênese (MAP-K) (SUN et al., 1999). O FPM regula direta ou indiretamente todos os processos ligados à entrada na metáfase de células eucarióticas, assim como a quebra do envelope nuclear (OOKATA et al., 1992), a fosforilação da histona (COLLAS, 1999) e a polimerização de microtúbulos (CHARRASSE et al., 2000). A MAP-K age na regulação dos eventos do ciclo celular nos oócitos de mamíferos que não têm relação com o FPM, evitando microtúbulos e cromatina de entrar em configuração interfásica, sendo ativado após a quebra da vesícula germinativa (SUN et al., 1999).

O fuso meiótico de oócitos humanos em metáfase II (MII) é uma estrutura temporária e dinâmica, composta por microtúbulos, que está associada com o córtex oocitário e sua rede de microfilamentos subcorticais. (LIU et al., 2000; WANG e KEEFE, 2002; NAVARRO et al., 2005). Os microtúbulos são constituídos por unidades heterodiméricas de alfa(α) e beta(β)-tubulina, capazes de rápida polimerização e despolimerização, compondo 13 protofilamentos arranjados lado a lado para formar uma parede cilíndrica. A tubulina polimerizada, contudo, está em equilíbrio com a reserva de tubulina do ooplasma. Os microtúbulos do fuso estão ligados aos cinetócoros dos cromossomos (MANDELBAUM et al., 2004) e, por isso, participam da segregação durante a meiose (WANG e KEEFE, 2002). Os microfilamentos, por sua vez, controlam os movimentos do citoplasma, incluindo a divisão celular (KIM et al., 1998). Desta forma, a fecundação normal e o desenvolvimento embrionário dependem deste controle.

Um fuso funcionante, essencial em oócitos sadios em MII, garante a fidelidade da segregação cromossômica (VOLARCIK et al., 1998; VAN BLERKOM e DAVIS, 2001; DE SANTIS et al., 2005). O fuso celular oocitário é extremamente sensível à ação de diversos fatores, como o envelhecimento, as mudanças térmicas, o suporte insuficiente de oxigênio durante o tempo de cultura e a manipulação oocitária (HU et al., 2001; EICHENLAUB-RITTER et al., 2002; MULLEN et al., 2004).

Existem diferentes metodologias destinadas à avaliação da qualidade oocitária. Tal avaliação pode ser realizada fisiologicamente, por meio da análise de marcadores biológicos, ou morfológicamente, de forma invasiva e não-invasiva.

A avaliação da qualidade oocitária por meio da análise da sua fisiologia tem sido realizada apenas em estudos experimentais, geralmente utilizando modelos animais, não apresentando aplicabilidade clínica até o momento.

Dispomos de diferentes metodologias invasivas destinadas à avaliação morfológica oocitária, que, apesar de permitirem um adequado detalhamento das estruturas analisadas, requerem a fixação e a coloração oocitárias para análise, impossibilitando a utilização clínica do material estudado. O oócito pode ser avaliado, qualitativamente, por meio da análise imunocitoquímica por imunofluorescência, tanto da organização microtubular, como das configurações de ácido desoxirribonucléico (DNA) (MIYARA et al., 2003), usando-se microscópios convencionais ou confocais. Também se pode realizar a microinjeção de sondas no interior do oócito com o objetivo de se detectar alguns componentes estruturais menos acessíveis, como a gama-tubulina no centrômero, ou para se realizar a análise da função de proteínas específicas. Na investigação de anormalidades cromossômicas numéricas, podemos lançar mão da hibridização genômica comparativa (HGC) ou da hibridização por fluorescência *in situ* (FISH) (GUTIERREZ-MATEO et al., 2004). Associada à análise por imunocitoquímica estática, a detecção da dinâmica citoesquelética em oócitos vivos pode ser

realizada usando-se resgate fluorescente após fotobranqueamento (FRAP) ou citoquímica ativada por fluorescência.

A metodologia mais utilizada na prática clínica consiste na avaliação morfológica não-invasiva, que, geralmente, utiliza como critérios a análise de alterações na forma dos oócitos em MII, a coloração, a presença de granulações e homogeneidade do citoplasma, o tamanho do espaço perivitelínico (XIA, 1997), a presença de inclusões citoplasmáticas (SERHAL et al., 1997) e a morfologia do primeiro corpúsculo polar e da zona pelúcida (XIA, 1997; EBNER et al., 1999; KAHRAMAN et al., 2000; NAVARRO et al., 2009). Contudo, não há evidências de boa correlação entre a avaliação morfológica oocitária por meio da utilização destes critérios morfológicos e a capacidade desenvolvimental oocitária.

Alguns autores têm utilizado a microscopia de polarização como instrumento destinado à avaliação da qualidade oocitária, por meio da análise da birrefringência do fuso meiótico e caracterização da zona pelúcida oocitária. A microscopia de polarização, como descrito em estudos anteriores (WANG et al., 2001; WANG e KEEFE, 2002; WANG et al., 2002; MOON et al., 2003; NAVARRO et al., 2005; PETERSEN et al., 2009) possibilita a visualização de estruturas birrefringentes em células vivas, sem a necessidade de fixação ou coloração, o que permite a utilização dos oócitos analisados por esta metodologia nos procedimentos de reprodução assistida. Alguns dados sugerem que análise oocitária por esta metodologia poderia ser útil na triagem de possíveis anormalidades, não só do fuso celular, como, indiretamente, do alinhamento cromossômico, uma vez que, na grande maioria das vezes, estas duas alterações estão presentes conjuntamente (NAVARRO et al., 2004; NAVARRO et al., 2006).

Os estudos que procuraram avaliar de forma indireta a qualidade oocitária em pacientes com endometriose, utilizaram a análise de fatores parácrinos múltiplos presentes no fluido folicular, como interleucinas, fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), fator

de necrose tumoral, além da avaliação de apoptose nas células da granulosa, análise do número e atividade dos leucócitos circunjacentes, entre outros, como preditores indiretos da qualidade oocitária (GARRIDO et al., 2002). Contudo, não dispomos de estudos que tenham avaliado a qualidade oocitária em portadoras de endometriose por meio da análise de critérios morfológicos mais objetivos e, potencialmente, mais capazes de prever a real capacidade desenvolvimental oocitária.

Métodos não invasivos para a visualização de oócitos são muito importantes quando se trabalha com um material limitado e valioso como os óvulos humanos. A microscopia de polarização permite a análise de estruturas birrefringentes, como o fuso celular oocitário, sem comprometer a sua viabilidade e utilização clínica subsequente (LIU et al., 2000; NAVARRO et al., 2005; PETERSEN et al., 2009). A visualização do fuso meiótico em oócitos pode ter importância clínica em prever a fertilização pós-ICSI (Injeção Intracitoplasmática de espermatozoides) e a qualidade embrionária (WANG e KEEFE, 2002; HYUN et al., 2007; PETERSEN et al., 2009). Por outro lado, a identificação da posição do fuso meiótico em relação ao primeiro corpúsculo polar pode prevenir os embriologistas de danificarem essa importante estrutura celular durante a ICSI (MOON et al., 2003). Por isso, a visualização do fuso meiótico pode ser usada para selecionar oócitos que serão injetados na ICSI e apresenta especial relevância clínica em países onde existe um limite legal do número de oócitos a serem fertilizados (PETERSEN et al., 2009). Entretanto, não encontramos nenhum estudo na literatura avaliando de maneira não invasiva o fuso meiótico de oócitos maturados *in vivo* de pacientes inférteis com endometriose.

2. Justificativa

Apesar dos esforços despendidos há décadas no sentido de esclarecer os mecanismos responsáveis pela redução da fecundidade e potencial piora dos resultados de reprodução assistida em portadoras de endometriose, os dados disponíveis são escassos e controversos.

A observação de maiores taxas de bloqueio do desenvolvimento embrionário *in vitro* em pacientes com endometriose, associada ao fato de mulheres com essa doença, ao serem submetidas a ciclos de doação de oócitos provenientes de mulheres sem endometriose, terem taxas de implantação similares as do grupo controle, sugerem, que o comprometimento da qualidade oocitária possa mediar a redução nas taxas de implantação e gestação nestas pacientes. Sugere-se que o estresse oxidativo possa estar envolvido na etiopatogênese da infertilidade relacionada à endometriose, sendo passível de promover anomalias meióticas oocitárias. Hipotetizamos que anomalias na conclusão da meiose I ou no fuso meiótico de oócitos em metáfase II possam estar envolvidas na piora da qualidade oocitária e dos resultados dos procedimentos de reprodução assistida em portadoras de endometriose. Entretanto, não encontramos nenhum estudo na literatura que tenha avaliado de maneira não invasiva o fuso meiótico de oócitos maturados *in vivo* de pacientes inférteis com endometriose.

A avaliação da qualidade oocitária por meio da análise morfológica não invasiva do fuso meiótico e do real estágio de maturação nuclear pela microscopia de polarização é um método simples, inócuo, com boa reprodutibilidade e que poderia ajudar a esclarecer alguns dos possíveis fatores responsáveis pelas menores taxas de implantação e gestação observadas em pacientes com endometriose.

3. Objetivos

3.1. Objetivos principais

Avaliar o estágio de maturação nuclear e a presença e a localização do fuso meiótico, em relação ao primeiro corpúsculo polar, de oócitos obtidos em ciclos estimulados de pacientes inférteis com infertilidade de causa tubária e/ou masculina (grupo controle) e com endometriose, analisados imediatamente antes da realização da ICSI;

Comparar as taxas de fertilização, clivagem e número de embriões de boa qualidade entre os oócitos em metáfase II versus telófase I e entre os oócitos com fuso celular visualizado ou não, nos grupos controle, endometriose, endometriose mínima/leve e endometriose moderada/severa.

3.2. Objetivos secundários

Comparar a resposta à estimulação ovariana com gonadotrofinas e os resultados de ICSI (taxas de fertilização e clivagem, formação de embriões de boa qualidade e taxas de gestação química) entre pacientes inférteis com endometriose e infertilidade de causa tubária e/ou masculina.

4. Casuística e Métodos

Foi realizado um estudo prospectivo de Março de 2008 a Março de 2009 junto ao Setor de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP-USP. Esse estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Pesquisa e todos os casais submetidos à indução da ovulação para a realização de ICSI, que preencheram os critérios de inclusão e manifestaram o desejo de participar do projeto, assinaram o termo de consentimento pós-informado.

Cento e três pacientes (56 pacientes inférteis por fatores masculino e/ou tubários correspondendo ao grupo controle, e 47 pacientes com infertilidade relacionada à endometriose, sendo 26 pacientes com endometriose mínima e leve e 21 pacientes com endometriose moderada e severa) preencheram os critérios de inclusão no período do estudo. Foram incluídas pacientes com idade menor ou igual a 38 anos, FSH basal (hormônio folículo estimulante) menor que 10 mIU/mL (ELGINDY et al., 2008) e IMC (índice de massa corporal) menor que 30 Kg/m². O critério de inclusão das pacientes com endometriose era a confirmação do diagnóstico pela vídeolaparoscopia, de acordo com os critérios da Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996, 1997), que classifica a doença em quatro estágios: mínima (estádio I), leve (estádio II), moderada (estádio III) e grave (estádio IV). Pacientes do grupo controle não apresentaram doenças pélvicas associadas à infertilidade quando submetidas à vídeolaparoscopia.

Foram excluídas pacientes com diabetes mellitus ou quaisquer outras endocrinopatias, doença cardiovascular, lúpus eritematoso sistêmico e outras doenças reumatológicas, infecção pelo vírus HIV, qualquer infecção ativa, tabagismo ou o uso de medicações hormonais e antiinflamatórias hormonais e não-hormonais nos últimos dois meses, previamente à programação para o procedimento de reprodução assistida.

O bloqueio hipofisário foi iniciado usando agonista do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRHa) 10 dias antes do dia de realização da ultrasonografia transvaginal basal (protocolo longo), por meio da administração de acetato de leuprolide (Lupron®, Abott, Brasil). As pacientes receberam 100 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.

Todo material aspirado durante captação dos oócitos foi analisado para a identificação e o isolamento dos complexos oócito-cumulus. Depois de identificados, os complexos oócito-cumulus foram isolados do fluido folicular e colocados em placa separada. Os complexos oócito-cumulus foram lavados cuidadosamente em meio de cultura Human Tubal Fluid-HEPES (HTF, Irvine Scientific), para a remoção de sangue e debris. A seguir foram colocados em placas NUNC (Multidish 4 wells Nuclon, Delta SI), preenchidas com o meio de cultura HTF e cobertas com óleo mineral, e levados à incubadora em mistura gasosa de CO₂ a 5%, sob condições ideais de temperatura (37°C) e umidade (95%) por um período de 2 a 3 horas. Após este período, para realizarmos a remoção do *cumulus oophorus* e da *corona radiata*, os complexos oócito-cumulus foram colocados em micro-gotas de 25µL de hialuronidase (H4272 tipo IV-S, Sigma), na diluição de 80 UI/mL de HTF/HEPES (Irvine Scientific), por no máximo 30 segundos e, então, lavados 2 ou 3 vezes com o meio HTF modificado (HTF/HEPES, Irvine Scientific) suplementado com Soro Sintético Substituto (SSS) a 10%. A remoção mecânica dos restos celulares foi feita com o auxílio de uma pipeta de desnudação (stripper pipette 130 µm denuding pipette, Cook, Melbourne, Australia).

