

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA
DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA
SETOR DE REPRODUÇÃO HUMANA

**Determinação do perfil de eicosanoides no soro e fluido folicular de
pacientes com endometriose e controles submetidas à estimulação
ovariana e fertilização *in vitro*.**

Larissa de Oliveira Koopman

Ribeirão Preto

2023

Larissa de Oliveira Koopman

Determinação do perfil de eicosanoides no soro e fluido folicular de pacientes com endometriose e controles submetidas à estimulação ovariana e fertilização *in vitro*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ginecologia e Obstetrícia do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas
Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia, opção Biologia da Reprodução.

Orientadora: Professora Doutora Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro

Co-orientadora: Doutora Michele Gomes da Broi

RIBEIRÃO PRETO

2023

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Koopman, Larissa de Oliveira

Determinação do perfil de eicosanoides no soro e fluido folicular de pacientes com endometriose e controles submetidas à estimulação ovariana e fertilização *in vitro*, 2023.

85 p.: il; 30cm

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ginecologia e Obstetrícia do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia, opção Biologia da Reprodução

Orientadora: Professora Doutora Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro

Co-orientadora: Doutora Michele Gomes da Broi

1. Endometriose; 2. infertilidade feminina, 3. eicosanoides, 4. qualidade

FOLHA DE APROVAÇÃO

Larissa de Oliveira Koopman

Determinação do perfil de eicosanoides no soro e fluido folicular de pacientes com endometriose e controles submetidas à estimulação ovariana e fertilização *in vitro*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ginecologia e Obstetrícia do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas
Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia, opção Biologia da Reprodução.

Aprovado em: ____/____/____

Banca examinadora

Presidente da banca Professor Doutor

Faculdade

Assinatura: _____

Professor Doutor

Faculdade

Assinatura: _____

Professor Doutor

Faculdade

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À minha irmã, Estela

*Que esteve presente durante toda essa
trajetória e se construiu como cientista
junto a mim*

*Minha gratidão a sua companhia e
parceria é imensurável*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, pois a força para me manter perseverante vem Dele. Agradeço por todo conhecimento concedido ao longo dos anos, que me permitiu colaborar um pouquinho com o conhecimento científico aqui gerado.

À minha mãe, Darli, por todo o amor, carinho e preocupação. Só ela sabe a dor de ter uma filha estudando tão longe de casa. E mesmo com tamanha dor, sempre apoiou meus estudos e torceu pelo meu sucesso. Prometo que tudo isso valerá a pena.

Ao meu pai, Guilherme, que nunca mediu esforços para me ajudar a conquistar todos meus sonhos, que sempre me apoiou nos meus estudos, e que agora, junto a mim e minha família, comemora os frutos colhidos dos nossos esforços. Devo tudo que conquistei aos dois, papai e mamãe.

À minha irmã, Estela, a quem eu dedico essa dissertação. Minha companhia diária e melhor amiga, com quem eu compartilho a casa e a vida, os resumos de matéria para prova e as metodologias científicas usadas nas nossas pesquisas, livros (acadêmicos ou não), receitas e refeições diárias, séries e filmes, e muitas risadas, palhaçadas e fofocas. Espero que eu tenha te servido de inspiração o mesmo tanto que você me inspira.

Ao meu namorado, Bruno, fonte diária de motivação e acolhimento. Agradeço por ser um companheiro tão fiel, acreditando sempre que eu sou capaz e me motivando a seguir em frente. A vida com você é mais leve e mais feliz.

À minha orientadora, Professora Doutora Paula Navarro, que me acolheu em seu grupo de pesquisa e me possibilitou desenvolver este trabalho de pesquisa em um tema que tem todo o meu carinho. Agradeço também pelos constantes aprendizados, tanto em conhecimento acadêmico, mas também em sabedorias para a vida.

À minha co-orientadora, Michele, que, com muita paciência, foi me auxiliando em todos os passos da minha pesquisa, me mostrando o melhor caminho, fazendo as melhores sugestões e me mantendo sempre animada a continuar em frente.

Ao professor Carlos Arterio Sorgi, do departamento de química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP) por contribuir com o enriquecimento deste trabalho.

À querida colega e amiga, Mayra, que compartilhou comigo os momentos de recrutamento de paciente e coleta de amostras. Nossa incrível parceria ajudou muito no desenvolvimento inicial de todo o trabalho.

A todos os amigos da pós-graduação, pelos divertidos momentos que tivemos, dentro e fora da faculdade.

À equipe do laboratório de GO, pelo auxílio no recrutamento das pacientes e aquisição das amostras.

Às mulheres que aceitaram participar deste estudo, doando amostras de soro e fluido folicular.

Ao Centro de Excelência de Quantificação e Identificação de Lipídios – (CEQIL) pela colaboração com as extrações e análises lipídicas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro por meio do Programa de Excelência Acadêmica (PROEX).

Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro através do auxílio a projetos de pesquisa.

Ao programa de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia (PPGGO), ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia (DGO) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) em Hormônios e Saúde da Mulher, pelo suporte financeiro e estrutural.

Aos membros da banca avaliadora pela disponibilidade e valiosas contribuições.

Sou grata a todos

EPÍGRAFE

*“Valeu a pena? Tudo vale a pena
Se a alma não é pequena.
Quem quer passar além do Bojador
Tem que passar além da dor.
Deus ao mar o perigo e o abismo deu,
Mas nele é que espelhou o céu.”*

— Fernando Pessoa

RESUMO

KOOPMAN, L. O. Determinação do perfil de eicosanoides no soro e fluido folicular de pacientes com endometriose e controles submetidas à estimulação ovariana e fertilização *in vitro*. 2023. Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós-graduação em Ginecologia e Obstetrícia, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023).

A endometriose é uma doença altamente prevalente entre mulheres em idade reprodutiva e frequentemente associada à infertilidade. No entanto, os mecanismos envolvidos na etiopatogênese da infertilidade relacionada à endometriose ainda não foram totalmente elucidados. Acredita-se que a qualidade do oócito tenha um papel importante no comprometimento da fertilidade natural de suas portadoras, sendo a inflamação sistêmica e o estresse oxidativo possíveis mediadores do dano oocitário. Nesse sentido, há evidências de alterações em marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo sistêmico e folicular em mulheres inférteis com a doença. Dentre os principais mediadores da resposta inflamatória estão os eicosanoides, moléculas bioativas de origem lipídica que regulam diversos processos fisiopatológicos, inclusive a foliculogênese, maturação oocitária e ovulação, e são produzidos frente a um estímulo inflamatório ou à exposição a espécies reativas de oxigênio. Questionamos se a inflamação sistêmica e o estresse oxidativo (EO) poderiam modificar o perfil sérico de eicosanoides dessas pacientes, o que poderia se refletir no perfil lipídico do microambiente folicular e prejudicar a qualidade oocitária. Assim, o objetivo primário deste estudo consiste em comparar o perfil de eicosanoides no soro e fluido folicular de mulheres inférteis com endometriose e com infertilidade por fator tubário e/ou masculino submetidas à estimulação ovariana controlada para fertilização *in vitro*. Para tanto, amostras de sangue e fluido folicular de 18 pacientes inférteis com endometriose e 20 pacientes com infertilidade por fator tubário e/ou masculino foram coletadas no dia da captação oocitária, armazenadas a -80°C e analisadas quanto ao perfil de eicosanoides pela técnica de espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESI-MS). Quando comparamos os grupos endometriose e controle, não observamos diferença significativa nas concentrações séricas dos 5 eicosanóides detectados, mas evidenciamos maiores concentrações foliculares de Ácido eicosapentaenoico (EPA) no grupo endometriose. Ao subdividirmos o grupo endometriose, observamos um aumento de 5-HETE no soro de mulheres com endometriose sem endometrioma comparado às mulheres com endometriose com endometrioma e um aumento do EPA no fluido folicular de mulheres com endometriose com endometrioma comparado às controles. A análise de correlação demonstrou uma associação moderada positiva entre 5-HETE no soro e 5-HETE no fluido folicular no grupo controle. Observou-se apenas fracas correlações entre as concentrações séricas e foliculares de eicosanoides e os resultados dos tratamentos de RA nos grupos com e sem endometriose. Esses achados contribuem para a compreensão dos mecanismos envolvidos na infertilidade relacionada à endometriose e destacam a importância dos eicosanoides na qualidade oocitária.

Palavras-chave: endometriose, infertilidade feminina, eicosanoides, fluido folicular, soro, qualidade oocitária.

ABSTRACT

KOOPMAN, L. O. Determination of the eicosanoid profile in the serum and follicular fluid of patients with endometriosis and controls undergoing ovarian stimulation and in vitro fertilization. 2023. Dissertation (Master's in Sciences - Graduate Program in Gynecology and Obstetrics, Department of Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, São Paulo, 2023).