Após a realização do desnudamento oocitário (remoção do *cumulus oophorus*), realizamos a identificação do grau de maturidade dos oócitos, sob visualização ao

microscópio de luz. Os oócitos imaturos (em estágio de vesícula germinativa ou metáfase I) foram descartados. Os oócitos maduros (caracterizados morfológicamente pela presença de um corpúsculo polar extruso) foram incubados em gotas de 25 μ L de HTF + SSS 10% por mais uma hora (após o desnudamento oocitário) para, então, serem avaliados pelo OCTAX ICSI GuardTM System (Medical Technology Vertriebs-GmbH, Altdorf, Germany) e injetados por meio da realização da ICSI.

Os fusos celulares dos oócitos com extrusão do primeiro corpúsculo polar foram avaliados usando um microscópio invertido, equipado com uma vídeo câmera e com o *hardware* do microscópio de polarização, o qual consiste de cristais elétricos e de um controlador eletro-óptico (OCTAX ICSI GuardTM System, Medical Technology Vertriebs-GmbH, Altdorf, Germany). Os grupos de cristais elétricos são controlados pelo computador através do *software* OCTAX EyeWareTM (Universal Imaging Corp., Boston, MA). Os oócitos foram avaliados a 37°C, em gotas de 5 μ l de HTF/Heppes + SSS 10%, em placas de Petri revestidas com vidro na parte inferior (MatTek Corp., Ashland, MA), colocadas sobre uma placa aquecida a 37°C.

Para controlar os vieses metodológicos relativos à não visualização do fuso secundária à realização do desnudamento celular e ao envelhecimento oocitário, o desnudamento foi realizado 2 a 3 horas após a captação oocitária e, após o mesmo, os oócitos foram recolocados nas placas de cultivo previamente equilibradas, na incubadora, por mais uma hora, para somente depois serem submetidos ao imageamento e à ICSI. Um número máximo de sete oócitos era analisado em cada placa, sendo o tempo total, relativo ao necessário para a realização da análise do fuso celular pela microscopia de polarização mais a ICSI, foi inferior ou igual a 7 minutos.

Os oócitos com primeiro corpúsculo polar visível (CP) foram analisados pela microscopia de polarização e caracterizados quanto ao estágio real de maturação nuclear

(telófase I ou metáfase II), presença ou não de fuso celular visível e localização do fuso celular dos oócitos em metáfase II. Foram considerados em telófase I, os oócitos que apresentavam fuso celular alongado, perpendicular à membrana oocitária, estendendo-se até o primeiro CP. Os fusos celulares em metáfase II foram caracterizados pela presença de fibras birrefringentes distribuídas radialmente, com a forma de barril e orientadas paralelamente à membrana cortical. Como os cromossomos são minimamente birrefringentes, não são adequadamente analisáveis por meio desta metodologia. A localização do fuso celular baseou-se no ângulo formado entre esta estrutura e o primeiro CP, sendo os oócitos divididos em seis grupos: com fusos formando ângulos de 0 a 30 °, 30 a 60 °, 60 a 90 °, 90 a 120 °, 120 a 150 ° e 150 a 180 ° em relação ao primeiro CP.

Cerca de 18 a 19 horas após a ICSI foi avaliada a fertilização, caracterizada pela presença de 2 pró-núcleos e 2 corpúsculos polares (a taxa de fertilização, a ser calculada nos 2 grupos avaliados, corresponde ao número de oócitos fertilizados, divididos pelo número de oócitos injetados X 100). Cerca de 24 horas após a ICSI foi realizada a caracterização da presença de clivagem embrionária (a taxa de clivagem, calculada nos 2 grupos avaliados, corresponde ao número de embriões que sofrem clivagem, ou seja, divisão celular, divididos pelo número total de oócitos fertilizados X 100).

Cerca de 44 a 48 horas após a ICSI (D2) foi realizada a análise da qualidade embrionária (quanto ao número e simetria de blastômeros, percentagem de fragmentação e presença ou não de multinucleação). Foram considerados como embriões de boa qualidade no segundo dia de desenvolvimento (D2) os que apresentaram 4 blastômeros, simétricos, sem fragmentação e sem multinucleação. Cerca de 64 a 72 horas após a ICSI (D3) foi realizada novamente a análise da qualidade, sendo considerados de boa qualidade os embriões com 8 blastômeros simétricos, sem fragmentação e sem multinucleação.

Realizou-se a transferência embrionária em D2 ou D3, de acordo com a individualização de cada caso. Quatorze dias após a transferência embrionária realizou-se a análise do β -hCG sanguíneo, sendo considerada como gravidez química a presença de β -hCG positivo (maior ou igual a 25 UI/ml). A taxa de gravidez química foi calculada dividindo-se o número de pacientes com β -hCG positivo após 14 dias da transferência embrionária pelo número de ciclos com transferência, multiplicado por 100.

4.1 Análise Estatística

Inicialmente os grupos endometriose e controle foram analisados comparativamente quanto às percentagens de oócitos em telófase I, em metáfase II com fuso celular visível e não visível e de oócitos com fuso celular localizado nas diferentes posições, as taxas de fertilização, de clivagem e a percentagem de ciclos com pelo menos um embrião de boa qualidade através do teste exato de Fisher. Posteriormente os subgrupos da endometriose (estádios I/II e III/IV) foram comparados para as variáveis já descritas pelo teste exato de Fisher. Para análise comparativa das variáveis quantitativas, foram utilizados os testes t não-pareado e o teste de Mann-Whitney. Em todas as análises foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5. Resultados

Não observamos diferença significativa entre os três grupos avaliados (controle, endometriose I/II e endometriose III/IV) com relação à duração da estimulação ovariana, o número de folículos entre 14 e 17 mm, a espessura endometrial, o número de oócitos captados, o número de oócitos maduros, a taxa de clivagem e a percentagem de ciclos com pelo menos um embrião de boa qualidade transferido em D2. Entretanto, no grupo de pacientes com endometriose III/IV observamos um aumento significativo da dose total de FSH utilizada e uma redução significativa do número de folículos ≥ 18 mm e do número de oócitos fertilizados, quando comparado aos grupos controle e endometriose I/II. (Tabela 1).

Foram analisados, pela microscopia de polarização, 441 oócitos o com primeiro corpúsculo polar visível, sendo 254 do grupo controle, 115 do grupo endometriose I/II e 72 do grupo endometriose III/IV. Entre os oócitos aparentemente maduros, observamos um aumento significativo de oócitos em telófase I (figura 1A) no grupo endometriose III/IV (5,6% de oócitos em telófase I) quando comparado ao grupo endometriose I/II (0%). Não observamos diferença significativa entre a percentagem de oócitos em metáfase II com fuso celular visível (figura 1B) e não visível (figura 1C) entre os grupos avaliados (88,6%, 91,3%, 88,3%, respectivamente, nos grupos controle, endometriose I/II e endometriose III/IV). Quase todos os oócitos apresentaram o fuso celular localizado entre 0 – 90° em relação ao primeiro corpúsculo polar. Não observamos diferença significativa entre a percentagem de oócitos com fuso celular nas localizações entre 0° – 30° (figura 1D), 30° – 60° (figura 1E), 60° – 90° (figura 1F) entre os três grupos analisados. Ressalta-se que a percentagem de oócitos com fusos celulares localizados entre 60 e 90° em relação ao primeiro CP foi pequena nos três grupos analisados (3,2%, 1,9% e 5%, respectivamente nos grupos controle, endometriose I/II e endometriose III/IV). (Tabela 2).

Quando analisamos o grau de maturação nuclear (metáfase II versus telófase I) e comparamos com os resultados de reprodução assistida, observamos uma diminuição

significativa das taxas de fertilização ($p=0,01$) considerando o total de oócitos (grupos controle e endometriose analisados conjuntamente) injetados em telófase I (13 oócitos injetados, sendo 6 fertilizados; taxa de fertilização de 46,1%) quando comparados ao total de oócitos injetados em metáfase II (428 oócitos injetados, sendo 338 fertilizados; taxa de fertilização de 79%). Ao analisarmos os grupos individualmente, houve uma tendência a manter essa diminuição das taxas de fertilização nos grupos controle ($p=0,08$), endometriose ($p=0,05$) e endometriose III/IV ($p=0,09$) dos oócitos injetados em telófase I quando comparados aos em metáfase II. Não obtivemos oócitos em telófase I no grupo endometriose I/II. Não encontramos diferença significativa entre as taxas de clivagem nos diferentes grupos. Nenhum oócito fertilizado, após injeção em telófase I, formou embrião de boa qualidade em D2 ou D3. (Tabela 3).

Quando comparamos os resultados de reprodução assistida entre os oócitos em metáfase II com ou sem fuso celular visível, não observamos diferença significativa nas taxas de fertilização, clivagem e no número de embriões de boa qualidade formados em D2 entre os grupos controle, endometriose I/II e endometriose III/IV. Nas pacientes portadoras de endometriose, os oócitos sem fuso celular visível, que fertilizaram e clivaram, não formaram embriões de boa qualidade em D3. (tabela 4).

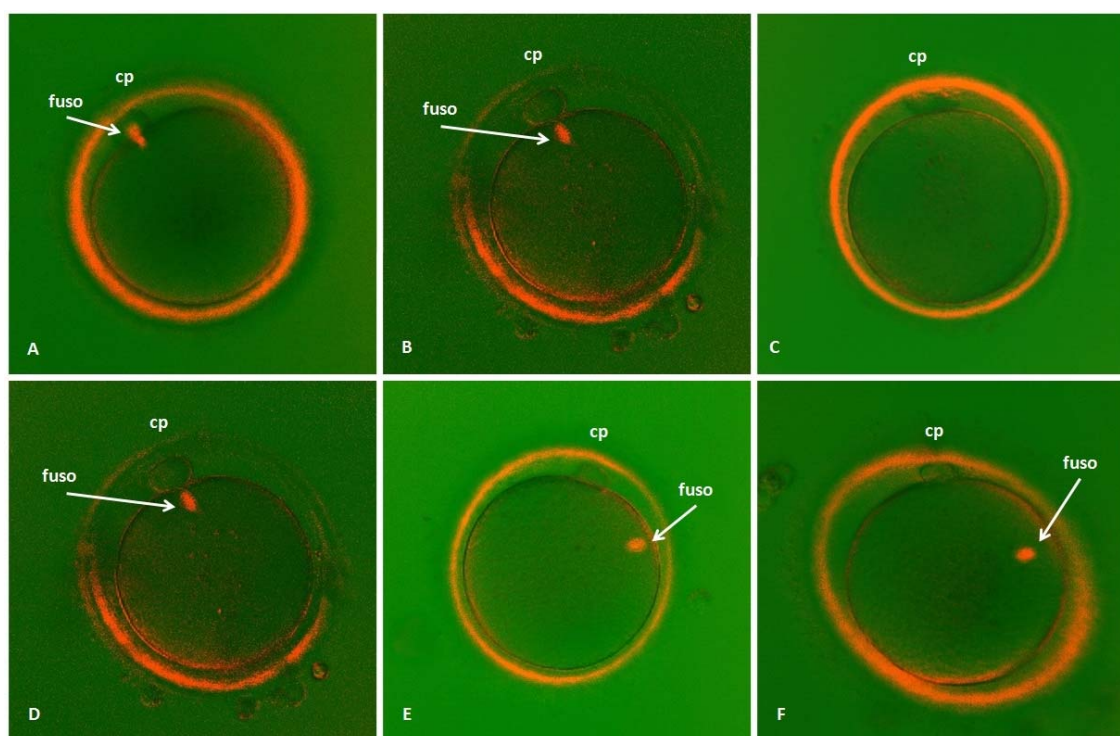


Figura 1. Oócitos humanos com extrusão do primeiro corpúsculo polar (CP) avaliados pela microscopia de polarização imediatamente antes da realização da Injeção Intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI). (A) Fuso celular em telófase I. (B) Fuso celular visível em metáfase II. (C) Fuso celular não visível em metáfase II. (D) Fuso celular formando ângulo de 0 a 30 ° em relação ao primeiro CP. (E) Fuso celular formando ângulo de 30 a 60 ° em relação ao primeiro CP. (F) Fuso celular formando ângulo de 60 a 90 ° em relação ao primeiro CP.

Tabela 1 - Comparação dos parâmetros da estimulação ovariana controlada e os resultados de Injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) entre mulheres inférteis do grupo controle (fatores tubários e/ou masculinos) e do grupo endometriose.

Variáveis	Controle	Endometriose		p
		I – II	III – IV	
Idade (anos)	32,8 ± 3,8	33 ± 3	33,5 ± 3,6	0,73
Número de pacientes	52	23	19	-
Número de ciclos iniciados	60	26	21	-
Dose FSH total (UI)	1973 ± 654,6	1709 ± 554,9	2263 ± 671,7	0,02
Duração da estimulação ovariana (dias)	9,1 ± 1,6	8,7 ± 1,3	9,3 ± 1,6	0,36
Folículos entre 14 – 17 mm	4,6 ± 2,4	4,2 ± 2,7	3,6 ± 3,2	0,19
Folículos ≥ 18 mm	4 ± 2,8	3,2 ± 1,8	2 ± 2,2	0,02
Endométrio (mm)	11 ± 2,4	10,1 ± 1,5	10,5 ± 2	0,38
Número de ciclos com captação	60	26	21	-
Número de oócitos captados	6,8 ± 3,9	6,9 ± 3,8	5 ± 3,6	0,38
Número de oócitos maduros	5,2 ± 3,4	5 ± 3,1	3,4 ± 2,9	0,23
Número de oócitos fertilizados	3,4 ± 1,8	3,6 ± 1,6	2,3 ± 1,6	0,03
Taxa de Fertilização (%)	80 (203/254)	80 (92/115)	68 (49/72)	0,08
Taxa de Clivagem (%)	84,2 (171/203)	87 (80/92)	90 (44/49)	0,56
Número de ciclos com transferência	57	25	19	-
% de ciclos com pelo menos um embrião de boa qualidade transferido em D2	21 (12/57)	40 (10/25)	37 (7/19)	0,51
Taxa de Gravidez Química (%)	35 (20/57)	48 (12/25)	37 (7/19)	0,15

Média ± desvio padrão. Diferença significativa: $p < 0,05$.