Endometriosis is a highly prevalent disease among women of reproductive age and is often associated with infertility. However, the mechanisms involved in the pathogenesis of endometriosis-related infertility have not been fully elucidated. It is believed that oocyte quality plays an important role in the impairment of natural fertility in affected individuals, with systemic inflammation and oxidative stress being possible mediators of oocyte damage. In this regard, there is evidence of alterations in systemic and follicular inflammatory and oxidative stress markers in infertile women with the disease. Among the main mediators of the inflammatory response are eicosanoids, bioactive lipid molecules that regulate various pathophysiological processes, including folliculogenesis, oocyte maturation, and ovulation, and are produced in response to an inflammatory stimulus or exposure to reactive oxygen species. We questioned whether systemic inflammation and oxidative stress could modify the serum eicosanoid profile in these patients, which could be reflected in the lipid profile of the follicular microenvironment and impair oocyte quality. Therefore, the primary objective of this study is to compare the eicosanoid profile in the serum and follicular fluid of infertile women with endometriosis and those with tubal and/or male factor infertility undergoing controlled ovarian stimulation for in vitro fertilization. To achieve this, blood and follicular fluid samples from 18 infertile patients with endometriosis and 20 patients with tubal and/or male factor infertility were collected on the day of oocyte retrieval, stored at -80°C , and analyzed for eicosanoid profiles using electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). When comparing the endometriosis and control groups, we did not observe a significant difference in the serum concentrations of the 5 detected eicosanoids, but we found higher follicular concentrations of Eicosapentaenoic Acid (EPA) in the endometriosis group. Upon subdividing the endometriosis group, we observed an increase in 5-HETE in the serum of women with endometriosis without endometrioma compared to those with endometriosis with endometrioma, and an increase in EPA in the follicular fluid of women with endometriosis with endometrioma compared to controls. Correlation analysis showed a moderate positive association between serum 5-HETE and follicular fluid 5-HETE in the control group. Only weak correlations were observed between serum and follicular concentrations of eicosanoids and the outcomes of ART in both endometriosis and non-endometriosis groups. These findings contribute to the understanding of the mechanisms involved in endometriosis-related infertility and highlight the importance of eicosanoids in oocyte quality.

Keywords: endometriosis, female infertility, eicosanoids, oocyte quality.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: metabolismo do ácido araquidônico (AA), gerando diferentes espécies de eicosanoides pelas vias enzimáticas COX, LOX e CYP, e pela via de oxidação não-enzimática (por ROS).

Figura 2: metabolismo dos ácidos graxos poli-insaturados EPA e DHA, gerando diferentes espécies de eicosanoides pela via enzimáticas da COX e LOX.

Figura 3: fluxograma do estudo com o número de pacientes elegíveis, incluídas, excluídas e amostras coletadas e analisadas divididas em controle e endometriose.

Figura 4: gráfico da concentração do eicosanoide 5-HETE nas amostras de soro dos grupos controle, endometriose sem OMA e endometriose com OMA.

Figura 5: gráfico da concentração do eicosanoide EPA nas amostras de FF dos grupos controle, endometriose sem OMA e endometriose com OMA.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características clínicas: idade, IMC, tempo de infertilidade e FSH basal em pacientes controle e com endometriose.

Tabela 2 – Resultados de TRA no grupo controle e endometriose: número de oócitos captados, número de oócitos maduros, número de embriões clivados, número de embriões formados em D2, número de embriões de boa qualidade em D2, número de embriões formados em D3, número de embriões de boa qualidade em D3.

Tabela 3 – Resultados de TRA no grupo controle e endometriose: taxa de fertilização, taxa de clivagem, taxa de implantação, taxa de gestação química, taxa de gestação clínica e taxa de nascidos vivos.

Tabela 4 – Características clínicas: idade, IMC, tempo de infertilidade e FSH basal em pacientes controle, com endometriose sem endometrioma, e com endometriose com endometrioma.

Tabela 5 – Resultados de TRA nos grupos controle, endometriose sem endometrioma e endometriose com endometrioma: número de oócitos captados, número de oócitos maduros, número de embriões clivados, número de embriões formados em D2, número de embriões de boa qualidade em D2, número de embriões formados em D3, número de embriões de boa qualidade em D3, número de embriões transferidos a fresco, número de sacos gestacionais, número de embriões com batimento cardíaco e número de nascidos vivos.

Tabela 6 – Resultados de TRA nos grupos controle, endometriose sem endometrioma e endometriose com endometrioma: taxa de fertilização, taxa de clivagem, taxa de implantação, taxa de gestação química, taxa de gestação clínica e taxa de nascidos vivos.

Tabela 7 - Concentração de eicosanoides no soro. Concentração em picograma por mililitro (pg/mL) dos eicosanoides 5-HETE, 11-HETE, 15-oxo-ETE, EPA e 15-HETE no soro de mulheres inférteis com endometriose e controles inférteis.

Tabela 8 - Concentração de eicosanoides no soro de mulheres inférteis com endometriose sem endometrioma, com endometriose com endometrioma, e controles inférteis.

Tabela 9 - Concentração de eicosanoides no fluido folicular de mulheres inférteis com endometriose e controles inférteis.

Tabela 10 - Concentração de eicosanoides no fluido folicular de mulheres inférteis com endometriose sem endometrioma, endometriose com endometrioma e controles inférteis.

Tabela 11 - Valores do coeficiente de correlação de Spearman entre as concentrações dos eicosanoides 5-HETE, 11-HETE, 15-oxo-ETE, EPA e 15-HETE no soro com as concentrações de 5-HETE, 11-HETE, 15-oxo-ETE, EPA e 15-HETE no fluido folicular de mulheres inférteis com endometriose e controles inférteis.

Tabela 12 - Valores do coeficiente de correlação de Spearman entre as concentrações dos eicosanoides 5-HETE, 11-HETE, 15-oxo-EETE, EPA e 15-HETE no soro de mulheres inférteis com endometriose e controles inférteis.

Tabela 13 - Valores do coeficiente de correlação de Spearman entre as concentrações dos eicosanoides 5-HETE, 11-HETE, 15-oxo-EETE, EPA, 15-HETE e PGE-2 no FF de mulheres inférteis com endometriose e controles inférteis.

LISTA DE ABREVIATURAS

- 5-HETE - ácido 5-hidroxiieicosatetraenoico
- 11-HETE - ácido 11-hidroxiieicosatetraenoico
- 15-HETE - ácido 11-hidroxiieicosatetraenoico
- 15-oxo-ETE – ácido 15-oxoieicosatetraenoico
- AA - Ácido araquidônico
- AG – Ácido graxo
- ASRM – Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva
- CC – Células dos cumulus
- Ceqil - Centro de Excelência em Quantificação e Identificação de Lipídios
- COC – Complexo oophorus-cumulus
- COX-1 – Ciclo-oxigenase-1
- COX-2- Ciclo-oxigenase-2
- CTEP - Contagem total de espermatozoides progressivos
- CYP – Citocromo P450
- D1 - Primeiro dia do desenvolvimento embrionário
- D2 – Segundo dia do desenvolvimento embrionário
- D3 – Terceiro dia do desenvolvimento embrionário
- DGO - Departamento de Ginecologia e Obstetrícia
- DHA - Ácido docosahexaenóico
- DHET - Ácido di-hidroeicosatetraenóico
- EET - Ácido epoxieicosatrienoico
- EO – Estresse Oxidativo
- EOC - Estimulação ovariana controlada
- ESI - Ionização por Eletrospray
- EPA -Ácido eicosapentaenoico
- FCFRP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
- FF – Fluido folicular
- FIV - Fertilização in vitro
- FSH - Hormônio folículo estimulante
- FMRP - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
- GnRH - Hormônio liberador de gonadotrofinas
- hCG - Gonadotrofina coriônica humana
- HCRP - Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto

HDHA - Ácido hidroxidocosahexaenóico
HEPE - Ácido hidroxeicosapentaenóico
HETE - Ácido hidroxeicosatetraenóico
ICSI - Injeção intracitoplasmática de espermatozoides
IMC - Índice de massa corpórea
LA - Ácido linoleico
LC - Cromatografia líquida
LOX - Lipoxigenase
LT - Leucotrieno
LX - Lipoxina
MI - Oócitos imaturos em metáfase I
MII - Oócitos em metáfase II (maduros)
MeOH - Metanol
MRM - Monitoramento de Reações Múltiplas
MS - Espectrometria de massas
PD - Protectina
PG - Prostaglandina
PGE2 - Prostaglandina E2
PLA2 - Fosfolipase A2
PUFA - Ácido graxos poli-insaturado
Q1 - Primeiro quadrupolo
Q2 - Segundo quadrupolo
Q3 - Terceiro quadrupolo
ROS - Espécies reativas de oxigênio
RvD - Resolvina D
RvE - Resolvina E
SOP - Síndrome dos ovários policísticos
SPE - Solid phase extraction
TAG - Triacilglicerídeo
TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido
TOF - Time of flight
TRA - Técnicas de Reprodução Assistida
TX - Tromboxano
USTV - Ultrassom Transvaginal
VG - Oócitos imaturos em vesícula germinativa

SUMÁRIO

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
1.1. <i>ENDOMETRIOSE</i>	16
1.2. ENDOMETRIOSE E INFERTILIDADE	17
1.3. <i>PROCESSO INFLAMATÓRIO E ESTRESSE OXIDATIVO</i>	19
1.4. <i>LIPÍDIOS</i>	21
1.5. <i>METABOLISMO DE ÁCIDOS GRAXOS E EICOSANOIDES</i>	23
1.6. <i>ESPECTROMETRIA DE MASSAS</i>	26
JUSTIFICATIVA	28
OBJETIVOS	29
3.1. OBJETIVO PRIMÁRIO.....	29
3.2. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS.....	29
METODOLOGIA	30
4.1. MODELO DE ESTUDO E LOCAL DE REALIZAÇÃO	30
4.2. PARTICIPANTES E CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE	30
4.3. PROTOCOLO DE ESTIMULAÇÃO OVARIANA E SUPLEMENTAÇÃO DE FASE LÚTEA	31
4.4. CAPTAÇÃO OOCITÁRIA	32
4.5. COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS	33
4.6. ICSI E A AVALIAÇÃO DA QUALIDADE EMBRIONÁRIA	34
4.7. DEMAIS VARIÁVEIS ANALISADAS	34
4.8. EXTRAÇÃO LIPÍDICA	35
4.9. LC-MS/MS.....	35
4.10. TAMANHO DO ESTUDO	37
4.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
RESULTADOS.....	39
5.1. FLUXOGRAMA	39
5.2. CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS	41
5.3. CONCENTRAÇÃO DE EICOSANOIDES.....	45
5.4. CORRELAÇÃO ENTRE EICOSANOIDES NO SORO E NO FF.....	50
5.5. CORRELAÇÃO ENTRE EICOSANOIDES NO SORO E RESULTADOS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA	51
5.6. CORRELAÇÃO ENTRE EICOSANOIDES NO FF E RESULTADOS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA	52
DISCUSSÃO	54
CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS	62
APÊNDICE	73
9.1. CONDIÇÕES PARA LC-MS/MS	73
9.2. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO GRUPO ENDOMETRIOSE.....	75
9.3. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO GRUPO CONTROLE	80

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Endometriose

A endometriose é uma condição ginecológica inflamatória crônica, benigna, estrogênio-dependente (ESKENAZI; WARNER, 1997), caracterizada pela presença e crescimento de implantes endometriais compostos por glândula e/ou estroma fora da cavidade uterina, principalmente no peritônio, ovários e septo retrovaginal (GUPTA; GOLDBERG; AZIZ; GOLDBERG *et al.*, 2008). Os sintomas da endometriose incluem dor pélvica, dispareunia, dismenorrea e infertilidade, podendo ser, entretanto, assintomática (BURNEY; GIUDICE, 2012). Possui uma elevada prevalência, afetando de 6 a 10% das mulheres em idade reprodutiva (BURNEY; GIUDICE, 2012). Por se tratar de uma doença muitas vezes acompanhada de dor pélvica crônica e formação de aderências (GIUDICE; KAO, 2004), acaba por repercutir na qualidade de vida das portadoras, tanto por impacto na saúde física e psicológica, quanto pelo impacto socioeconômico, visto os custos de diagnóstico e tratamento. Diante disso, a endometriose tem sido considerada um problema de saúde pública (SIGNORILE; BALDI, 2010). Apesar da nítida importância e de extensivos estudos a respeito, a etiopatogenia da endometriose ainda não é bem esclarecida (BURNEY; GIUDICE, 2012).

A fim de se padronizar o diagnóstico de endometriose, bem como definir diferentes estádios, a Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (ASRM) propôs, em 1997, um sistema de classificação da doença baseado nas características morfológicas do implante endometriótico, levando-se em consideração a dimensão e profundidade das lesões, e se há presença de aderências pélvicas. No estágio I ou endometriose mínima, as lesões de endometriose são isoladas e não há presença de aderências. No estágio II ou endometriose leve, há presença de lesões ectópicas superficiais de menos de 5 cm e aderências pouco significativas, que não provocam alterações anatômicas. No estágio III ou endometriose moderada, há múltiplos implantes endometrióticos, com aderências peritubárias e periovarianas evidentes. E no estágio IV ou endometriose grave, os focos endometrióticos são múltiplos, com implantes superficiais e profundos, endometriomas ovarianos e aderências densas que levam a alterações anatômicas (ASRM, 1997).

1.2. Endometriose e infertilidade

A endometriose é frequentemente associada à infertilidade (ASRM, 2012). Sabe-se que a taxa de fecundidade mensal em casais normais em idade reprodutiva é de 15 a 20%, enquanto que em mulheres inférteis com endometriose essa taxa varia entre 2 e 10% (HUGHES; FEDORKOW; COLLINS, 1993). A endometriose está presente em 25 a 50% das mulheres inférteis (BULLETTI; COCCIA; BATTISTONI; BORINI, 2010), sendo que 30 a 50% das portadoras de endometriose têm dificuldade em ter filhos (BULLETTI; COCCIA; BATTISTONI; BORINI, 2010; MACER; TAYLOR, 2012). Apesar dos estudos apoiarem as evidências de redução da fecundidade em portadoras da doença, os mecanismos envolvidos na etiopatogênese da infertilidade associada à endometriose ainda não foram integralmente elucidados, especialmente nos estádios iniciais da doença, em que não são observadas alterações anatômicas do trato reprodutivo (HOLOCH; LESSEY, 2010).

As mulheres inférteis portadoras dos graus moderado e grave de endometriose (estágios III, e IV, respectivamente), podem ter sua infertilidade justificada pelas alterações anatômicas ocasionadas pelas adesões pélvicas e peritubárias características desse estágio da doença. Tais alterações podem originar obstrução tubária, o que prejudica a comunicação entre ovários e ambiente uterino, e dificulta a liberação, captação e transporte do oócito (BULLETTI; COCCIA; BATTISTONI; BORINI, 2010). Endometriomas são pseudocistos produzidos pelo acúmulo de detritos menstruais e sangramento de lesões endometrióticas no ovário (HUGHESDON, 1957), e podem estar presentes no caso de endometriose moderada e grave, sendo que de 30 a 40% das mulheres com endometriose apresentam endometrioma (VERCELLINI; CHAPRON; DE GIORGI; CONSONNI *et al.*, 2003). Sua presença também parece influenciar negativamente na fertilidade, já que pode gerar um microambiente folicular citotóxico, prejudicando o desenvolvimento oocitário (PAFFONI; BOLIS; FERRARI; BENAGLIA *et al.*, 2019), além de diminuir o número de folículos no córtex ovariano (KITAJIMA; DEFRÈRE; DOLMANS; COLETTE *et al.*, 2011).

Entretanto, as mulheres com endometriose mínima e leve (estágios I e II, respectivamente), nas quais o acometimento da doença não causa as alterações anatômicas observadas nos graus mais severos, também apresentam infertilidade (HOLOCH; LESSEY, 2010). Um estudo de D'Hooghe apontou que a prevalência de endometriose para mulheres férteis foi de 4% em comparação com 33% na população infértil. Das mulheres com a doença, 68% tinham doença mínima ou leve e 32% tinham endometriose moderada ou grave. Também

foi mostrado que mulheres com endometriose mínima e leve tiveram uma taxa de fecundidade mensal de 3,6% em comparação com mulheres com infertilidade por fator masculino grave, que tiveram a taxa de fecundidade mensal de 12%, ambos os grupos recebendo sêmen de doador (D'HOOGHE; DEBROCK; HILL; MEULEMAN, 2003).

Nesse sentido, pode-se pensar que a etiologia da infertilidade em mulheres com endometriose vai além de alterações anatômicas. Diversos estudos têm sido conduzidos a fim de elucidar essa questão. Ao se comparar a morfologia de embriões de mulheres com endometriose a embriões de mulheres sem a patologia, foi notado que os embriões do grupo de estudo tiveram alterações morfológicas no dia 1 (D1) e dia 2 (D2) do desenvolvimento embrionário, sendo que tais alterações estão relacionadas negativamente com as taxas em implantação e gestação (BRIZEK; SCHLAFF; PELLEGRINI; FRANK *et al.*, 1995). Estudos dos efeitos do fluido peritoneal (MORCOS; GIBBONS; FINDLEY, 1985) e do soro (DAMEWOOD; HESLA; SCHLAFF; HUBBARD *et al.*, 1990) obtidos de mulheres com endometriose demonstram a toxicidade desses fluidos em embriões de camundongos em cultura, implicando essencialmente em um efeito sistêmico da doença *in vivo*.

A capacidade do oócito de completar a maturação, estando em fase de metáfase II (MII), e de passar por uma fertilização bem-sucedida, reflete uma boa qualidade oocitária. Logo, o número de oócitos MII recuperados e a taxa de fertilização observada nos resultados de FIV/ICSI podem ser adotados como marcadores clínicos de competência oocitária (SANCHEZ; VANNI; BARTIROMO; PAPALEO *et al.*, 2017). Evidências parecem sugerir que uma redução no número de oócitos maduros recuperados está consistentemente associada à endometriose, em comparação com outras causas de infertilidade (BARBOSA; TEIXEIRA; NAVARRO; FERRIANI *et al.*, 2014; SHEBL; SIFFERLINGER; HABELSBERGER; OPPELT *et al.*, 2017), bem como uma redução nas taxas de fertilização (BARNHART; DUNSMOOR-SU; COUTIFARIS, 2002). Esse conjunto de observações apoiam a hipótese de que a infertilidade de pacientes com endometriose está relacionada à diminuição da qualidade do oócito.

Alguns autores também consideram o papel do endométrio eutópico na infertilidade relacionada à endometriose, de modo que alterações na receptividade endometrial podem comprometer a implantação do embrião em mulheres com a doença, principalmente por expressão anormal de moléculas durante a janela de implantação (BULLETTI; COCCIA; BATTISTONI; BORINI, 2010; GIUDICE; KAO, 2004; WEI; ST CLAIR; FU; STRATTON

et al., 2009). Em contrapartida, estudos mais recentes mostraram que a expressão simultânea de genes cruciais para a receptividade endometrial não parece sofrer alterações significativas em mulheres inférteis com endometriose durante a janela de implantação (DA BROI; ROCHA; CARVALHO; MARTINS *et al.*, 2017; GARCIA-VELASCO; FASSBENDER; RUIZ-ALONSO; BLESÁ *et al.*, 2015).

Estudos em programas de ovodoação reforçam um papel prioritário da qualidade oocitária na etiopatogênese da infertilidade associada à endometriose: pacientes com endometriose têm as mesmas chances de implantação e gravidez que outras receptoras quando os oócitos são provenientes de doadoras saudáveis (SIMÓN; GUTIÉRREZ; VIDAL; DE LOS SANTOS *et al.*, 1994; SUNG; MUKHERJEE; TAKESHIGE; BUSTILLO *et al.*, 1997). Em contraste, as pacientes que receberam embriões derivados de oócitos de mulheres com endometriose mostraram uma taxa de implantação significativamente reduzida (PELLICER; OLIVEIRA; GUTIERREZ, 1994). Esses estudos apoiam a ideia de que a infertilidade de pacientes com endometriose pode não estar relacionada ao fator endometrial, mas sim à diminuição da qualidade do oócito (SANCHEZ; VANNI; BARTIROMO; PAPALETTO *et al.*, 2017).