Oócitos maduros: oócitos com primeiro corpúsculo polar visível;

Taxa de Fertilização: número de oócitos fertilizados/número de oócitos injetados x 100;

Taxa de Clivagem: número de oócitos clivados/número de oócitos fertilizados x 100

% de ciclos com pelo menos um embrião de boa qualidade transferido em D2: número de ciclos com pelo menos um embrião com 4 células, simétricas e sem fragmentação em D2/número de ciclos com transferência x 100

Tabela 2 - Análise não invasiva do grau de maturação nuclear e presença/localização do fuso celular de oócitos com o primeiro corpúsculo polar visível obtidos de ciclos estimulados de pacientes inférteis do grupo controle (fatores tubários e/ou masculinos) e do grupo endometriose.

Variáveis	Controle	Endometriose	
		I – II	III – IV
Maturação Nuclear			
- Telófase I (%)	3,5 (9/254)	0	5,6 (4/72)*
- Metáfase II (%)	96,5 (245/254)	100 (115/115)	94,4 (68/72)
Fuso visualização			
- Não visível (%)	11,4 (28/245)	8,7 (10/115)	11,8 (8/68)
- Visível (%)	88,6 (217/245)	91,3 (105/115)	88,2 (60/68)
Fuso Localização			
- 0° – 30° (%)	85,7 (186/217)	80 (84/105)	80 (48/60)
- 30° – 60° (%)	11,1 (24/217)	18,1 (19/105)	13,3 (8/60)
- 60° – 90°(%)	3,2 (7/217)	1,9 (2/105)	5 (3/60)
- 90° – 120°(%)	0	0	1,7 (1/60)

*P=0,02. Diferença significativa: $p < 0,05$.

Tabela 3 - Taxas de fertilização, clivagem e número de embriões de boa qualidade no segundo e terceiro dia de desenvolvimento provenientes de oócitos humanos injetados em metáfase II ou telófase I nos grupos controle, endometriose, grupo endometriose mínima e leve e endometriose moderada e severa.

Grupo	Variável	Maturação nuclear		p
		Metáfase II	Telófase I	
		% (n/N)	% (n/N)	
Controle	Taxa de fertilização	80,8 (198/245)	55,6 (05/09)	0,08
	Taxa de Clivagem	84,3 (167/198)	80 (04/05)	0,58
	Embrião 4.1.0	12,6 (21/167)	0	-
	Embrião 8.1.0	11,5 (12/104)	0	-
Endometriose	Taxa de fertilização	76,5 (140/183)	25 (01/04)	0,05
	Taxa de Clivagem	87,9 (123/140)	100 (01/01)	1
	Embrião 4.1.0	17 (21/123)	0	-
	Embrião 8.1.0	18,5 (12/65)	0	-
Endometriose I – II	Taxa de fertilização	80 (92/115)	0	-
	Taxa de Clivagem	87 (80/92)	0	-
	Embrião 4.1.0	17,5 (14/80)	0	-
	Embrião 8.1.0	19 (08/42)	0	-
Endometriose III – IV	Taxa de fertilização	70,6 (48/68)	25 (01/04)	0,09
	Taxa de Clivagem	89,6 (43/48)	100 (01/01)	1
	Embrião 4.1.0	16,3 (07/43)	0	0
	Embrião 8.1.0	17,4 (04/23)	0	0

Diferença significativa: $p < 0,05$.

Taxa de Fertilização: número de oócitos fertilizados (n)/número de oócitos injetados (N) x 100;

Taxa de Clivagem: número de oócitos clivados (n)/número de oócitos fertilizados (N) x 100

Embrião 4.1.0: número de embriões com 4 células, simétricas e sem fragmentação em D2 (n)/número de embriões formados em D2 (N) x 100

Embrião 8.1.0: número de embriões com 8 células, simétricas e sem fragmentação em D3 (n)/número de embriões formados em D3 (N) x 100

Tabela 4 - Taxas de fertilização, clivagem e número de embriões de boa qualidade no segundo e terceiro dia de desenvolvimento provenientes de oócitos humanos injetados em metáfase II com ou sem fusão celular visível pela microscopia de polarização nos grupos controle, endometriose, grupo endometriose mínima e leve e endometriose moderada e severa.

Grupo	Variável	Fuso		p
		Visível % (n/N)	Não visível % (n/N)	
Controle	Taxa de fertilização	82 (178/217)	71,4 (20/28)	0,2
	Taxa de Clivagem	83,1 (148/178)	95 (19/20)	0,33
	Embrião 4.1.0	12,2 (18/148)	15,8 (03/19)	0,7
	Embrião 8.1.0	11,5 (11/96)	12,5 (01/08)	1
Endometriose	Taxa de fertilização	77,6 (128/165)	66,7 (12/18)	0,38
	Taxa de Clivagem	86,7 (111/128)	100 (12/12)	0,36
	Embrião 4.1.0	15,3 (17/111)	33,3 (04/12)	0,12
	Embrião 8.1.0	18,5 (12/65)	0	-
Endometriose I – II	Taxa de fertilização	81,9 (86/105)	60 (06/10)	0,11
	Taxa de Clivagem	86 (74/86)	100 (06/06)	1
	Embrião 4.1.0	16,2 (12/74)	33,3 (02/06)	0,28
	Embrião 8.1.0	19 (08/42)	0	-
Endometriose III – IV	Taxa de fertilização	70 (42/60)	75 (06/08)	1
	Taxa de Clivagem	88,1 (37/42)	100 (06/06)	1
	Embrião 4.1.0	13,5 (05/37)	33,3 (02/06)	0,24
	Embrião 8.1.0	17,4 (04/23)	0	-

Diferença significativa: $p < 0,05$.

Taxa de Fertilização: número de oócitos fertilizados (n)/número de oócitos injetados (N) x 100;

Taxa de Clivagem: número de oócitos clivados (n)/número de oócitos fertilizados (N) x 100

Embrião 4.1.0: número de embriões com 4 células, simétricas e sem fragmentação em D2 (n)/número de embriões formados em D2 (N) x 100

Embrião 8.1.0: número de embriões com 8 células, simétricas e sem fragmentação em D3 (n)/número de embriões formados em D3 (N) x 100

6. Discussão

Encontramos resultados controversos acerca dos resultados da reprodução assistida em pacientes com endometriose, o que vem sendo foco de diversos estudos e hipóteses (AZEM et al., 1999; GARCIA-VELASCO e ARICI, 1999; GARRIDO et al., 2000; AL-FADHLI et al., 2006). Estas discrepâncias parecem ser multifatoriais, uma vez que esses resultados podem ser afetados por diferentes variáveis, como o protocolo de estimulação ovariana utilizado, os critérios de seleção das pacientes avaliadas nos diferentes estudos, os procedimentos laboratoriais efetuados, a técnica de transferência embrionária usada, entre outros fatores.

Dados de uma meta-análise de oito estudos relevantes (BARNHART et al., 2002) sugeriram que a implantação está comprometida de forma significativa em pacientes com endometriose e que a qualidade embrionária é ruim, possivelmente refletindo a má qualidade oocitária. A qualidade oocitária, por sua vez, depende da adequada aquisição da maturação citoplasmática e nuclear, sendo a última dependente da presença de um fuso celular normal.

O fuso meiótico, estrutura fundamental no processo de desenvolvimento oocitário, precisa manter a sua integridade e funcionabilidade para que o oócito maduro esteja preparado para a fertilização. Esta estrutura é extremamente sensível à ação de diversos fatores, entre os quais podemos citar o estresse oxidativo, passível de promover anomalias meióticas, instabilidade cromossômica, indução da apoptose e comprometimento do desenvolvimento embrionário pré-implantação. (LIU et al., 2003; NAVARRO et al., 2004; NAVARRO et al., 2006).

Alguns autores (MANSOUR et al., 2007) demonstraram danos significativos ao DNA e aumento de anomalias cromossômicas em oócitos maduros de camundongos, quando incubados com o fluido peritoneal de pacientes com endometriose. Esses resultados foram evitados quando houve suplementação do antioxidante L-carnitina nessa cultura; sugerindo que o estresse oxidativo esteja envolvido no comprometimento da qualidade oocitária em portadoras de endometriose (MANSOUR et al., 2009). Outros 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 (STADTMAN, 1992; BERLETT e STADTMAN, 1997), algumas das quais são importantes para a organização do fuso celular (ANTONIO et al., 2000; FUNABIKI e MURRAY, 2000; ABRIEU et al., 2001) e, ao mesmo tempo ou independentemente, lesar o DNA e induzir o inadequado alinhamento cromossômico (BECKMAN e AMES, 1998; LIMOLI et al., 1998) produzindo, desta forma, anormalidades no ciclo celular.

Diferentes metodologias podem ser utilizadas com a finalidade de avaliar o fuso celular oocitário, entre as quais citamos a microscopia de polarização, que permite a observação e caracterização de estruturas birrefringentes em células vivas, sem a necessidade de fixação (PETERSEN et al., 2009). Trata-se de metodologia inócua, que permite a utilização dos oócitos avaliados para a realização de ICSI, sem comprometimento do desenvolvimento embrionário subsequente.

Observou-se neste estudo que o fuso meiótico foi visualizado em 89,3% dos oócitos examinados, estando de acordo com dados na literatura onde a visualização do fuso celular pode variar entre 62,8 a 91% (RIENZI et al., 2003; MADASCHI et al., 2008). A alta percentagem de oócitos com fuso celular visível evidenciada neste estudo, nos três grupos analisados, pode ser atribuída ao rigoroso controle metodológico, incluindo a incubação dos oócitos por uma hora após desnudamento e o adequado controle das condições ambientais (manutenção da temperatura e pH ideais e limitado tempo de exposição à luz durante a análise e fora da incubadora) (ROBERTS et al., 2002).

Com relação à localização do fuso celular, não observamos diferença significativa entre os grupos em relação à localização do fuso celular oocitário. Oitenta e três por cento do total de oócitos com fusos celulares visíveis estavam localizados entre 0° – 30° em relação ao corpúsculo polar, sendo pequena a percentagem de oócitos com fusos celulares localizados

entre 60 e 90° em relação ao primeiro CP nos três grupos analisados. Estudos na literatura, que avaliaram a relação do ângulo formado entre o corpúsculo polar e o fuso celular e as respectivas taxas de fertilização, evidenciaram que quando esse ângulo é menor do que 90° não há comprometimento desta variável (RIENZI et al., 2003; FANG et al., 2007). Desta forma, sugerimos que a localização do fuso celular oocitário em posições anômalas não seria uma variável responsável pela piora da qualidade oocitária em portadoras de infertilidade relacionada à endometriose.

Dados de uma meta-análise (PETERSEN et al., 2009) evidenciaram aumento significativo na taxa de fertilização, clivagem e de embriões de boa qualidade no terceiro dia de desenvolvimento de oócitos com fuso celular visível quando comparados àqueles sem fuso celular visível. Esses resultados sugerem que a presença do fuso celular poderia ser um fator de predição para se obter maiores taxas de fertilização, clivagem e de embriões de boa qualidade em D3. Nossos resultados foram discordantes com a literatura, pois não observamos diferença significativa entre as taxas de fertilização e de clivagem quando avaliamos a presença ou não de fuso celular visível nos grupos estudados. Todavia, ressaltamos que, nas pacientes portadoras de endometriose, nenhum dos oócitos sem fuso celular visível que fertilizou e clivou formou embriões de boa qualidade no terceiro dia de desenvolvimento, sugerindo uma associação positiva entre a ausência de fuso celular visível em oócitos de mulheres inférteis com endometriose e a não formação de embriões de boa qualidade em D3.

Oócitos em telófase I ainda não finalizaram a meiose I mas podem apresentar, à microscopia óptica, características morfológicas semelhantes a oócitos que completaram a meiose I e estão em metáfase II (HYUN et al., 2007). No presente estudo observou-se um aumento significativo de oócitos maturados *in vivo*, que, apesar de aparentemente maduros, estavam em telófase I, nas pacientes com infertilidade relacionada à endometriose moderada e

severa. Esses dados corroboram achados recentes em que se evidenciou uma tendência a maior proporção de telófase I em oócitos maturados *in vitro* obtidos de ciclos estimulados de pacientes com endometriose, quando comparados ao grupo controle (BARCELOS et al., 2009). O presente achado agrega a informação de que este potencial atraso ou comprometimento da meiose I ocorra não apenas nos oócitos maturados *in vitro*, como também naqueles maturados *in vivo* nas portadoras de infertilidade relacionada à endometriose. Convém ressaltar que no presente estudo este achado foi observado apenas no subgrupo de pacientes com endometriose III/IV, sugerindo que a severidade da doença possa estar associada ao comprometimento da conclusão da meiose I e, conseqüentemente, à piora da qualidade oocitária.

As anomalias meióticas podem, por sua vez, contribuir para a falência do desenvolvimento celular por meio de diferentes vias, que vão desde a inabilidade do oócito em completar o processo de maturação, tornando-se incapaz de ser fertilizado, até a ocorrência de erros variáveis no processo de maturação meiótica que não impossibilitam a fertilização, mas, contudo, podem comprometer o desenvolvimento embrionário pré e/ou pós-implantação, bem como a viabilidade futura do conceito (PAVLOK et al., 1992; LONERGAN et al., 1994; ARMSTRONG, 2001). Assim, qualquer alteração no complemento cromossômico, que possa ser originada por uma alteração do fuso meiótico, poderia conduzir a um estado de aneuploidia por não-disjunção, junção desbalanceada ou disjunção prematura das cromátides e perda de cromossomos, (VAN BLERKOM e HENRY, 1992; BATTAGLIA et al., 1996; MANDELBAUM et al., 2004) comprometendo o desenvolvimento embrionário.

Alguns autores (HYUN et al., 2007) demonstraram que oócitos maturados *in vitro* que, apesar de aparentemente maduros (com primeiro CP visível), estavam em telófase I, segundo análise por microscopia de polarização, apresentaram taxa de fertilização significativamente menor do que os oócitos que concluíram a meiose I (15,8% x 80%,

respectivamente). No nosso estudo, também observamos uma diminuição significativa das taxas de fertilização quando analisamos o total de oócitos maturados *in vivo* que foram injetados em telófase I quando comparados ao total de oócitos injetados em metáfase II (46,1% x 79%, respectivamente) e uma tendência a diminuição dessas taxas nos grupos controle e endometriose III/IV, quando estudados individualmente. A ampliação da presente casuística poderá permitir a aquisição de significância estatística nestes grupos. Além disso, os oócitos em telófase I que clivaram não formaram embriões de boa qualidade, tanto em D2 quanto em D3 em ambos os grupos. Com base nos dados analisados sugere-se que a utilização de oócitos com o primeiro CP visualizado, em telófase I (ou seja, que, apesar de aparentemente maduros, não concluíram a meiose I) em procedimentos de reprodução assistida (ICSI) esteja associada a piores prognósticos relativos ao sucesso gestacional subsequente, relativos tanto a menores taxas de fertilização, como formação de embriões de boa qualidade.

Nas pacientes inférteis com endometriose III/IV o aumento significativo de oócitos em telófase I poderia contribuir para o número significativamente menor de oócitos fertilizados neste grupo, observado na casuística analisada, corroborando estudos que evidenciaram piores taxas de fertilização em portadoras de infertilidade relacionada à endometriose (AZEM et al., 1999; AL-FADHLI et al., 2006). É possível que a análise do estágio de maturação nuclear oocitária possa ser utilizada como fator de predição das taxas de fertilização neste grupo de pacientes, o que precisa ser analisado em estudos com maiores casuísticas. É possível que se postergarmos a inseminação dos oócitos em telófase I, especialmente nas portadoras de endometriose moderada e severa, possamos ter um melhor resultado dos procedimentos de reprodução assistida, o que precisa ser avaliado por meio de estudo com metodologias pertinentes.

7. Conclusões

Não observamos diferença significativa entre os grupos analisados quanto à visualização e localização do fuso celular em oócitos maturados *in vivo* com o primeiro CP visível. Todavia, observamos um aumento significativo de oócitos em telófase I nos oócitos de portadoras de endometriose moderada e severa, sugerindo um retardo ou comprometimento na conclusão da meiose I. Considerando que os oócitos injetados em telófase I apresentam piores taxas de fertilização do que os injetados em metáfase II, este achado poderia justificar o comprometimento dos resultados de reprodução assistida em mulheres inférteis com endometriose moderada e severa. A análise não invasiva do fuso celular oocitário, por meio da microscopia de polarização, pode ser utilizada como fator de predição das taxas de fertilização e qualidade oocitária pós-ICSI neste grupo de pacientes, o que precisará ser mais bem analisado ampliando-se a presente casuística.

8. 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.

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.

ALBERTINI, D.F. Cytoplasmic microtubular dynamics and chromatin organization during mammalian oogenesis and oocyte maturation. *Mutat Res*, v.296, n.1-2, Dec, p.57-68. 1992.

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.

AZEM, F. et al. Patients with stages III and IV endometriosis have a poorer outcome of in vitro fertilization-embryo transfer than patients with tubal infertility. *Fertil Steril*, v.72, n.6, Dec, p.1107-9. 1999.

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. et al. Effect of endometriosis on in vitro fertilization. *Fertil Steril*, v.77, n.6, Jun, p.1148-55. 2002.

BATTAGLIA, D.E. et al. Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women. *Hum Reprod*, v.11, n.10, Oct, p.2217-22. 1996.

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

BELIARD, A. et al. Localization of laminin, fibronectin, E-cadherin, and integrins in endometrium and endometriosis. *Fertil Steril*, v.67, n.2, Feb, p.266-72. 1997.

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.

CANIPARI, R. Oocyte--granulosa cell interactions. *Hum Reprod Update*, v.6, n.3, May-Jun, p.279-89. 2000.

CHARRASSE, S. et al. The Xenopus XMAP215 and its human homologue TOG proteins interact with cyclin B1 to target p34cdc2 to microtubules during mitosis. *Exp Cell Res*, v.254, n.2, Feb 1, p.249-56. 2000.

COLLAS, P. Sequential PKC- and Cdc2-mediated phosphorylation events elicit zebrafish nuclear envelope disassembly. *J Cell Sci*, v.112 (Pt 6), Mar, p.977-87. 1999.

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.

DONNEZ, J. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. *Hum Reprod*, v.13, n.6, Jun, p.1686-90. 1998.

EBNER, T. et al. Elective transfer of embryos selected on the basis of first polar body morphology is associated with increased rates of implantation and pregnancy. *Fertil Steril*, v.72, n.4, Oct, p.599-603. 1999.

EICHENLAUB-RITTER, U. et al. Manipulation of the oocyte: possible damage to the spindle apparatus. *Reprod Biomed Online*, v.5, n.2, Sep-Oct, p.117-24. 2002.

ELGINDY, E.A. et al. Anti-Mullerian hormone: correlation of early follicular, ovulatory and midluteal levels with ovarian response and cycle outcome in intracytoplasmic sperm injection patients. *Fertil Steril*, v.89, n.6, Jun, p.1670-6. 2008.

FANG, C. et al. Visualization of meiotic spindle and subsequent embryonic development in in vitro and in vivo matured human oocytes. *J Assist Reprod Genet*, v.24, n.11, Nov, p.547-51. 2007.

FERREIRA, E.M. et al. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*, v.71, n.5, Mar 15, p.836-48. 2009.

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.

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

GUTIERREZ-MATEO, C. et al. Aneuploidy study of human oocytes first polar body comparative genomic hybridization and metaphase II fluorescence in situ hybridization analysis. *Hum Reprod*, v.19, n.12, Dec, p.2859-68. 2004.

HALME, J. et al. Accentuated cyclic activation of peritoneal macrophages in patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*, v.148, n.1, Jan 1, p.85-90. 1984.

HASHIMOTO, N.; KISHIMOTO, T. Regulation of meiotic metaphase by a cytoplasmic maturation-promoting factor during mouse oocyte maturation. *Dev Biol*, v.126, n.2, Apr, p.242-52. 1988.

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.

HYUN, C.S. et al. Optimal ICSI timing after the first polar body extrusion in in vitro matured human oocytes. *Hum Reprod*, v.22, n.7, Jul, p.1991-5. 2007.

JACKSON, L.W. et al. Oxidative stress and endometriosis. *Hum Reprod*, v.20, n.7, Jul, p.2014-20. 2005.

KAHRAMAN, S. et al. Relationship between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, v.15, n.11, Nov, p.2390-3. 2000.

KATSOFF, B. et al. 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*, v.33, n.4, p.201-2. 2006.

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

KOKS, C.A. et al. Menstruum induces changes in mesothelial cell morphology. *Gynecol Obstet Invest*, v.50, n.1, p.13-8. 2000.

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. A reliable, noninvasive technique for spindle imaging and enucleation of mammalian oocytes. *Nat Biotechnol*, v.18, n.2, Feb, p.223-5. 2000.

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.

MADASCHI, C. et al. Spindle imaging: a marker for embryo development and implantation. *Fertil Steril*, v.90, n.1, Jul, p.194-8. 2008.

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. DNA damage to embryos incubated in the peritoneal fluid of patients with endometriosis: role in infertility. *Fertility and sterility*, v.88, p.S311. 2007.

MATTSON, B.A.; ALBERTINI, D.F. Oogenesis: chromatin and microtubule dynamics during meiotic prophase. *Mol Reprod Dev*, v.25, n.4, Apr, p.374-83. 1990.

MIYARA, F. et al. Multiparameter analysis of human oocytes at metaphase II stage after IVF failure in non-male infertility. *Hum Reprod*, v.18, n.7, Jul, p.1494-503. 2003.

MOON, J.H. et al. Visualization of the metaphase II meiotic spindle in living human oocytes using the Polscope enables the prediction of embryonic developmental competence after ICSI. *Hum Reprod*, v.18, n.4, Apr, p.817-20. 2003.

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. Relationship between first polar body morphology before intracytoplasmic sperm injection and fertilization rate, cleavage rate, and embryo quality. *Int J Gynaecol Obstet*, v.104, n.3, Mar, p.226-9. 2009.

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. et al. 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.

NAVARRO, P.A. et al. Noninvasive imaging of spindle dynamics during mammalian oocyte activation. *Fertil Steril*, v.83 Suppl 1, Apr, p.1197-205. 2005.

OOKATA, K. et al. Relocation and distinct subcellular localization of p34cdc2-cyclin B complex at meiosis reinitiation in starfish oocytes. *EMBO J*, v.11, n.5, May, p.1763-72. 1992.

PAVLOK, A. et al. 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. Endometrial quality in infertile women with endometriosis. *Ann N Y Acad Sci*, v.943, Sep, p.122-30. 2001.

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.

PETERSEN, C.G. et al. Relationship between visualization of meiotic spindle in human oocytes and ICSI outcomes: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online*, v.18, n.2, Feb, p.235-43. 2009.

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

RIENZI, L. et al. Relationship between meiotic spindle location with regard to the polar body position and oocyte developmental potential after ICSI. *Hum Reprod*, v.18, n.6, Jun, p.1289-93. 2003.

ROBERTS, R. et al. Culture environment modulates maturation and metabolism of human oocytes. *Hum Reprod*, v.17, n.11, Nov, p.2950-6. 2002.

SAMPSON, J.A. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol*, v.14, p.422-69. 1927.

SANTANAM, N. et al. Macrophages, oxidation, and endometriosis. *Ann N Y Acad Sci*, v.955, Mar, p.183-98; discussion 19-200, 396-406. 2002.

SELAM, B.; ARICI, A. Implantation defect in endometriosis: endometrium or peritoneal fluid. *J Reprod Fertil Suppl*, v.55, p.121-8. 2000.

SERHAL, P.F. et al. Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, v.12, n.6, Jun, p.1267-70. 1997.

SOMIGLIANA, E. et al. Human endometrial stromal cells as a source of soluble intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 molecules. *Hum Reprod*, v.11, n.6, Jun, p.1190-4. 1996.

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

SUN, Q.Y. et al. Role of the MAPK cascade in mammalian germ cells. *Reprod Fertil Dev*, v.11, n.7-8, p.443-50. 1999.

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.

VAN BLERKOM, J.; HENRY, G. Oocyte dysmorphism and aneuploidy in meiotically mature human oocytes after ovarian stimulation. *Hum Reprod*, v.7, n.3, Mar, p.379-90. 1992.

VAN LANGENDONCKT, A. et al. Oxidative stress and peritoneal endometriosis. *Fertil Steril*, v.77, n.5, May, p.861-70. 2002.

VERDE, F. et al. Control of microtubule dynamics and length by cyclin A- and cyclin B-dependent kinases in *Xenopus* egg extracts. *J Cell Biol*, v.118, n.5, Sep, p.1097-108. 1992.

VERDE, F. et al. Regulation of microtubule dynamics by cdc2 protein kinase in cell-free extracts of *Xenopus* eggs. *Nature*, v.343, n.6255, Jan 18, p.233-8. 1990.

VINATIER, D. et al. Is endometriosis an endometrial disease? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, v.91, n.2, Aug, p.113-25. 2000.

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.

WANG, W.H. et al. Developmental ability of human oocytes with or without birefringent spindles imaged by Polscope before insemination. *Hum Reprod*, v.16, n.7, Jul, p.1464-8. 2001.

WANG, W.H. et al. Rigorous thermal control during intracytoplasmic sperm injection stabilizes the meiotic spindle and improves fertilization and pregnancy rates. *Fertil Steril*, v.77, n.6, Jun, p.1274-7. 2002.

XIA, P. Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality. *Hum Reprod*, v.12, n.8, Aug, p.1750-5. 1997.

ANEXO A – Termo Consentimento Livre e Esclarecido para pacientes inférteis por fatores tubários e/ou masculino (grupo controle).