1.3. Processo inflamatório e estresse oxidativo

Evidências crescentes apoiam a conceituação da endometriose como uma condição inflamatória pélvica (BURNEY; GIUDICE, 2012). Em mulheres com endometriose, o líquido peritoneal apresenta um número aumentado de macrófagos ativados e diferenças importantes no perfil de citocinas e quimocinas (RANA; BRAUN; HOUSE; GEBEL *et al.*, 1996). O microambiente peritoneal no cenário da endometriose é notavelmente rico em prostaglandinas, e esses mediadores inflamatórios provavelmente desempenham um papel central na fisiopatologia da doença, bem como nas sequelas clínicas de dor e infertilidade (BURNEY; GIUDICE, 2012). Macrófagos peritoneais de mulheres com endometriose expressam níveis mais elevados de ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e liberam quantidades significativamente maiores de prostaglandinas do que macrófagos de mulheres saudáveis (WU; SUN; LIN; HSIAO *et al.*, 2002).

Em relação às causas de infertilidade associada à endometriose, mediadores inflamatórios encontrados nos fluidos peritoneal e folicular podem atuar na proliferação, diferenciação celular e invasão de blastocistos (MALVEZZI; HERNANDES; PICCINATO;

PODGAEC, 2019). Entre os efeitos nocivos descritos estão a diminuição da qualidade do oócito (BARCELOS; VIEIRA; FERREIRA; MARTINS *et al.*, 2009; DA BROI; NAVARRO, 2016; FERREIRA; GIORGI; RODRIGUES; DE ANDRADE *et al.*, 2019; GIORGI; DA BROI; PAZ; FERRIANI *et al.*, 2016; MALVEZZI; DA BROI; J; ROSA-E-SILVA *et al.*, 2018), distúrbios de interação espermatozóide/oócito (HSU; TOWNSEND; OEHNINGER; CASTORA, 2015), e prejuízo na qualidade do embrião, em sua implantação e desenvolvimento (STILLEY; BIRT; SHARPE-TIMMS, 2012). Qualquer um desses efeitos leva a uma condição reprodutiva alterada (HAYDARDEDEOGLU; ZEYNELOGLU, 2015). Os sintomas de dor também são agravados pela resposta inflamatória local secundária à ativação das respostas imunes (ARNOLD; VERCELLINO; CHIANTERA; SCHNEIDER *et al.*, 2013).

A inflamação está associada à ativação do sistema de coagulação, aumento da perfusão e da permeabilidade vascular, bem como à produção de mediadores inflamatórios, incluindo os derivados do ácido araquidônico (AA) e do ácido linoleico (LA). Uma inflamação sistêmica pode interferir no curso normal dos ciclos menstruais, nos processos de foliculogênese, ovulação e implantação do embrião (SZCZUKO; KIKUT; KOMORNIK; BILICKI *et al.*, 2020).

As prostaglandinas (PGs) são mediadores lipídicos do tipo eicosanoides e são importantes reguladoras da ruptura folicular e liberação do oócito, e estão envolvidas na regulação da esteroidogênese, remodelação tecidual e neovascularização de folículos luteinizantes (DU; GAO; SHI; SUN *et al.*, 2013). Estudos demonstraram que oócitos de macacos e camundongos expressam receptores funcionais de prostaglandinas E₂ (PGE₂), e que podem atuar diretamente em oócitos de mamíferos para retardar a maturação nuclear (MARTORIATI; LALMANACH; GOUDET; GÉRARD, 2002). Um estudo de Yan-Bo Du e colaboradores mostrou que o fluido folicular de mulheres com endometriose apresentou elevados níveis de PGE₂, sendo que as mesmas mulheres tiveram uma diminuição do número de oócitos maduros e maus resultados nos tratamentos de reprodução assistida (DU; GAO; SHI; SUN *et al.*, 2013). Tais resultados sugerem que concentrações alteradas de PGE₂ podem perturbar o desenvolvimento de folículos e oócitos.

Vários autores têm associado a endometriose ao estresse oxidativo (EO) (DA BROI; DE ALBUQUERQUE; DE ANDRADE; CARDOSO *et al.*, 2016; DA BROI; JORDÃO; FERRIANI; NAVARRO, 2018; GIORGI; DA BROI; PAZ; FERRIANI *et al.*, 2016; GUPTA;

AGARWAL; KRAJCIR; ALVAREZ, 2006; GUPTA; GOLDBERG; AZIZ; GOLDBERG *et al.*, 2008) de modo que os implantes endometriais ectópicos promoveriam uma resposta inflamatória (MURPHY; SANTANAM; PARTHASARATHY, 1998) com recrutamento e ativação de macrófagos, liberação de citocinas e aumento de espécies reativas (AGARWAL; SALEH; BEDAIWY, 2003; RUDER; HARTMAN; BLUMBERG; GOLDMAN, 2008). Uma tendência a maior produção de agentes pró-oxidantes associada a uma potencial alteração da sua capacidade antioxidante poderia promover a perda do equilíbrio redox do trato reprodutivo e induzir à ocorrência de EO nessas pacientes (AGARWAL; SALEH; BEDAIWY, 2003; GUPTA; AGARWAL; KRAJCIR; ALVAREZ, 2006; RUDER; HARTMAN; BLUMBERG; GOLDMAN, 2008), o que, por sua vez, poderia estar envolvido no comprometimento da fertilidade (AGARWAL; APONTE-MELLADO; PREMKUMAR; SHAMAN *et al.*, 2012; DA BROI; JORDÃO; FERRIANI; NAVARRO, 2018; DA BROI; MALVEZZI; PAZ; FERRIANI *et al.*, 2014; GIORGI; DA BROI; PAZ; FERRIANI *et al.*, 2016).

Reforçando essa hipótese, estudos têm evidenciado alterações em marcadores inflamatórios e oxidativos no fluido peritoneal de mulheres com a doença (FAN; CHEN; CHEN; LIU *et al.*, 2018; POLAK; WERTEL; BARCZYŃSKI; KWAŚNIEWSKI *et al.*, 2013). Além disso, o estresse oxidativo parece não se restringir apenas ao local das lesões, de modo que há evidências de sua ocorrência também a nível sistêmico (ANDRADE; RODRIGUES; DIB; ROMÃO *et al.*, 2010; DA BROI; DE ALBUQUERQUE; DE ANDRADE; CARDOSO *et al.*, 2016; LIU; HE; LIU; SHI *et al.*, 2013; PRIETO; QUESADA; CAMBERO; PACHECO *et al.*, 2012) e folicular (CHOI; CHO; SEO; PARK *et al.*, 2015; DA BROI; JORDÃO; FERRIANI; NAVARRO, 2018; DA BROI; MALVEZZI; PAZ; FERRIANI *et al.*, 2014; GIORGI; DA BROI; PAZ; FERRIANI *et al.*, 2016; SINGH; CHATTOPADHYAY; CHAKRAVARTY; CHAUDHURY, 2013). Como EO pode comprometer a qualidade oocitária (LIU; TRIMARCHI; NAVARRO; BLASCO *et al.*, 2003; NAVARRO; LIU; FERRIANI; KEEFE, 2006; NAVARRO; LIU; KEEFE, 2004), as alterações identificadas em marcadores de EO no soro e no fluido folicular (FF) dessas mulheres poderiam sugerir consequente impacto no desenvolvimento oocitário, comprometendo a qualidade gamética dessas pacientes.

1.4. Lipídios

Os lipídios são importantes alvos do EO (AGARWAL; SALEH; BEDAIWY, 2003). A produção de agentes pró-oxidantes pode promover a peroxidação lipídica, de seus produtos

de degradação e dos produtos formados pela sua interação com as lipoproteínas de baixa densidade e outras proteínas (AUGOULEA; MASTORAKOS; LAMBRINOUDAKI; CHRISTODOULAKOS *et al.*, 2009). Sabe-se que os lipídios são os principais constituintes das membranas celulares, são responsáveis por estocar energia dentro da célula e atuam como precursores de mensageiros secundários (MOK; SHIN; LEE; LEE *et al.*, 2016). No microambiente folicular, os lipídios têm um importante papel no desenvolvimento de competência e na maturação oocitária (MOK; SHIN; LEE; LEE *et al.*, 2016).

Como os oócitos não sintetizam lipídios, eles obtêm essas moléculas das células foliculares que o circundam e do FF, acumulando-os durante a maturação oocitária (AARDEMA; VOS; LOLICATO; ROELEN *et al.*, 2011; DA BROI; GIORGI; WANG; KEEFE *et al.*, 2018). Ácidos graxos (AG) são estocados, sob a forma de triglicerídeos (TAG), dentro das gotículas lipídicas existentes nas células do cumulus (CC) e no oócito, e são oxidados pela mitocôndria para gerar energia para a síntese proteica durante a maturação oocitária e o desenvolvimento embrionário inicial (DUNNING; ANASTASI; ZHANG; RUSSELL *et al.*, 2014). Os fosfolipídios e o colesterol são essenciais para a formação das membranas celulares e são componentes extremamente importantes para a divisão celular após a fertilização (DUNNING; ANASTASI; ZHANG; RUSSELL *et al.*, 2014). Lipoproteínas, TAG e AG insaturados, como o oleico e linoleico e saturados, como o palmítico e o esteárico, são os principais componentes encontrados no FF humano (DUNNING; ANASTASI; ZHANG; RUSSELL *et al.*, 2014) e seu perfil reflete, em menores níveis, o perfil encontrado no soro (LEROY; VANHOLDER; DELANGHE; OPSOMER *et al.*, 2004; VALCKX; DE PAUW; DE NEUBOURG; INION *et al.*, 2012).