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE
RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**
Campos Universitário Monte Alegre - Fone: 3602-1000 - Fax: 3633-1144
CEP: 14048-900 Ribeirão Preto - São Paulo.

1. NOME DA PESQUISA: “Avaliação do balanço oxidante e antioxidante em mulheres inférteis com endometriose e Síndrome dos Ovários Policísticos submetidas à indução da ovulação para a realização de procedimentos de reprodução assistida de alta complexidade”

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

Você está sendo convidada a participar da pesquisa intitulada “Avaliação do balanço oxidante e antioxidante em mulheres inférteis com endometriose e Síndrome dos Ovários Policísticos submetidas à indução da ovulação para a realização de procedimentos de reprodução assistida de alta complexidade”

Sabemos que o estresse oxidativo compromete a fertilidade masculina. Temos suspeita de que o estresse oxidativo também possa comprometer a fertilidade feminina, porém os dados disponíveis até o presente momento são escassos e controversos. A endometriose e a Síndrome dos Ovários Policísticos (SOMP) são causas bastante comuns de dificuldade para engravidar (denominada infertilidade) e aventa-se a possibilidade do estresse oxidativo participar da ocorrência destas duas freqüentes doenças, podendo, inclusive, contribuir para a infertilidade associada às mesmas. Desta forma, determinar os níveis de substâncias oxidantes e antioxidantes, no sangue e no fluido folicular (fluido contido no folículo onde os óvulos se desenvolvem) de mulheres inférteis com estas doenças poderia auxiliar a descobrir alguns dos mecanismos envolvidos na causa da infertilidade, o que, poderia auxiliar na identificação de tratamentos futuros. Contudo, para podermos dizer se os níveis de substâncias oxidantes e antioxidantes, no sangue e no fluido folicular de mulheres inférteis com estas doenças, são diferentes daqueles de mulheres inférteis sem estas doenças, precisamos comparar os mesmos com os provenientes de um grupo de pacientes tido como grupo controle, ou seja, cujos níveis sejam considerados como padrão de normalidade, aonde você estaria incluída.

É possível que a estimulação da ovulação, que você realizará com o uso de medicações específicas, possa alterar o balanço de substâncias oxidantes e antioxidantes, no sangue e no fluido folicular. Para avaliarmos se isto é verdadeiro, propomos avaliar os níveis de diferentes substâncias oxidantes e antioxidantes no sangue (em quatro diferentes momentos, quando vocês vêm normalmente a este serviço, visando a realização de procedimentos de reprodução assistida: no dia da consulta pré-basal, no dia de início da estimulação da ovulação, no dia em que for prescrito o uso da gonadotrofina coriônica humana e no dia da realização da captação de óvulos). Desta forma, autorizo a realização de coleta de sangue venoso, nos 4 dias propostos. Fui informada de que o procedimento pode ocasionar discreta dor local, podendo aparecer hematomas no local da punção. Também autorizo a utilização do fluido folicular e das células da granulosa (células que envolvem o óvulo, representando a parede do folículo ovariano) obtidos, 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. Fui informada de que, após o isolamento dos óvulos, o fluido folicular e as células da granulosa (que ficam misturadas ao fluido) são desprezados, uma vez que não apresentam qualquer utilidade para o procedimento de reprodução ao qual serei submetida. Fui informada de que será realizada a análise dos níveis de algumas substâncias oxidantes e antioxidantes no fluido folicular, assim como a avaliação da capacidade antioxidante das células da granulosa (por meio da análise da expressão de enzimas envolvidas na neutralização das substâncias oxidantes).

Temos indícios de que o estresse oxidativo possa também comprometer a qualidade dos óvulos, levando a redução das chances de gravidez, mesmo quando se realizam procedimentos de reprodução assistida. Nas mulheres inférteis com endometriose e SOMP, 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. Contudo, na atualidade, não se realiza a avaliação adequada da qualidade oocitária, devido à ausência de métodos bem estabelecidos capazes de predizer se os óvulos são bons ou não.

A identificação da presença de alterações nos óvulos de pacientes portadoras de endometriose e SOMP, não somente ajudaria a elucidar um dos possíveis mecanismos causadores da infertilidade, como também abriria perspectivas futuras de tratamento para este grupo de pacientes. Contudo, para podermos dizer se os óvulos destas pacientes com endometriose ou SOMP são ou não são de boa qualidade, precisamos comparar a qualidade dos mesmos com a de óvulos provenientes de um grupo de pacientes tido como grupo controle, ou seja, cuja qualidade dos óvulos seja considerada como padrão de normalidade. Desta forma, você está sendo convidada para participar deste estudo na posição de paciente do grupo controle, ou seja, cujos óvulos sejam considerados como padrão de normalidade, para fins de comparação com os óvulos das pacientes com endometriose e SOMP.

Uma forma indireta de avaliarmos a qualidade dos seus óvulos, sem lhe causar qualquer risco adicional ou prejuízo do sucesso de você engravidar durante este procedimento de reprodução assistida, seria analisar a presença de algumas características dos seus óvulos (como uma estrutura microscópica em seu interior chamada de “fuso celular”, um dos possíveis responsáveis pela qualidade dos seus oócitos), por meio de um microscópio de polarização, que não ocasiona qualquer dano aos óvulos e nem ao desenvolvimento dos embriões gerados a partir destes óvulos. Devemos, portanto, ressaltar que o estudo dos seus óvulos usando esta microscopia de polarização, não vai interferir no seu tratamento para engravidar, assim como não causará prejuízo algum para a sua saúde, nem para a do futuro bebê. Ressaltamos que a utilização desta metodologia já ocorre de rotina na prática diária do laboratório de reprodução do presente serviço, sendo que apenas solicitamos a autorização para utilizar os dados obtidos por meio da utilização desta metodologia.

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, com exceção da coleta de sangue no dia de início de estimulação da ovulação, no dia em que for prescrito o uso da gonadotrofina coriônica humana e no dia da realização da captação de óvulos, como descrito acima.

Sua colaboração, portanto, no fornecimento de amostras de sangue, fluido folicular e células da granulosa, bem como autorizando a utilizar os dados obtidos com o uso da microscopia de polarização dos seus óvulos, será imprescindível para um melhor conhecimento do balanço oxidante e antioxidante e qualidade dos oócitos de pacientes com dificuldade para engravidar devido à Endometriose e SOMP. Este conhecimento no futuro poderá ser usado no sentido de propiciar um tratamento mais eficaz da infertilidade associada à Endometriose e à SOMP. É importante ressaltarmos que este estudo não trará nenhuma despesa para você e seu companheiro. Todo o material obtido será utilizado exclusivamente para a avaliação do balanço oxidante/antioxidante no sangue, fluido folicular e células da granulosa, e análise das características dos óvulos (não poderão ser utilizados para outros fins que não os desta pesquisa). Autorizo, caso haja amostras remanescentes de materiais colhidos (sangue, fluido folicular e células da granulosa), ao armazenamento das mesmas, sendo que somente poderão ser utilizadas para a realização de pesquisas futuras, caso eu dê a minha autorização expressa, mediante a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido específico da nova(s) pesquisa(s). No caso de haver amostras remanescentes, eu assinarei um termo de consentimento específico, autorizando a sua estocagem e onde conste os tipos e quantidades de alíquotas armazenadas.

3. INFORMAÇÕES ADICIONAIS: Todos 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 de sangue, fluido folicular e células da granulosa, bem como autorizando a utilizar os dados obtidos com o uso da microscopia de polarização dos meus óvulos,. Autorizo a pesquisadora abaixo mencionada a utilizá-los para a pesquisa : “Avaliação do balanço oxidante e antioxidante em mulheres inférteis com endometriose e Síndrome dos Ovários Policísticos submetidas à indução da ovulação para a realização de procedimentos de reprodução assistida de alta complexidade”, 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.

ANEXO B – Termo Consentimento Livre e Esclarecido para pacientes inférteis com endometriose.

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE
RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Campos Universitário Monte Alegre - Fone: 3602-1000 - Fax: 3633-1144
CEP: 14048-900 Ribeirão Preto - São Paulo.

1. NOME DA PESQUISA: “Avaliação do balanço oxidante e antioxidante em mulheres inférteis com endometriose e Síndrome dos Ovários Policísticos submetidas à indução da ovulação para a realização de procedimentos de reprodução assistida de alta complexidade”

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

Você está sendo convidada a participar da pesquisa intitulada “Avaliação do balanço oxidante e antioxidante em mulheres inférteis com endometriose e Síndrome dos Ovários Policísticos submetidas à indução da ovulação para a realização de procedimentos de reprodução assistida de alta complexidade”, na qualidade de membro do grupo de pacientes portadoras de endometriose.

Sabemos que o estresse oxidativo compromete a fertilidade masculina. Temos suspeita de que o estresse oxidativo também possa comprometer a fertilidade feminina, porém os dados disponíveis até o presente momento são escassos e controversos. A endometriose e a Síndrome dos Ovários Policísticos (SOMP) são causas bastante comuns de dificuldade para engravidar (denominada infertilidade) e aventa-se a possibilidade do estresse oxidativo participar da ocorrência destas duas freqüentes doenças, podendo, inclusive, contribuir para a infertilidade associada as mesmas. Desta forma, determinar os níveis de substâncias oxidantes e antioxidantes, no sangue e no fluido folicular (fluido contido no folículo onde os óvulos se desenvolvem) de mulheres inférteis com estas doenças poderia auxiliar a descobrir alguns dos mecanismos envolvidos na causa da infertilidade, o que, poderia auxiliar na identificação de tratamentos futuros.

É possível que a estimulação da ovulação, que você realizará com o uso de medicações específicas, possa alterar o balanço de substâncias oxidantes e antioxidantes, no sangue e no fluido folicular. Para avaliarmos se isto é verdadeiro, propomos avaliar os níveis de diferentes substâncias oxidantes e antioxidantes no sangue (em quatro diferentes momentos, quando vocês vêm normalmente a este serviço, visando a realização de procedimentos de reprodução assistida: no dia da consulta pré-basal, no dia de início de estimulação da ovulação, no dia em que for prescrito o uso da gonadotrofina coriônica humana e no dia da realização da captação de óvulos). Desta forma, autorizo a realização de coleta de sangue venoso, nos 4 dias propostos. Fui informada de que o procedimento pode ocasionar discreta dor local, podendo aparecer hematomas no local da punção. Também autorizo a utilização do fluido folicular e das células da granulosa (células que envolvem o óvulo, representando a parede do folículo ovariano) obtidos, 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. Fui informada de que, após o isolamento dos óvulos, o fluido folicular e as células da granulosa (que ficam misturadas ao fluido) são desprezados, uma vez que não apresentam qualquer utilidade para o procedimento de reprodução ao qual serei submetida. Fui informada de que será realizada a análise dos níveis de algumas substâncias oxidantes e antioxidantes no fluido folicular, assim como a avaliação da capacidade antioxidante das células da granulosa (por meio da análise da expressão de enzimas envolvidas na neutralização das substâncias oxidantes).

Temos indícios de que o estresse oxidativo possa também comprometer a qualidade dos óvulos, levando a redução das chances de gravidez, mesmo quando se realizam procedimentos de reprodução assistida. Nas mulheres inférteis com endometriose e SOMP, 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. Contudo, na atualidade, não se realiza a avaliação adequada da qualidade oocitária, devido à ausência de métodos bem estabelecidos capazes de predizer se os óvulos são bons ou não. A identificação da presença de alterações nos óvulos de pacientes portadoras de endometriose e SOMP, não somente ajudaria a elucidar o mecanismo causador da infertilidade, como também abriria perspectivas futuras de tratamento para este grupo de pacientes.

Uma forma indireta de avaliarmos a qualidade dos seus óvulos, sem lhe causar qualquer risco adicional ou prejuízo do sucesso de você engravidar durante este procedimento de reprodução assistida, seria analisar a presença de algumas características dos seus óvulos (como uma estrutura microscópica em seu interior chamada de “fuso celular”, um dos possíveis responsáveis pela qualidade dos seus oócitos), por meio de um microscópio de polarização, que não ocasiona qualquer dano aos óvulos e nem ao desenvolvimento dos embriões gerados a partir destes óvulos. Devemos, portanto, ressaltar que o estudo dos seus óvulos usando esta microscopia de polarização, não vai interferir no seu tratamento para engravidar, assim como não causará prejuízo algum para a sua saúde, nem para a do futuro bebê. Ressaltamos que a utilização desta metodologia já ocorre de rotina na prática diária do laboratório de reprodução do presente serviço, sendo que apenas solicitamos a autorização para utilizar os dados obtidos por meio da utilização desta metodologia.

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, com exceção da coleta de sangue no dia de início de estimulação da ovulação, no dia em que for prescrito o uso da gonadotrofina coriônica humana e no dia da realização da captação de óvulos, como descrito acima.

Sua colaboração, portanto, no fornecimento de amostras de sangue, fluido folicular e células da granulosa, bem como autorizando a utilizar os dados obtidos com o uso da microscopia de polarização dos seus óvulos, será imprescindível para um melhor conhecimento do balanço oxidante e antioxidante e qualidade dos oócitos de pacientes com dificuldade para engravidar devido à Endometriose e SOMP. Este conhecimento no futuro poderá ser usado no sentido de propiciar um tratamento mais eficaz da infertilidade associada à Endometriose e à SOMP. É importante ressaltarmos que este estudo não trará nenhuma despesa para você e seu companheiro. Todo o material obtido será utilizado exclusivamente para a avaliação do balanço oxidante/antioxidante no sangue, fluido folicular e células da granulosa, e análise das características dos óvulos (não poderão ser utilizados para outros fins que não os desta pesquisa). Autorizo, caso haja amostras remanescentes de materiais colhidos (sangue, fluido folicular e células da granulosa), ao armazenamento das mesmas, sendo que somente poderão ser utilizadas para a realização de pesquisas futuras, caso eu dê a minha autorização expressa, mediante a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido específico da nova(s) pesquisa(s). No caso de haver amostras remanescentes, eu assinarei um termo de consentimento específico, autorizando a sua estocagem e onde conste os tipos e quantidades de alíquotas armazenadas.

3. INFORMAÇÕES ADICIONAIS: Todos 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 de sangue, fluido folicular e células da granulosa, bem como autorizando a utilizar os dados obtidos com o uso da microscopia de polarização dos meus óvulos,. Autorizo a pesquisadora abaixo mencionada a utilizá-los para a pesquisa : “Avaliação do

balanço oxidante e antioxidante em mulheres inférteis com endometriose e Síndrome dos Ovários Policísticos submetidas à indução da ovulação para a realização de procedimentos de reprodução assistida de alta complexidade”, 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.

ANEXO C – Modelo de ficha de avaliação dos sujeitos do estudo

Dados Clínicos e Laboratoriais

Infertilidade: Primária Secundária G_P_C_A_

Endometriose: Mínima Leve Moderada Severa

Endometrioma no ciclo atual não sim Número: _____ Tamanho: _____

Endometrioma prévio não sim Número: _____ Tamanho: _____

exérese com cápsula esvaziamento + cauterização cápsula conduta expectante

Fator tubário Salpingectomia Laqueadura Tubária Hidrossalpinge (não visualizada ao US) Outros _____

Fator masculino: Sim Não Morfologia > 8% > 4% (____/____/____)
Morfologia > 8% > 4% (____/____/____)

Técnica de processamento seminal: Swim up Gradiente Lavagem

Qualidade seminal dia ICSI:

mais de 5 milhões de sptz móveis recuperados (SMR)

2-5 milhões de SMR e morfologia > 4% (exames prévios)

< 2 milhões de SMR ou morfologia < 4% (exames prévios)

sptz obtido por PESA

sptz obtido por TESE

Sêmen Doador: Sim Não Pós-descongelamento (vide acima)

Laparoscopia: Sim Não Local: _____ Data: _____

Idade: _____ FSH Basal (____/____/____): _____

Peso: _____ Estatura: _____ IMC: _____

Terapia de Reprodução Assistida prévia: Sim Não N° de ciclos: _____

IUI _____ FIV- ICSI: _____

Medicações em uso: Sim Não

Nome: _____ Dose: _____ Tempo de uso: _____

Diabetes mellitus Doença cardiovascular
 Outras endocrinopatias _____
 Dislipidemia Lupus eritematoso sistêmico Outras doenças reumatológicas
 Infecção pelo HIV Qualquer infecção ativa
 Tabagismo N^o cigarros dia: _____
 Consumo de Álcool Frequência: _____ Tipo de bebida: _____

Dados da indução

FSH-r (total UI): _____ (dose diária): _____ N^o dias de indução: _____
 hMG-hp (total UI): _____ (dose diária): _____ N^o dias de indução: _____
 N^o total de dias de indução: _____
 Total folículos \geq 14mm no dia hCG: _____ OD: _____ OE: _____
 Total folículos \geq 18mm no dia hCG: _____ OD: _____ OE: _____

Dados da captação e fertilização

N^o de oócitos captados: _____ N^o de folículos puncionados: _____
 No de oócitos degenerados: _____
 Maturidade oocitária: GV: _____ MI: _____ MII: _____
 N^o oócitos injetados: _____ N^o de oócitos fertilizados: _____ Taxa de fertilização: _____ %
 N^o de embriões formados: _____ N^o embriões clivados: _____ Taxa de Clivagem: _____ %

Qualidade Oocitária

D0

Oócito	Maturação Nuclear (MN)	Citoplasma (CGC)	Vacúolos (V)	Corpúsculo Polar (CP)	Fuso		
					EIM	+/-	Loc
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							

EIM: Estágios intermediários da meiose (TI: telófase I; AII: anáfase II; TII: telófase II)

Qualidade Embrionária

Embrião	D1				D2			D3				Destino	
	CP	PN	S	N	Nº Células	S	F	M	Nº Células	S	F		M
1													
2													
3													
4													
5													
6													
7													

Dados de TransferênciaDia da transferência: D2 D3

Nº embriões transferidos: _____ Numeração dos embriões transferidos: _____

Dados da GestaçãoBHCG: Positivo Negativo Data: ____/____/____ Valor: _____

Gravidez Clínica: Sim Não

Nº sacos gestacionais (US 4 semanas após TE): _____

Taxa de implantação (nº sacos gestacionais US 4 semanas após TE /nº embriões transferidos):
_____ %

Nº de sacos gestacionais (US 12 semanas): _____

Gravidez: única gemelar trigemelar quadrigemelar

Perdas gestacionais: Sim Não Idade gestacional: _____

Nascidos vivos: Sim Não Nº: _____ Idade gestacional: _____

Vitalidade: _____

Complicações obstétricas: Sim Não

Descreva: _____

Title

Higher percentage of telophase I in living human oocytes from patients with moderate and severe endometriosis

Running title

Meiotic spindle in oocytes from infertile women with endometriosis

Luciana A. Dib^a, Maria C.P.M. Araújo^a, Roberta Cristina Giorgenon^a, Gustavo S. Romão^a, MD, PhD, Rui A. Ferriani^{a,b}, MD, PhD, Paula A. Navarro, MD, PhD^{a,b*}

^aDepartment of Obstetrics and Gynecology, Ribeirão Preto Medical School, São Paulo University, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

^bNational Institute of Hormones and Women's Health, Ribeirão Preto, SP, 14049-900, Brazil

***Corresponding author:**

Paula A. A. S. Navarro

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

Av. Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, São Paulo 14049-900, Brasil

Fax number: 55-16-3633 0946

E-mail: paasnavarro@uol.com.br

FINANCIAL SUPPORT

Luciana A. Dib was supported by a scholarship granted by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Brazil

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Edital MCT/CNPq 15/2007 - Processo 478396/2007-4)

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - 2008/58197-6

Abstract

Lower fertilization, implantation and pregnancy rates in women with endometriosis may be related to impaired oocyte quality. Polarization microscopy permits the analysis of spindles in live oocytes without compromising assisted reproduction outcomes. Thus, the objective of this prospective study was to compare the presence/location of meiotic spindles of *in vivo* matured oocytes from women with endometriosis (stages I/II and III/IV) and male or tubal causes of infertility (controls) undergoing stimulated cycles for intracytoplasmic sperm injection (ICSI). The meiotic spindles of 326 oocytes with the first polar body (PB) extruded (196 from the control group and 130 from endometriosis group, being 79 from the endometriosis I/II group and 51 from the endometriosis III/IV group) were imaged using polarization microscopy immediately before ICSI. We did not observe a significant difference between the percentage of oocytes in metaphase II with visible spindles among the analyzed groups (86.9%, 94.9%, and 91.5%, respectively, in the control, endometriosis I/II and endometriosis III/IV groups). We did not observe significant differences in the percentage of oocytes with spindles localized between 0° and 30°, 30° and 60, and 60° and 90° in relation to the first PB among the analyzed groups. Among the apparently mature oocytes, we observed a significant increase in the percentage of oocytes in telophase I in the endometriosis III/IV group (7.8%) when compared to the control (2.5%) and the endometriosis I/II groups (0%). The observation of a higher proportion of oocytes in telophase I among apparently matured oocytes in patients with moderate and severe endometriosis suggests an impairment or delay in the completion of meiosis I, which may have clinical implications.

KEYWORDS: Endometriosis; meiotic spindle; telophase I; human oocyte quality; polarization microscopy; ICSI

Summary for lay readers

Lower fertilization, implantation and pregnancy rates in women with endometriosis may be related to impaired oocyte quality. For a mature oocyte to be prepared for fertilization, the meiotic spindle must maintain its integrity. Polarization microscopy permits the analysis of spindles in live oocytes without compromising assisted reproduction outcomes. Thus, the objective of this prospective study was to compare the presence/location of meiotic spindles of *in vivo* matured oocytes from women with endometriosis (stages I/II – minimal/mild and III/IV – moderate/severe) and male or tubal causes of infertility (control group) undergoing stimulated cycles for intracytoplasmic sperm injection (ICSI). The meiotic spindles of 326 oocytes with the first polar body (PB) extruded (196 from the control group and 130 from endometriosis group, being 79 from the endometriosis I/II group and 51 from the endometriosis III/IV group) were imaged using polarization microscopy immediately before ICSI. Preliminary data from this prospective controlled study did not demonstrate differences in the visualization and localization of the metaphase II meiotic spindles of living oocytes obtained from stimulated cycles of infertile patients with endometriosis and controls. However, the higher proportion of oocytes in telophase I among an apparently matured cadre of oocytes observed in patients with moderate and severe endometriosis suggests an impairment or delay in the completion of meiosis I that requires further evaluation.

Introduction

In the spectrum of endometriosis-related symptoms, one of the most intriguing is the disease's association with infertility, principally in cases where there are no mechanical alterations of the reproductive system. Although it has been a controversial issue for decades, various data have supported the concept of decreased fertility in endometriosis patients (GARRIDO et al., 2000; GARRIDO et al., 2002). The finding that the control group in donation cycles and patients with endometriosis have similar oocyte implantation rates suggests an important role of the embryonic quality in the completion of the implantation in this group of patients (GARRIDO et al., 2000; BARNHART et al., 2002; AL-FADHLI et al., 2006).

Some studies have suggested that oxidative stress has a potential role in explaining the etiopathogenesis of infertility associated with endometriosis (JACKSON et al., 2005; GUPTA et al., 2006; MANSOUR et al., 2009) that could theoretically promote an impairment of the oocyte quality among these patients. There were alterations in the quality of oocytes, leading to either an impairment to embryonic development (BRIZEK et al., 1995) or a total block in that process (PELLICER et al., 1995), when women with endometriosis were compared to the healthy controls. Corroborating these findings, clinical data from oocyte donation programs seem to support the previously described theory that women affected with endometriosis produce poor quality oocytes (GARRIDO et al., 2000).

For the mature oocyte to be prepared for fertilization, it is necessary that the meiotic spindle, a fundamental part of the oocytic developmental process, maintain its integrity and function. In a recently published study on *in vitro* analysis of mature oocytes obtained from stimulated cycles of infertile patients with either endometriosis or a control group, we observed that patients with endometriosis tended to have a higher percentage of oocytes in telophase I (BARCELOS et al., 2009). This finding suggests a potential delay or impairment

of meiosis I associated with endometriosis, which would contribute to decreased oocyte quality. However, we highlight the fact that the number of cases presented is small and that the data cannot necessarily be extrapolated to *in vivo* mature oocytes. These are usually unavailable for studies using invasive methods that would render their use in assisted reproduction (AR) procedures impossible. These findings arouse interest in using non-invasive and innocuous methods to analyze this important cellular structure in *in vivo*, mature oocytes from stimulated cycles of infertile women with endometriosis. Such an approach would make the utilization of the analyzed oocytes in subsequent AR procedures possible.

Non-invasive methods for oocyte imaging are especially important for clinicians working with limited and valuable material such as human eggs. Birefringence, which can be measured using polarized light microscopy, is an optical property that results from molecular order and allows visualization of highly ordered biological structures such as spindles (LIU et al., 2000; NAVARRO et al., 2005; PETERSEN et al., 2009). The application of birefringence imaging with the Pol-Scope to mammalian eggs and embryos has been described in detail elsewhere (KEEFE et al., 2003; PETERSEN et al., 2009). Visualization of the meiotic spindle from living oocytes may have clinical utility for predicting embryo quality and fertilization after ICSI (WANG e KEEFE, 2002; HYUN et al., 2007; PETERSEN et al., 2009). Otherwise, identification of the position of the meiotic spindle relative to the first polar body may prevent embryologists from damaging this important cellular structure during ICSI (MOON et al., 2003). Thus, visualization of the meiotic spindle may be used to select oocytes to be injected by ICSI and might have clinical relevance, particularly in countries where there is a legal limit on the number of oocytes to be fertilized (PETERSEN et al., 2009). Despite the benefits of this research, we could not find any literature evaluating the meiotic spindles of living *in vivo* matured oocytes from infertile patients with endometriosis and comparing them with a control group.

Thus, this study has the objective of using polarization microscopy to analyze, visualize and localize the meiotic spindles of mature oocytes from stimulated cycles of infertile women with endometriosis *in vivo* and to compare the findings to a control group composed of women who are infertile secondary to tubal and/or male factors.

METHOD

A prospective study was completed from March 2008 to March 2009 with the Human Reproduction Sector of the Gynecology and Obstetrics Department of the FMRP-USP. This study was submitted to and approved by the Research Committee. All of the participating couples underwent ovulation induction for purposes of ICSI, fulfilled the inclusion criteria, demonstrated a desire to participate in the project and completed an informed consent form.