O impacto do conteúdo lipídico folicular sobre o potencial reprodutivo tem sido alvo de diversos estudos. Alguns autores têm associado altos níveis dos AG palmítico e esteárico no FF de mulheres submetidas a tratamentos de Reprodução Assistida a efeitos deletérios na maturação oocitária, nas taxas de fertilização, implantação e no desenvolvimento embrionário (MIRABI; CHAICHI; ESMAEILZADEH; ALI JORSARAEI *et al.*, 2017). Além disso, a presença de altas concentrações desses ácidos graxos no FF tem sido associada a efeitos inibidores na quantidade de lipídios estocados dentro das gotículas lipídicas das células do cumulus e do oócito (SHAAKER; RAHIMIPOUR; NOURI; KHANAKI *et al.*, 2012) e, também, à pobre morfologia do complexo cumulus-oócito (COC) (JUNGHEIM; MACONES; ODEM; PATTERSON *et al.*, 2011).

Curiosamente, embriões humanos com falha de desenvolvimento (HAGGARTY; WOOD; FERGUSON; HOAD *et al.*, 2006) apresentam a mesma composição de AG que oócitos com falha de fertilização (MATORRAS; RUIZ; MENDOZA; RUIZ *et al.*, 1998), apresentando um predomínio de AG palmítico e esteárico. Além do mais, qualquer modificação na estrutura dos fosfolipídios presentes nas membranas celulares das células foliculares e do oócito altera sua fluidez e sua permeabilidade (MOK; SHIN; LEE; LEE *et al.*, 2016). Mok et al. (2016) evidenciaram a redução de várias subclasses de fosfolipídios em oócitos de camundongos que sofreram estresse oxidativo, indicando que a integridade dos fosfolipídios presentes na membrana plasmática do oócito pode ser afetada nessas condições, tornando-os alvos do possível EO que ocorre em portadoras da doença (MOK; SHIN; LEE; LEE *et al.*, 2016).

No contexto da endometriose, há evidências de aumento dos níveis de peróxidos lipídicos no fluido peritoneal (LIU; LUO; ZHAO, 2001) e fluido folicular (FF) de suas portadoras (DE LIMA; CORDEIRO; CAMARGO; ZYLBERSZTEJN *et al.*, 2017; NASIRI; MOINI; EFTEKHARI-YAZDI; KARIMIAN *et al.*, 2017; PETEAN; FERRIANI; DOS REIS; DE MOURA *et al.*, 2008; SINGH; CHATTOPADHYAY; CHAKRAVARTY; CHAUDHURY, 2013). Além disso, análise lipídômica do FF de mulheres inférteis com endometriose encontrou duas subclasses lipídicas hiperrepresentadas (fosfatidilcolina e esfingomielina) (CORDEIRO; CATALDI; PERKEL; DA COSTA *et al.*, 2015), ambas componentes da membrana celular e fortemente relacionadas à apoptose (VOUK; HEVIR; RIBIĆ-PUCELJ; HAARPAINTNER *et al.*, 2012).

Sabe-se que o microambiente folicular pode ser impactado pelo conteúdo sanguíneo, uma vez que o FF é formado, em parte, pelo transudato proveniente do plasma (EDWARDS, 1974; PRIETO; QUESADA; CAMBERO; PACHECO *et al.*, 2012). Nesse contexto, o perfil lipídico do FF pode refletir o encontrado no soro (LEROY; VANHOLDER; DELANGHE; OPSOMER *et al.*, 2004; VALCKX; DE PAUW; DE NEUBOURG; INION *et al.*, 2012).

1.5. Metabolismo de ácidos graxos e eicosanoides

Os metabólitos dos ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) são moléculas bioativas envolvidas em eventos fisiopatológicos que afetam a maioria das células e tecidos humanos, como regulação do sistema imune, produção de citocinas, formação de anticorpos, diferenciação, proliferação e migração celular (HARIZI; CORCUFF; GUALDE, 2008). Esses

mediadores lipídicos derivados de PUFAs podem ser produzidos por meio de reações iniciadas por espécies reativas de oxigênio (ROS), ou por reações de oxigenação mediada por enzimas, sendo elas a ciclo-oxigenase (COX), a lipoxigenase (LOX) e o citocromo P450 (CYP) (MASSEY; NICOLAOU, 2011).

O ácido araquidônico (AA) é um PUFA liberado de fosfolipídios de membrana pela ação das enzimas fosfolipases A2 (PLA2) em resposta a estímulos inflamatórios (HARIZI; CORCUFF; GUALDE, 2008). É do AA e de outros PUFAs, como o ácido eicosapentaenoico (EPA) e o ácido docosahexaenóico (DHA), que se derivam os mediadores lipídicos, entre eles os eicosanoides (MASSEY; NICOLAOU, 2013), lipídios bioativos de grande importância fisiopatológica, por terem papel fundamental na inflamação, sendo os derivados de AA considerados predominantemente pró-inflamatórios, e os derivados de EPA e DHA predominantemente anti-inflamatórios (CALDER, 2006). Embora a maioria dos tipos de células seja capaz de sintetizar eicosanoides, eles são produzidos principalmente por basófilos, eosinófilos, macrófagos, mastócitos, monócitos e neutrófilos (FUNK, 2001).

Quando metabolizados pelas isoformas da COX (COX-1 constitutiva ou COX-2 induzível), os AAs e EPAs geram prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos (TXs). (HELLIWELL; ADAMS; MITCHELL, 2004). Quando submetidos à oxigenação por ação da LOX, os PUFAs podem gerar uma série de eicosanoides: por exemplo, AA produz ácidos hidroxeicosatetraenoicos (HETEs), leucotrienos (LTs) e lipoxinas (LXs); EPA gera ácidos hidroxeicosapentaenóicos (HEPEs) e resolvinas da série E (RvE's); e o DHA produz docosanóides, ácidos hidroxidocosahexaenóicos (HDHAs), maresinas, resolvinas da série D (RvD's) e protectinas (PDs) (KÜHN; O'DONNELL, 2006). Ao usar AA como substrato, o CYP pode formar HETE e ácido epoxieicosatrienoico (EET) que são posteriormente metabolizados em ácidos di-hidroxeicosatetraenóicos (DHET) (KONKEL; SCHUNCK, 2011). Finalmente, em relação às reações mediadas por ROS, destacando-se as reações de peroxidação lipídica de PUFAs, que podem formar uma variedade de pequenas moléculas lipídicas com estruturas e funções que se assemelham as dos eicosanoides, sendo eles os isoprostanos, levuglandinas e isolevuglandinas (CATALÁ, 2010).

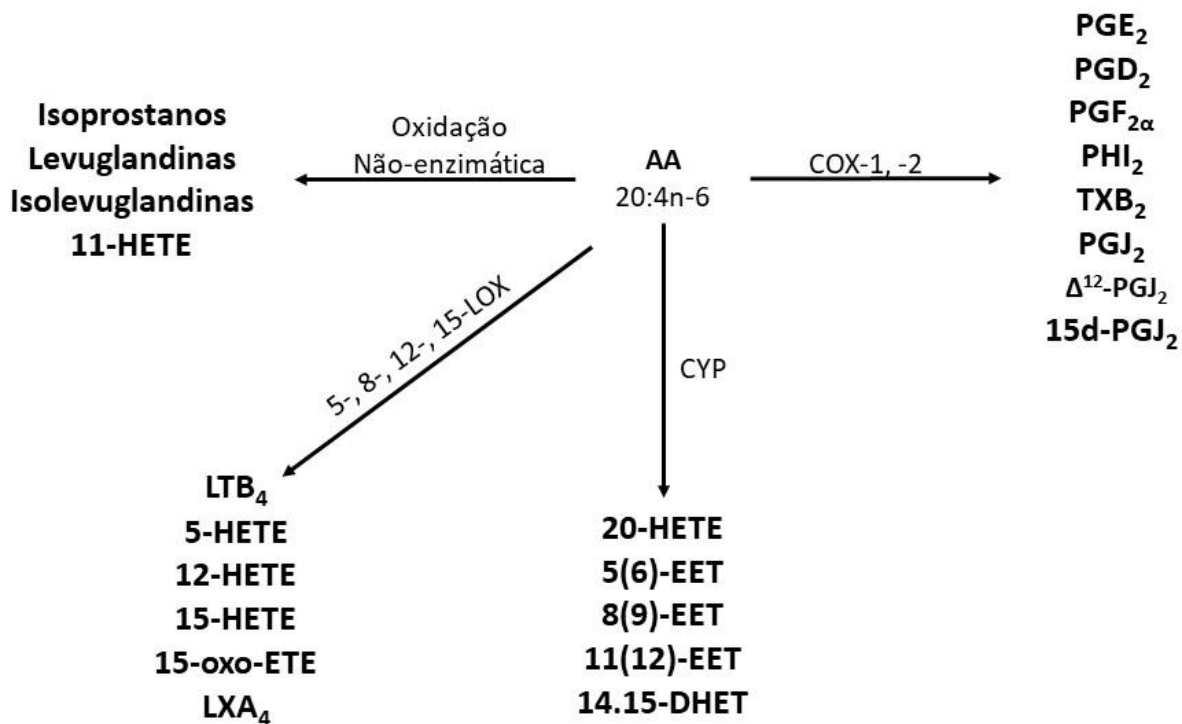


Figura 1: metabolismo do ácido araquidônico (AA), gerando diferentes espécies de eicosanoides pelas vias enzimáticas COX, LOX e CYP, e pela via de oxidação não-enzimática (por ROS).

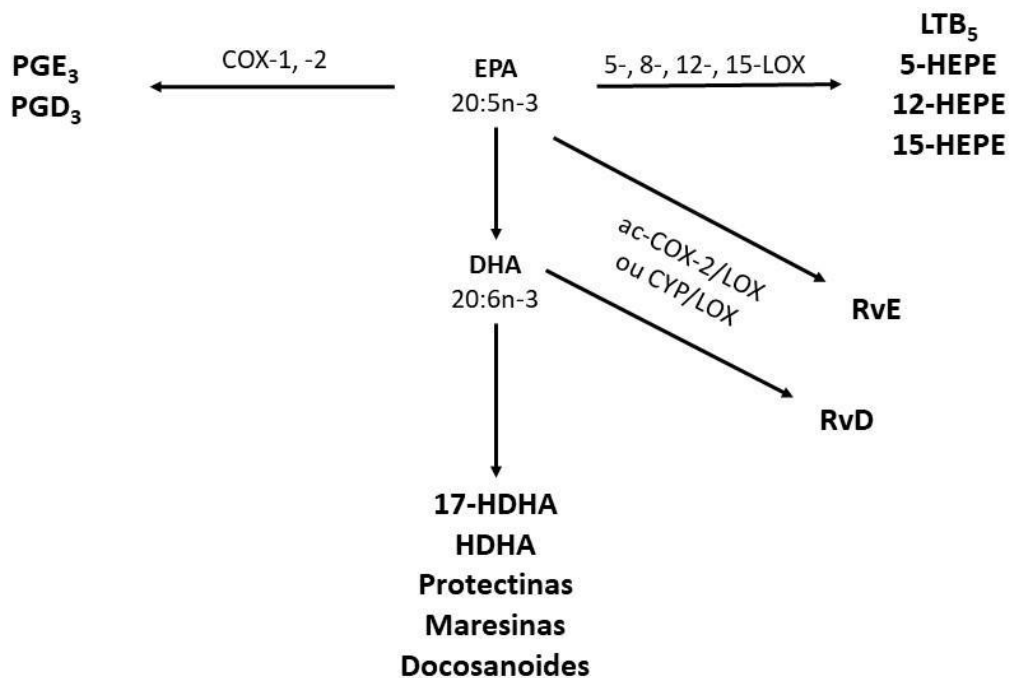


Figura 2: metabolismo dos ácidos graxos poli-insaturados EPA e DHA, gerando diferentes espécies de eicosanoides pela via enzimáticas da COX e LOX.

Sendo assim, considerando que há evidências de inflamação peritoneal e estresse oxidativo sistêmico em mulheres inférteis com endometriose, com consequente potencial impacto folicular, e sendo os lipídios importantes alvos de espécies reativas, incluindo os eicosanoides, que também são mediadores da resposta inflamatória, questionamos a existência de alterações no perfil de eicosanoides que poderiam alterar o microambiente folicular e prejudicar o recrutamento folicular, a maturação oocitária, a ovulação, a fertilização e/ou o desenvolvimento do futuro embrião (LEROY; VANHOLDER; MATEUSEN; CHRISTOPHE *et al.*, 2005). Exemplo direto disso são os estudos que apontam as alterações na prostaglandina E2, um tipo de eicosanoide (DU; GAO; SHI; SUN *et al.*, 2013), ou na via de produção da PGE2 (DA LUZ; DA BROI; DONABELA; PARO *et al.*, 2017) nas mulheres com endometriose e seu respectivo efeito na qualidade oocitária.

Até o momento, nenhum estudo avaliou o perfil de metabólitos de ácidos graxos poli-insaturados no soro e fluido folicular de mulheres inférteis com endometriose e controles e os correlacionou com os resultados dos procedimentos de Reprodução Assistida, o que traria importantes dados acerca dos mecanismos inerentes à infertilidade associada a essa patologia.

1.6. Espectrometria de massas

A lipidômica se baseia na identificação e quantificação de lipídios em um determinado sistema biológico, a fim de se elucidar como o metabolismo e funções lipídicas podem ser afetados por determinadas espécies moleculares (BLANKSBY; MITCHELL, 2010). Novas tecnologias para melhor compreensão da composição lipídica vêm sendo definidas, dentre elas a espectrometria de massas (MS) (FERREIRA; SOUZA; RICCIO; CATHARINO *et al.*, 2009; FERREIRA; SARAIVA; CATHARINO; GARCIA *et al.*, 2010), que consiste em uma técnica analítica rápida, versátil e sensível, permitindo a detecção e determinação de biomoléculas, assim como sua quantificação. A abordagem lipidômica, através da MS, contribui para o estudo dos papéis biológicos dos lipídios na sinalização, no metabolismo e na estrutura da membrana celular (FERREIRA; SARAIVA; CATHARINO; GARCIA *et al.*, 2010).

A análise de mediadores lipídicos, entre eles os eicosanoides, por espectrometria de massas é particularmente desafiadora, pois esses estão presentes em concentrações extremamente baixas, são temporariamente formados por demanda das células e frequentemente têm meia-vida limitada. Para dificultar mais a situação, podem ser geradas

espécies isoméricas desses lipídios, as quais possuem função metabólica distinta e específica (MASSEY; NICOLAOU, 2011).

Nesse sentido, a cromatografia líquida com espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS) vem se mostrando um excelente método na identificação e quantificação de lipídios com baixa concentração em amostras biológicas (TAM, 2013). Em particular, o advento da ionização por electrospray (ESI) transformou completamente a forma como esses mediadores são identificados e quantificados, resultando em grandes melhorias na seletividade e sensibilidade (FENN; MANN; MENG; WONG *et al.*, 1989; MURPHY; BARKLEY; ZEMSKI BERRY; HANKIN *et al.*, 2005). Além disso, o monitoramento de reação múltipla (MRM) permite a rápida separação e identificação de espécies de lipídios, minimizando os requisitos de preparação de amostras e evitando reações de derivatização (DOMINIC M. DESIDERIO, 2021).

Deste modo, para o propósito do nosso estudo, a MS é uma poderosa e confiável ferramenta para identificação de eicosanoides no soro e no fluido folicular, o que poderia se refletir no microambiente folicular e afetar a qualidade oocitária, contribuindo para o entendimento adequado da infertilidade em mulheres portadoras de endometriose.

JUSTIFICATIVA

A endometriose, doença de elevada prevalência populacional, tem sido frequentemente associada à infertilidade, havendo forte embasamento na literatura acerca da sua relação com a redução da fecundidade em ciclos naturais. Todavia, os mecanismos relacionados à redução da fertilidade natural em pacientes inférteis com endometriose, especialmente na doença inicial, ainda não são claramente conhecidos. Nesse sentido, evidências recentes sugerem que o comprometimento da qualidade oocitária possa ser um fator prioritário envolvido na patogênese da infertilidade relacionada à doença.

A endometriose tem sido associada à inflamação peritoneal e ao estresse oxidativo sistêmico e folicular, o que poderia impactar a competência oocitária em portadoras da doença. Processos inflamatórios e EO podem modificar o perfil de metabólitos lipídicos do folículo ovariano dessas pacientes e, conseqüentemente, comprometer o desenvolvimento oocitário.

Sabe-se que o microambiente folicular pode ser impactado pelo conteúdo sanguíneo, uma vez que o FF é formado, em parte, pelo transudato proveniente do plasma. Nesse sentido, o perfil lipídico do FF reflete o encontrado no soro. Considerando que há evidências de inflamação e estresse oxidativo sistêmicos em mulheres inférteis com endometriose, com consequente potencial impacto folicular, e sendo os metabólitos lipídicos importantes mediadores de resposta inflamatória, bem como os ácidos graxos e fosfolipídios alvos de espécies reativas, questionamos a existência de alterações no perfil lipídico sérico que poderiam alterar o microambiente folicular e prejudicar a qualidade oocitária. Até o momento, nenhum estudo avaliou o perfil de eicosanoides no soro e no fluido folicular de mulheres inférteis com endometriose e controles e o correlacionou com os resultados dos procedimentos de Reprodução Assistida, o que traria importantes dados acerca desta enigmática patologia.

Dessa forma, torna-se essencial uma análise completa do perfil de eicosanoides do soro e do fluido folicular de mulheres inférteis com e sem a doença e sua correlação com os resultados de Reprodução Assistida para um melhor entendimento da etiopatogenia da infertilidade associada à endometriose.

OBJETIVOS

3.1. *Objetivo Primário*

Comparar o perfil de eicosanoides no soro e fluido folicular de mulheres inférteis com endometriose e com infertilidade por fator tubário e/ou masculino submetidas a EOC para realização de fertilização *in vitro*.

3.2. *Objetivos Secundários*

Correlacionar o perfil de eicosanoides observado no soro com o observado no fluido folicular de mulheres inférteis com endometriose e controles.

Correlacionar o perfil de eicosanoides sérico e do fluido folicular de mulheres inférteis com endometriose e controles com seus respectivos resultados das técnicas de Reprodução Assistida (número de oócitos captados, número de oócitos maduros, número de oócitos fertilizados, taxa de fertilização, número de embriões clivados, taxa de clivagem, número de embriões formados em D2, número de embriões de boa qualidade em D2, número de embriões formados em D3, número de embriões de boa qualidade em D3, taxa de implantação, taxa de gestação química, taxa de gestação clínica e taxa de nascidos vivos).

Comparar o perfil de eicosanoides no soro e fluido folicular de mulheres inférteis com endometriose sem endometrioma, endometriose com endometrioma e com infertilidade por fator tubário e/ou masculino submetidas a EOC para realização de fertilização *in vitro*.

Correlacionar o perfil de eicosanoides observado no soro com o observado no fluido folicular de mulheres inférteis com endometriose sem endometrioma, endometriose com endometrioma e com infertilidade por fator tubário e/ou masculino.

Correlacionar o perfil de eicosanoides sérico e do fluido folicular de mulheres inférteis com endometriose sem endometrioma, endometriose com endometrioma e com infertilidade por fator tubário e/ou masculina com seus respectivos resultados das técnicas de Reprodução Assistida.

METODOLOGIA

4.1. Modelo de estudo e local de realização

Trata-se de um estudo observacional caso-controle não multicêntrico, aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (parecer nº 3.349.839), desenvolvido junto ao Setor de Reprodução Humana, no DGO do Hospital das Clínicas (HC) FMRP/USP. A coleta e o preparo do material foram realizados no laboratório de Ginecologia e Obstetrícia – HCFMRP/USP. Os procedimentos de extração lipídica das amostras e a análise do perfil de eicosanoides, por espectrometria de massas, de extratos lipídicos extraídos de amostras de soro e fluido folicular foram realizados na *Facility* do Centro de Excelência em Quantificação e Identificação de Lipídios (Ceqil) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP).