Patients with age ≤ 38 years, basal FSH (Follicle stimulating hormone) < 10 mIU/mL and BMI (body mass index) < 30 Kg/m² were included. The women with endometriosis were included when diagnosed by videolaparoscopy according to the protocol from the American Society of Reproductive Medicine (Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996), which classifies the disease in four stages: minimum (stage I), mild (stage II), moderate (stage III) and severe (stage IV). Women included in the control group did not have pelvic diseases associated with infertility, as demonstrated by videolaparoscopy.

Patients with chronic pathologies or tobacco or alcoholic use disorders and patients using medications that could interfere with ovarian folliculogenesis in the two months prior to the beginning of ovulation induction (such as NSAIDs anti-inflammatories, and corticosteroids) were excluded.

Seventy-four patients met the inclusion criteria for the study. Of these, 43 presented with male and/or tubal factors and were designated as the control group, and 31 presented

with infertility related to endometriosis (16 with minimal and mild endometriosis and 15 with moderate and severe endometriosis).

The participating patients underwent pituitary suppression using a gonadotropin-releasing hormone (GnRHa) analog 10 days prior to the basal TVUS (long protocol), with administration of leuproliof acetate (Lupron®, Abott, Brazil). The patients received 100 to 300 IU per day of recombinant FSH (FSHr) (Gonal-F®, Serono, Brazil; Puregon®, Organon, Brazil) in the first six days of induction. When at least two follicles reached a mean diameter of 18 mm, the recombinant hCG was administered (Ovidrel®, Serono, Brazil). The oocyte collection was performed 34 to 36 hours after administration of recombinant hCG.

All of the material aspirated during oocyte collection was analyzed to identify and isolate the cumulus-oocyte complexes. After identification, the cumulus-oocyte complexes were isolated from the follicular fluid (FF) and placed upon separated plates. The cumulus-oocyte complexes were carefully washed in Human Tubal Fluid-HEPES (HTF, Irvine Scientific) to remove blood and debris. Subsequently, they were placed upon NUNC plates (Multidish 4 wells Nuclon, Delta SI), filled with HTF culture medium, covered with mineral oil, and subjected to 5% CO₂ gas incubation under ideal temperature (37°C) and humidity (95%) conditions for a period of 2-3 hours. After this period, in order to remove the *cumulus oophorus* and the *corona radiata*, the cumulus-oocyte complexes were placed in micro-drops of 25 µL of hyaluronidase (H4272 type IV-S, Sigma), diluted in 80 UI/mL of HTF/HEPES (Irvine Scientific), for a maximum of 30 seconds, and then washed 2-3 times with HTF modified medium (HTF/HEPES, Irvine Scientific) supplemented with 10% Synthetic Serum Substitute (SSS). The mechanical removal of cellular debris was done with a Pasteur pipette (stripper pipette 130 µm denuding pipette, Cook, Melbourne, Australia).

After oocytic denuding (removal of *cumulus oophorus*), the degree of oocyte maturation was identified using a light microscope. The immature oocytes (in germinative

vesicle stage or metaphase I) were discarded. The mature oocytes (morphologically characterized by the presence of an extrusion polar body) were incubated in 25 μ L of HTF + 10% SSS for one hour (after oocyte denuding) and then analyzed by OCTAX ICSI Guard™ System (Medical Technology Vertriebs-GmbH, Altdorf, Germany) and injected during the ICSI procedure.

The oocyte cellular spindles with the first polar body extrusion were evaluated using an inverted microscope equipped with a video camera and with the hardware of the polarization microscope, which consists of electric crystals and of an optic-electric controller (OCTAX ICSI Guard™ System, Medical Technology Vertriebs-GmbH, Altdorf, Germany). The electric crystal groups are controlled by the computer through the OCTAX EyeWare™ Software (*Universal Imaging Corp., Boston, MA*). The oocytes were analyzed at 37°C, in 5 μ L drops of HTF/Hepes + 10% SSS in coated glass bottom Petri dishes (*MatTek Corp., Ashland, MA*), and placed on a surface heated to 37°C.

To control the methodological biases related to non-visualization of the spindle due to oocyte denuding and metaphase aging, denuding was done two to three hours after the cellular collection. Subsequently, the oocytes were placed on the previously balanced culture plates in the incubator for one more hour followed by imaging and ICSI. A maximum of seven oocytes were analyzed on each plate because the total time, including the time necessary to analyze the cellular spindle by polarization microscope and ICSI, was less than or equal to 7 minutes.

The oocytes with a first visible polar body (PB) were analyzed by polarization microscopy and characterized according to the real nuclear maturation stage (telophase I or metaphase II), the presence or absence of visible cellular spindles and the location of the cellular spindle in oocytes at metaphase II. The oocytes that presented with an elongated cellular spindle perpendicular to the oocytic membrane and extending to the first PB were

considered to be in telophase I. The cellular spindles in metaphase II were characterized by the presence of radially distributed birefringent fibers in the shape of a barrel and oriented parallel to the cortical membrane. Because chromosomes are minimally birefringent, they were not properly analyzed by this methodology. The cellular spindle localization was based on the angle formed between this structure and the first PB; the oocytes were divided into six groups, as follows: those with spindles making 0 to 30 ° angles as related to the first PB, those with spindles making 30 to 60 ° angles as related to the first PB, those with spindles making 60 to 90 ° angles as related to the first PB, those with spindles making 90 to 120 ° angles as related to the first PB, those with spindles making 120 to 150 ° angles as related to the first PB, and those with spindles making 150 to 180 ° angles as related to the first PB.

At 18 to 19 hours after ICSI, fertilization was analyzed and characterized by the presence of two pronuclei and two polar bodies (the fertilization rate calculated in the two analyzed groups corresponds to the number of fertilized oocytes divided by the number of injected oocytes multiplied by 100). Cleavage was verified around 24 hours after fertilization with the observation of cellular division. At about 44 hours after ICSI (D2), the embryonic quality was analyzed and characterized by the symmetry and number of blastomeres, fragmentation, and the percentage and presence or absence of multinucleation. Good quality embryos in D2 were defined as having four blastomeres, being symmetric, having less than 20% fragmentation and the absence of multinucleation. We analyzed the percentage of cycles with at least one good quality embryo formed among the analyzed groups.

Statistical Analysis

Initially the endometriosis and control groups were comparatively analyzed using Fisher's exact test with regard to the following parameters: the percentage of oocytes in telophase I, the percentage in metaphase II with visible and non-visible cellular spindles, the

oocytes with cellular spindles localized in the different positions, fertilization rates, and the percentage of cycles producing at least one good quality embryo. The endometriosis subgroups (stages I/II and III/IV) were posteriorly compared to the variables already described by Fisher's exact test. For comparative analyses of the quantitative variables, the unpaired t-test and the Mann-Whitney test were used. The significance level was 5% ($p < 0.05$) in all analyses.

RESULTS

No significant differences were found among the three analyzed groups (control, endometriosis I/II and endometriosis III/IV) in relation to the total FSH dose used, the length of ovarian stimulation, the number of follicles between 14 and 17 mm, the number of follicles ≥ 18 mm, the number of collected oocytes, the number of mature oocytes, fertilization rate, and the percentage of cycles producing at least one good quality embryo transferred in D2 (Table 1).

There were 326 oocytes with the first visible polar body that were analyzed with polarization microscopy, 196 from the control group and 130 from the endometriosis group (79 from the endometriosis I/II group and 51 from the endometriosis III/IV group). Among the apparently mature oocytes, we observed a significant increase in the percentage of oocytes in telophase I (Figure 1A) in the endometriosis III/IV group (7.8% of oocytes in telophase I) when compared to the control (2.5%) and the endometriosis I/II groups (0%). We did not observe a significant difference between the percentage of oocytes in metaphase II with visible (Figure 1B) and non-visible (Figure 1C) cellular spindles among the analyzed groups (86.9%, 94.9%, and 91.5%, respectively, in the control, endometriosis I/II and endometriosis III/IV groups). All of the oocytes presented a cellular spindle localized between 0° and 90° in relation to the first polar body. We did not observe any significant differences in the

percentage of oocytes with cellular spindles localized between 0° and 30° (Figure 1D), 30° and 60° (Figure 1E), and 60° and 90° (Figure 1F) among the analyzed groups. It is noteworthy that the percentage of oocytes with cellular spindles localized between 60° and 90° in relation to the first PB was small among the three analyzed groups (4.2%, 2.7% and 4.7%, respectively in the control, endometriosis I/II and endometriosis III/IV groups) (Table 2).

DISCUSSION

We found controversial AR results for patients with endometriosis, a topic that has been the focus of several studies and hypotheses in recent years (GARCIA-VELASCO e ARICI, 1999; GARRIDO et al., 2000). Data from a meta-analysis of eight relevant studies suggested that implantation is significantly compromised and embryonic quality is poor in patients with endometriosis, possibly reflecting poor oocyte quality (BARNHART et al., 2002). Some studies (MANSOUR et al., 2007) have shown significant DNA damage and increased chromosomal anomalies in mature mouse oocytes when incubated with peritoneal fluid from patients with endometriosis. These results were attenuated when the culture was supplemented with the antioxidant L-carnitine, suggesting that oxidative stress is involved in the impaired oocytic quality found in patients with endometriosis (MANSOUR et al., 2009). Other studies evaluating the potential effects of oxidative stress on the meiotic oocytic spindle have demonstrated that it can damage various intracellular proteins (STADTMAN, 1992; BERLETT e STADTMAN, 1997). Some of these damaged proteins are important for cellular spindle organization (ANTONIO et al., 2000; FUNABIKI e MURRAY, 2000; ABRIEU et al., 2001). The oxidative stress may simultaneously or independently damage the DNA and cause incorrect chromosomal alignment (BECKMAN e AMES, 1998; LIMOLI et al., 1998; LIU et al., 2003; NAVARRO et al., 2004; NAVARRO et al., 2006), creating cell cycle

anomalies. Meiotic anomalies can contribute to failed cellular development by different routes, ranging from the inability of the oocyte to complete the maturation process, which makes it incapable of being fertilized, to the appearance of variable errors in the meiotic maturation process that do not make fertilization impossible but can compromise embryonic development pre- and/or post-implantation, as well as the future viability of the embryo (PAVLOK et al., 1992; LONERGAN et al., 1994; ARMSTRONG, 2001).

Different methodologies can be used to evaluate the oocyte cellular spindles. Among these, polarization microscopy enables observation and characterization of birefringent structures in live cells without the necessity of fixation (PETERSEN et al., 2009). It is an innocuous method that permits the utilization of the analyzed oocytes for ICSI without compromising subsequent embryonic development.

In this study, the meiotic spindle was visualized in 89.6% of the examined oocytes, as supported by the data in the literature, where visualization of the cellular spindle can range from 62.8 to 91% (RIENZI et al., 2003; MADASCHI et al., 2008). The high percentage of oocytes with visible cellular spindles observed in the three analyzed groups in this study can be attributed to rigorous methodological control, including incubating oocytes for one hour after denuding and adequate control of ambient conditions (maintenance of ideal temperature and pH and reduction of the time of light exposure during analyses and time outside incubation) (ROBERTS et al., 2002).

In relation to the localization of the cellular spindle, we did not observe significant difference between the groups. Of the total number of oocytes with visible cellular spindles, 84% were localized between 0° and 30° in relation to the polar body; the percentage of oocytes in the three analyzed groups with cellular spindles localized between 60° and 90° in relation to the first PB was very small. Studies in the literature have evaluated the angle formed between the polar body and the cellular spindle and concluded that when the angle

does not exceed 90°, there are no effects on the fertilization rates of these oocytes (RIENZI et al., 2003; FANG et al., 2007). Therefore, we suggest that the localization of the oocytic cellular spindle in anomalous positions is not a variable responsible for the decreased oocytic quality in patients with infertility related to endometriosis.

Oocytes in telophase I have not yet finished meiosis I, but by optic microscopy, these oocytes can present with morphological characteristics similar to oocytes that have completed meiosis I and are in metaphase II (HYUN et al., 2007). Among the patients with infertility related to moderate and severe endometriosis, the present study demonstrates a significant increase in apparently mature oocytes *in vivo* that were actually in telophase I. These data corroborate recent findings indicating a tendency for a higher proportion of *in vitro* mature oocytes obtained from stimulated cycles of patients with endometriosis to be in telophase I, as compared to the control group (BARCELOS et al., 2009). The present finding indicates that the potential delay or impairment of meiosis I in patients with infertility related to endometriosis occurs not only in mature oocytes *in vitro*, but also in the mature oocytes *in vivo*. It must be noted that in the present study, this finding was observed only in the subgroup of patients with endometriosis III/IV, suggesting that the severity of disease could be associated with the impaired conclusion of meiosis I and, consequently, with the decreased oocytic quality.

Some authors (HYUN et al., 2007) have shown that apparently mature oocytes (with first visible PB) that were actually in telophase I according to analysis by polarization microscopy presented significantly lower fertilization rates when compared to oocytes that had completed meiosis I (15.8% versus 80%, respectively). We suggest that the increased percentage of oocytes in telophase I from the infertile patients with endometriosis III/IV may contribute to the decreased oocytic quality in this group of patients (AL-FADHLI et al., 2006; BARCELOS et al., 2009). It is possible that analysis of the oocytic nuclear maturation stage

may be used as a prediction factor for the fertilization rate in this group of patients, which needs to be analyzed in studies with adequate methodology. On the other hand, it is possible to postpone oocyte insemination in telophase I in patients with moderate and severe endometriosis. This could have a positive impact on assisted reproduction procedures and needs to be adequately evaluated.