4.2. Participantes e Critérios de elegibilidade

Pacientes do Setor de Reprodução Humana, do DGO do HCFMRP/USP que preencheram os critérios de elegibilidade no período de setembro de 2019 a outubro de 2021, foram convidadas a participar do estudo. As pacientes que concordaram em conceder as amostras de sangue periférico e de fluido folicular assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) previamente à inclusão no estudo. Como rotina do serviço de Reprodução Humana, todas as pacientes foram clinicamente examinadas para se determinar o fator de infertilidade e somente foram incluídas pacientes submetidas aos protocolos de estimulação ovariana controlada (EOC) definidos no estudo. Para este estudo, as pacientes foram divididas no grupo endometriose e grupo controle infértil (fator tubário e/ou masculino de infertilidade).

Foram consideradas elegíveis as pacientes com idade inferior a 38 anos, IMC entre 18,5 kg/m² e 30 kg/m², sem quaisquer outras condições patológicas associadas como dislipidemia, doenças autoimunes, hormonais (síndrome de ovários policísticos - SOP, tireoidopatias e outras), neoplasias malignas, insuficiência ovariana precoce, anovulação crônica, hidrossalpinge, doença cardiovascular, doenças reumatológicas, doenças renais,

hepatopatias, doenças crônicas como *diabetes melittus* e outras endocrinopatias, infecção pelo vírus HIV, hipertensão, qualquer infecção ativa, tabagismo, assim como usuárias crônicas de medicações antidislipídêmica, hormonais, de anti-inflamatórios hormonais e não hormonais e de medicamentos como tiazídicos, betabloqueadores, corticóides e hormônio de crescimento nos seis meses anteriores à inclusão no estudo.

No grupo endometriose foram selecionadas pacientes com infertilidade associada exclusivamente à endometriose, em todos os estadiamentos da doença (grau I a IV), diagnosticada e classificada por videolaparoscopia (segundo os critérios da ASRM, 1997) (Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996, 1997), ou então diagnosticadas por USTV, com a presença de endometrioma. No grupo controle, foram incluídas pacientes que apresentaram infertilidade por fator tubário (sem hidrossalpinge ou salpingite e doença inflamatória pélvica) e/ ou masculino, mas com espermatozóides obtidos do ejaculado. Como fator masculino foi considerada a presença de contagem total de espermatozoides móveis (CTEP) menor que 10 milhões. A CTEP foi obtida pela multiplicação do volume da ejaculação em mililitros pela concentração de espermatozóides e a proporção de espermatozóides com motilidade progressiva dividida por 100% (AYALA; STEINBERGER; SMITH, 1996; HAMILTON; CISEN; BRANDES; SMEENK *et al.*, 2015).

Foram excluídas as pacientes que, após o recrutamento, foram submetidas a protocolos de estimulação ovariana distintos dos propostos para o estudo, que utilizaram a medicação incorretamente ou que tiveram o ciclo cancelado e não realizaram captação oocitária.

4.3. Protocolo de Estimulação Ovariana e Suplementação de Fase Lútea

Com o objetivo de sincronizar e programar o início do ciclo de EOC foi utilizada a programação da menstruação, que consiste em se administrar anticoncepcionais orais combinados diariamente, iniciados no período menstrual do ciclo precedente até cinco dias antes do previsto para o início da estimulação ovariana.

A estimulação ovariana controlada foi iniciada cinco dias após a interrupção dos contraceptivos orais combinados usados para a programação do ciclo. Todas as mulheres foram monitorizadas apenas por ultrassonografia transvaginal (UStv) (MARTINS; VIEIRA;

TEIXEIRA; BARBOSA *et al.*, 2014) e submetidas ao protocolo flexível com antagonista do GnRH (Cetrotid®, Merck Serono, Rio de Janeiro, Brasil ou Orgalutran®, Merck & Co, New Jersey, EUA), iniciado quando identificado um folículo com diâmetro médio ≥ 14 mm e mantido até o dia da administração da gonadotrofina coriônica humana (hCG) (Ovidrel®, Serono, Brasil).

A EOC foi realizada com menopina (Menopur®, Ferring, Aalst, Belgium, na dose de 150 a 300 UI por dia) ou alfacorifolitropina (Elonva®, Schering-Plough, Brasil; na dose de 100 mcg para pacientes com até 60kg e 150 mcg para pacientes com mais de 60kg). Seis dias após a administração de uma das gonadotrofinas, foi realizada a primeira UStv para monitorização do ciclo.

Quando pelo menos dois folículos atingiram 17 mm de diâmetro médio, foi administrado 250 μ g de hCG recombinante neste dia ou no dia seguinte. A captação dos oócitos foi realizada 34 a 36h após a administração do hCG recombinante.

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

4.4. Captação oocitária

Para a captação dos oócitos, as pacientes foram submetidas a anestesia geral venosa com propofol (Diprivan®, Zeneca-Astra, Brasil), além de fentanil (Fentanil®, Jansen-Cilag, Brasil). Os folículos ovarianos foram aspirados por via endovaginal, guiada por um transdutor de ultrassom transvaginal. Uma agulha padrão de lúmen único (Wallace, Smiths Medical, Mexico) foi usada, com pressão aspirativa artificial constante de 100mmHg obtida com uma bomba de sucção controlada eletronicamente (Craft® Bomba de sucção, Rocket Medical, Inglaterra). Os folículos de ambos os ovários foram aspirados em *pool*.

O conteúdo aspirado foi analisado em estereomicroscópio e, após a identificação, os COCs foram lavados para remoção de sangue e debris e as CCs foram parcialmente removidas mecanicamente por microdissecção com a utilização de duas agulhas de insulina, em HTF-

SSS. Os COCs foram colocados em placas de cultura HTF-HEPES suplementado com 10% de soro substituto sintético (SSS, Irvine Scientific) até o final da captação. Após, eles foram transferidos para placas de cultura de células (One well dish, Corning, EUA) contendo o meio de cultura CSCM (Continuous Single Culture Médium, Irvine Scientific) e incubados a 37°C em 5% de CO₂ e 95% de umidade durante 2 a 5 horas. Após este período, os COCs destinados à ICSI foram desnudados e os oócitos classificados em maduros [metáfase II (MII) – presença de 1 corpúsculo polar (CP) extruso] e imaturos [vesícula germinativa (VG) – ausência do CP extruso e presença de VG, e metáfase I (MI) – ausência do CP e da VG], sob visualização ao microscópio de luz.

4.5. Coleta e armazenamento das amostras

O sangue foi coletado em tubo BD Vacutainer® SST® II Advance® (com ativador de coágulo e partículas de sílica na parede), no momento da punção venosa para administração da anestesia geral e realização da captação oocitária. As amostras de sangue foram deixadas em temperatura ambiente por 30 minutos para efetuar a coagulação, e foram centrifugadas a 700 x g por 10 minutos a 4 °C para a separação do soro. Removeu-se o sobrenadante e centrifugou-se novamente, nas mesmas condições. Em seguida, o soro foi transferido para microtubos individuais de 1,5ml DNase e RNase (Axygen, Corning Inc, NY, EUA), e foi dado um jato de gás de nitrogênio encima das amostras, a fim de se retirar o oxigênio de dentro do microtubo e minimizar a oxidação das amostras. O armazenamento foi feito a -80°C para posterior extração de lipídios e análise.

O fluido folicular foi obtido após o procedimento de captação oocitária, depois de se inspecionar e retirar os oócitos do aspirado folicular. Foi centrifugado a 1000 x g por 10 minutos a 4 °C para separação da fase líquida e dos componentes celulares. Em seguida, foi transferido para microtubos individuais de 1,5ml DNase e RNase (Axygen, Corning Inc, NY, EUA), e foi dado um jato de gás de nitrogênio em cima das amostras, a fim de se retirar o oxigênio de dentro do microtubo e minimizar a oxidação das amostras. O armazenamento foi feito a -80°C para posterior extração de lipídios e análise.

4.6. ICSI e a avaliação da qualidade embrionária

Os oócitos maduros foram submetidos à ICSI 3 a 4 horas após a captação de oócitos e, depois de injetados, cultivados em gotas separadas. A fertilização foi avaliada aproximadamente 16-18 horas após a ICSI, caracterizada pela presença de dois pronúcleos e dois corpúsculos polares. A taxa de fertilização foi calculada com base no número de oócitos fertilizados divididos pelo número de oócitos injetados x 100. Cerca de 43 a 45 horas após a ICSI (segundo dia de desenvolvimento-D2), foi avaliada a taxa de clivagem (que corresponde ao número de embriões clivados divididos pelo número total de oócitos fertilizados x 100) e a qualidade embrionária, baseada no número e na simetria dos blastômeros, percentual de fragmentação e presença ou ausência de multinucleação. Foram considerados como embriões de boa qualidade em D2 os que apresentarem 4 blastômeros simétricos, sem fragmentação e sem multinucleação (ALPHA; ESHRE, 2011). Nos casos em que a transferência embrionária não foi realizada em D2, a qualidade embrionária foi novamente analisada aproximadamente 67-69 horas após a ICSI (D3). Foram considerados de boa qualidade no D3 os embriões com 8 blastômeros simétricos, sem fragmentação e sem multinucleação. A transferência embrionária foi realizada em D2 ou D3 de acordo com as considerações individualizadas para cada caso.