We can conclude from this study that significant differences between patients with endometriosis and control patients (infertility by tubal and/or male factors) were not verified via polarization microscopy in terms of the percentage of oocytes in metaphase II with visible and non-visible cellular spindles or in relation to the spindle localization. However, we saw a significant increase in the percentage of oocytes in telophase I in patients with endometriosis III/IV, suggesting an impairment of meiosis I. Future studies with a well-delineated methodology will allow the analysis of the real clinical impact of this technique in this subgroup of patients.

Acknowledgments

The authors wish to thank the following employees of the Laboratory of Assisted Reproduction, Department of Gynecology and Obstetrics, University Hospital, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, for technical support and for contributing to the execution of the present study: Maria Aparecida Carneiro Vasconcelos, Marilda Yamada Dantas, Maria Albina Bortoliero, Maria Auxiliadora Pádua Rosa and Sandra Viana.

References

- 1997 Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril* **67**, 817-821.
- Abrieu A, Magnaghi-Jaulin L, Kahana JA et al. 2001 Mps1 is a kinetochore-associated kinase essential for the vertebrate mitotic checkpoint. *Cell* **106**, 83-93.
- Al-Fadhli R, Kelly SM, Tulandi T et al. 2006 Effects of different stages of endometriosis on the outcome of in vitro fertilization. *J Obstet Gynaecol Can* **28**, 888-891.
- Antonio C, Ferby I, Wilhelm H et al. 2000 Xkid, a chromokinesin required for chromosome alignment on the metaphase plate. *Cell* **102**, 425-435.
- Armstrong DT 2001 Effects of maternal age on oocyte developmental competence. *Theriogenology* **55**, 1303-1322.
- Barcelos ID, Vieira RC, Ferreira EM et al. 2009 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* **92**, 1749-1752.
- Barnhart K, Dunsmoor-Su R, Coutifaris C 2002 Effect of endometriosis on in vitro fertilization. *Fertil Steril* **77**, 1148-1155.
- Beckman KB, Ames BN 1998 The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* **78**, 547-581.
- Berlett BS, Stadtman ER 1997 Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* **272**, 20313-20316.
- Brizek CL, Schlaff S, Pellegrini VA et al. 1995 Increased incidence of aberrant morphological phenotypes in human embryogenesis--an association with endometriosis. *J Assist Reprod Genet* **12**, 106-112.

- Fang C, Tang M, Li T et al. 2007 Visualization of meiotic spindle and subsequent embryonic development in in vitro and in vivo matured human oocytes. *J Assist Reprod Genet* **24**, 547-551.
- Funabiki H, Murray AW 2000 The *Xenopus* chromokinesin Xkid is essential for metaphase chromosome alignment and must be degraded to allow anaphase chromosome movement. *Cell* **102**, 411-424.
- Garcia-Velasco JA, Arici A 1999 Is the endometrium or oocyte/embryo affected in endometriosis? *Hum Reprod* **14 Suppl 2**, 77-89.
- Garrido N, Navarro J, Garcia-Velasco J et al. 2002 The endometrium versus embryonic quality in endometriosis-related infertility. *Hum Reprod Update* **8**, 95-103.
- Garrido N, Navarro J, Remohi J et al. 2000 Follicular hormonal environment and embryo quality in women with endometriosis. *Hum Reprod Update* **6**, 67-74.
- Gupta S, Agarwal A, Krajcir N et al. 2006 Role of oxidative stress in endometriosis. *Reprod Biomed Online* **13**, 126-134.
- Hyun CS, Cha JH, Son WY et al. 2007 Optimal ICSI timing after the first polar body extrusion in in vitro matured human oocytes. *Hum Reprod* **22**, 1991-1995.
- Jackson LW, Schisterman EF, Dey-Rao R et al. 2005 Oxidative stress and endometriosis. *Hum Reprod* **20**, 2014-2020.
- Keefe D, Liu L, Wang W et al. 2003 Imaging meiotic spindles by polarization light microscopy: principles and applications to IVF. *Reprod Biomed Online* **7**, 24-29.
- Limoli CL, Hartmann A, Shephard L et al. 1998 Apoptosis, reproductive failure, and oxidative stress in Chinese hamster ovary cells with compromised genomic integrity. *Cancer Res* **58**, 3712-3718.
- Liu L, Oldenbourg R, Trimarchi JR et al. 2000 A reliable, noninvasive technique for spindle imaging and enucleation of mammalian oocytes. *Nat Biotechnol* **18**, 223-225.

- Liu L, Trimarchi JR, Navarro P et al. 2003 Oxidative stress contributes to arsenic-induced telomere attrition, chromosome instability, and apoptosis. *J Biol Chem* **278**, 31998-32004.
- Lonergan P, Monaghan P, Rizos D et al. 1994 Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Mol Reprod Dev* **37**, 48-53.
- Madaschi C, de Souza Bonetti TC, de Almeida Ferreira Braga DP et al. 2008 Spindle imaging: a marker for embryo development and implantation. *Fertil Steril* **90**, 194-198.
- Mansour G, Abdelrazik H, Sharma RK et al. 2009 L-carnitine supplementation reduces oocyte cytoskeleton damage and embryo apoptosis induced by incubation in peritoneal fluid from patients with endometriosis. *Fertil Steril* **91**, 2079-2086.
- Mansour G, Radwan E, Sharma R et al. 2007 DNA damage to embryos incubated in the peritoneal fluid of patients with endometriosis: role in infertility. *Fertility and sterility* **88**, S311.
- Moon JH, Hyun CS, Lee SW et al. 2003 Visualization of the metaphase II meiotic spindle in living human oocytes using the Polscope enables the prediction of embryonic developmental competence after ICSI. *Hum Reprod* **18**, 817-820.
- Navarro PA, Liu L, Ferriani RA et al. 2006 Arsenite induces aberrations in meiosis that can be prevented by coadministration of N-acetylcysteine in mice. *Fertil Steril* **85 Suppl 1**, 1187-1194.
- Navarro PA, Liu L, Keefe DL 2004 In vivo effects of arsenite on meiosis, preimplantation development, and apoptosis in the mouse. *Biol Reprod* **70**, 980-985.
- Navarro PA, Liu L, Trimarchi JR et al. 2005 Noninvasive imaging of spindle dynamics during mammalian oocyte activation. *Fertil Steril* **83 Suppl 1**, 1197-1205.

Pavlok A, Lucas-Hahn A, Niemann H 1992 Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol Reprod Dev* **31**, 63-67.

Pellicer A, Oliveira N, Ruiz A et al. 1995 Exploring the mechanism(s) of endometriosis-related infertility: an analysis of embryo development and implantation in assisted reproduction. *Hum Reprod* **10 Suppl 2**, 91-97.

Petersen CG, Oliveira JB, Mauri AL et al. 2009 Relationship between visualization of meiotic spindle in human oocytes and ICSI outcomes: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online* **18**, 235-243.

Rienzi L, Ubaldi F, Martinez F et al. 2003 Relationship between meiotic spindle location with regard to the polar body position and oocyte developmental potential after ICSI. *Hum Reprod* **18**, 1289-1293.

Roberts R, Franks S, Hardy K 2002 Culture environment modulates maturation and metabolism of human oocytes. *Hum Reprod* **17**, 2950-2956.

Stadtman ER 1992 Protein oxidation and aging. *Science* **257**, 1220-1224.

Wang WH, Keefe DL 2002 Prediction of chromosome misalignment among in vitro matured human oocytes by spindle imaging with the PolScope. *Fertil Steril* **78**, 1077-1081.

Figure legend

Figure 1. Birefringent spindles in living human oocytes imaged with the Polscope just before ICSI. (A) Birefringent spindles at Telophase I stage. (B) Oocytes had visible spindles at Metaphase II stage. (C) Oocytes had no visible spindles at Metaphase II stage. (D) Oocytes with the spindle located between 0° and 30° relative to the polar body. (E) Oocytes with the spindle located between 30° and 60° relative to the polar body. (F) Oocytes with the spindle located between 60° and 90° relative to the polar body.

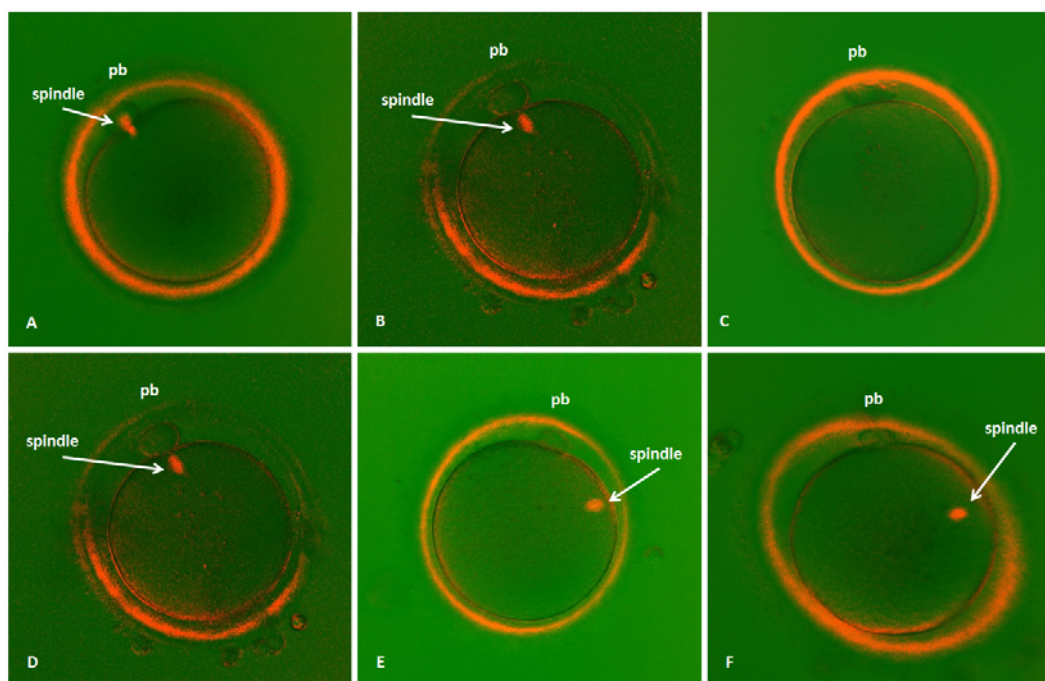


Table 1: Comparison of the parameters of controlled ovarian stimulation and results of intracytoplasmatic injection of spermatids (ICSI) into infertile women with endometriosis and control (tubal and/or male factors)

Variables	Control	Endometriosis		p value
		I – II	III – IV	
Age (years)	33.4 ± 3.4	33.6 ± 2.9	33.1 ± 3.6	NS
Number of patients	43	16	15	-
Number of initiated cycles	49	20	18	-
Total FSH Dose (UI)	1987 ± 654.7	1868 ± 476.3	2183 ± 702.5	NS
Length of ovarian stimulation (days)	9.1 ± 1.6	8.4 ± 1.1	9.2 ± 1.6	NS
Follicles 14-17 mm	4.3 ± 2.4	3.6 ± 1.8	3.6 ± 3.4	NS
Follicles ≥ 18 mm	2.7 ± 1.7	3.2 ± 1.7	3.4 ± 2.3	NS
Number of cycles with oocytes retrieval	47	18	16	-
Retrieved oocytes	6.4 ± 3.7	6.0 ± 3.8	5.1 ± 3.4	NS
Number of mature oocytes	5.0 ± 3.2	4.9 ± 2.7	3.6 ± 2.6	NS
Fertilization Rate (%)	80 (156/195)	79.7 (63/79)	72.9 (35/48)	NS
Number of cycles with transfer	45	18	14	-
% of cycles with at least one good quality embryo transferred in D2	28.9 (13/45)	33.3 (6/18)	28.5 (4/14)	NS

Legend:

Mean ± standard deviation/ NS: non-significant ($p > 0.05$)

Mature oocytes: oocytes with first visible polar body; Fertilization Rate: number of fertilized oocytes /number of injected oocytes x 100; % of cycles with at least one good quality embryo transferred in D2: number of cycles with at least one embryo with four symmetrical and without D2 fragmentation cells/number of cycles with transfer x 100

Table 2: Non-invasive analysis of mature oocytes from stimulated cycles of infertile patients with and without endometriosis (tubal and /or male factors).

Variables	Total	Control	Endometriosis		p value
			I – II	III – IV	
Nuclear Maturation					
- Telophase I (%)	2.8 (9/326)	2.5 (5/196)	0	7.8 (4/51)	0.02
- Metaphase II (%)	97.2 (317/326)	97.4 (191/196)	100 (79/79)	92.1(47/51)	NS
Spindle visualization					
- Non visible (%)	10.4 (33/317)	13 (25/191)	5.0 (4/79)	8.5 (4/47)	NS
- Visible (%)	89.6 (284/317)	86.9 (166/191)	94.9 (75/79)	91.5 (43/47)	NS
Spindle Localization					
- 0° – 30° (%)	83.8 (238/284)	85.5 (142/166)	78.6 (59/75)	86 (37/43)	NS
- 30° – 60° (%)	12.3 (35/284)	10.2 (17/166)	18.6 (14/75)	9.3 (4/43)	NS
- 60° – 90° (%)	3.9 (11/284)	4.2 (7/166)	2.7 (2/75)	4.7 (2/43)	NS

Legend:

NS: non-significant ($p > 0.05$)

Mature oocytes: oocytes with first visible polar body