4.7. Demais variáveis analisadas

Quatorze dias após a transferência embrionária foi realizada 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. Foi avaliada também a taxa de implantação, caracterizada pelo número de sacos gestacionais divididos pelo número de embriões transferidos x 100 e a taxa de gravidez clínica por ciclo transferido, caracterizada pelo número de pacientes com embrião com batimento cardíaco visualizado ao USTV realizado 6 a 7 semanas após a transferência embrionária dividido pelo número de ciclos com transferência embrionária x 100. A taxa de nascidos vivos por ciclo de transferência embrionária foi definida como o número de ciclos com nascimento vivo dividido pelo número de ciclos com transferência de embrião x 100. Foram também avaliados o número total de oócitos captados, maduros, fertilizados, de embriões clivados e produzidos, e de sacos gestacionais.

4.8. Extração lipídica

A extração lipídica foi realizada após a coleta de todas as amostras biológicas, previamente à análise, respeitando um tempo de armazenamento dos extratos lipídicos de seis meses, para evitar degradação das mesmas. As amostras de soro e fluido folicular foram descongeladas à temperatura ambiente por 5 minutos.

Os eicosanoides foram extraídos das amostras de soro e fluido folicular pelo método *solid phase extraction* (SPE) (SORGI; PETI; PETTA; MEIRELLES *et al.*, 2018). Segundo o protocolo, as amostras de soro e fluido folicular, aliqüotadas em volume de 200 µL em microtubos de 1,5 mL, tiveram as proteínas desnaturadas com 800 µL de metanol (Merck, Kenilworth, NJ, EUA), seguido da adição de 10 µL de padrão interno de eicosanoides (Cayman Chemical Co, Ann Arbor, MI, EUA). As proteínas desnaturadas foram removidas por centrifugação a 12000 rpm, por 20 minutos, a 4 °C, e os sobrenadantes resultantes foram diluídos em água Milli-Q (Merck-Millipore, Kenilworth, NJ, EUA), a fim de se obter uma concentração de metanol de 10%.

A purificação das amostras foi então realizada usando colunas C18 SPE (Hypersep C18-500 mg, 3mL, Thermo Scientific-Bellefonte, PA, EUA). Foram previamente preparadas as soluções de H₂O + ácido acético (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) diluído a 0,1% (solução 1), e de MeOH + ácido acético diluído a 0,1% (solução 2). O condicionamento da coluna foi feito com 4mL de MeOH e 4 mL da solução 1. Em seguida, a coluna é carregada com o volume total da amostra diluída e lavada com 4 mL da solução 1 para remoção de impurezas hidrofílicas. Por fim, se dá a eluição da amostra com 1 mL da solução 2. Os extratos purificados foram armazenados a -80 °C para prevenir a degradação do metabólito. Antes das análises, o solvente deve ser evaporado à vácuo (Concentrator Plus, Eppendorf, Alemanha) em temperatura ambiente, e os extratos ressuspensos em solução de MeOH+ H₂O (7 : 3 ; v/v) e armazenados a -80 °C para análise LC-MS/MS.

4.9. LC-MS/MS

A análise do soro e do FF foi realizada por cromatografia líquida com espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS). Ao longo das análises, a coluna foi mantida a 25 °C e as amostras foram mantidas a 4 °C. Uma alíquota de 10 µL de cada amostra foi injetada na

coluna. O pH da fase móvel foi otimizado para alcançar a melhor sensibilidade e separação cromatográfica dos metabólitos lipídicos. As condições utilizadas para a cromatografia estão descritas no apêndice 2 (PETTA; MORAES; FACCIOLI, 2015; SORGI; PETI; PETTA; MEIRELLES *et al.*, 2018).

O sistema de cromatografia líquida de ultra alta performance (UHPLC) foi interfaceado com um Espectrômetro de Massa TripleTOF5600+ (Sciex-Foster, CA, EUA) equipado com um Turbo-V IonSpray. Uma fonte de ionização por eletrospray (ESI) no modo de íon negativo foi utilizada para varredura MRM^{HR}. A faixa de massa dos experimentos de *product ion* foi de m/z 50 a 700, o tempo de permanência foi de 10 ms e uma resolução de massa de 35.000 foi alcançada em m/z 400. As aquisições de dados foram realizadas usando o Analyst Software (Sciex-Foster, CA, EUA).

Os eicosanoides analisados foram: LTB4, 6-trans-LTB4, 20-OH-LTB4, LTC4, LTD4, 11-trans-LTD4, LTE4, LXA4, RvD1, RvD2, TXB2, PGB2, PGE2, PGD2, 15-keto-PGE2, 20-OH-PGE2, PGD2, PGJ2, 15-deoxi-PGJ2, 6-keto-PGF1 α , PGF2 α , 19-OH-PGB2, PGG2, maresina, 5-HETE, AA, 5-oxo-EETE, 20-HETE, 5,6-DIHETE, 12-HETE, 8-HETE, 11-HETE, 12-oxo-EETE, 12-oxo-LTB4, 15-oxo-EETE, 11,12-DIHETRE, 14,15-DIHETRE, EPA, DHA, 15-HETE, 5,6-DIHETRE.

A identificação das espécies lipídicas obtidas na análise de LC-MS foi realizada usando o PeakView 2.1 (Sciex-Foster, CA, EUA). Resumidamente, este software combina informações em três dimensões para fornecer uma representação do tempo de retenção, intensidade do sinal e valor m/z para cada analito. O processamento de dados passou por várias etapas, incluindo filtragem, detecção de recursos, alinhamento e normalização.

Para análise quantitativa, usamos o MultiQuant. Este software usa algoritmos de integração robustos, como MQ4 e SignalFinder avançado, e é capaz de gerar resultados de integração confiáveis mais rapidamente com menos intervenção do usuário para maximizar a produtividade. O uso de padrões de referência para cada uma das espécies ou classes lipídicas alvo foi importante na quantificação dos lipídios sob investigação. Nesse campo, é prática comum normalizar as intensidades de pico de íons moleculares individuais usando um padrão interno para cada classe de lipídios. A proporção calculada de analito para padrão interno é então multiplicada pela concentração do referido padrão interno de modo a obter a concentração de um determinado analito presente na amostra. Para quantificar os mediadores

lipídicos em nosso trabalho, canais MRM^{HR} foram criados durante o processamento de dados computacionais. Estes foram instruídos a selecionar íons de produto de maior intensidade e seletividade, a fim de obter maior sensibilidade analítica e evitar identificação cruzada. A concentração final de eicosanoides em amostras biológicas foi normalizada pelo volume, peso do fluido ou concentração de proteína/DNA.

4.10. Tamanho do estudo

Considerando os restritivos critérios de elegibilidade e as dificuldades impostas pela pandemia pela Covid-19, foram incluídas todas as mulheres elegíveis que aceitaram participar do estudo no período de coleta de 25 meses.

4.11. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa SAS® 9.3.

Foi realizada uma análise exploratória de dados através de medidas de posição central e de dispersão e gráficos de *box-plot*.

Para a comparação da concentração de eicosanoides entre os grupos endometriose e controle foi utilizado o teste t de student, e quando se realizou a comparação entre os grupos endometriose sem endometrioma, endometriose com endometrioma e grupo controle, usou-se o Teste variância ANOVA e pós-teste de Tukey.

Para a comparação das características clínicas e resultados de TRA entre os grupos endometriose e controle, as variáveis com distribuição normal (idade, FSH basal, IMC, tempo de infertilidade) foram analisadas usando o teste t de student. Já as variáveis que não apresentaram distribuição normal (número de oócitos captados, número de oócitos maduros, número de embriões clivados, número de embriões formados em D2, número de embriões de boa qualidade em D2, número de embriões formados em D3, número de embriões de boa qualidade em D3) foram analisadas com o teste de teste de Mann-Whitney. Para a comparação das características clínicas e resultados de TRA entre os grupos endometriose com endometrioma, endometriose sem endometrioma e controle, as variáveis com distribuição

normal (idade, FSH basal, IMC, tempo de infertilidade) foram analisadas usando o teste de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Turkey. Já as variáveis que não apresentaram distribuição normal (número de oócitos captados, número de oócitos maduros, número de embriões clivados, número de embriões formados em D2, número de embriões de boa qualidade em D2, número de embriões formados em D3, número de embriões de boa qualidade em D3) foram analisadas com o teste de teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Turkey. As variáveis: taxa de fertilização, taxa de clivagem, taxa de implantação, taxa de gestação química, taxa de gestação clínica e taxa de nascidos vivos foram comparadas entre os mesmos grupos com o teste do Qui-quadrado.

O perfil lipídico e os resultados de TRA foram correlacionados utilizando-se a correlação de Spearmann, assim como os níveis de eicosanoides no soro e no FF.

O nível de significância adotado foi de 5%.

RESULTADOS

5.1. Fluxograma

No período de setembro de 2019 a outubro de 2021 foram analisados 999 prontuários de mulheres admitidas por infertilidade conjugal no Serviço de Reprodução Assistida do Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Desses, 145 pertenciam a pacientes que preenchiam os critérios de elegibilidade. Das 145 mulheres elegíveis, 40 tiveram alta do serviço e 109 iniciaram o ciclo de estimulação ovariana e foram convidadas a participar da pesquisa, sendo que 11 mulheres não aceitaram participar do estudo e 94 assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Destas, 50 foram excluídas porque tiveram o ciclo cancelado por apresentarem má resposta ovariana ou outros fatores, como suspensão do tratamento devido à pandemia de COVID-19. Assim, foram coletadas amostras de 44 pacientes. Destas, 21 foram destinadas ao grupo endometriose e 23 ao grupo controle. Após a coleta, 6 foram excluídas por diversos motivos (não tiveram folículo puncionado, amostra insuficiente de FF, dificuldade na coleta do sangue periférico, sangue hemolisado, entre outros), sendo três do grupo endometriose e três do grupo controle. Assim, o número amostral foi de 20 pacientes para o grupo controle e 18 para o grupo endometriose. As pacientes do grupo endometriose foram subdivididas no grupo endometriose sem endometrioma e endometriose com endometrioma, sendo constituídos por 10 e 8 pacientes, respectivamente. O fluxograma do estudo está representado na figura 3.

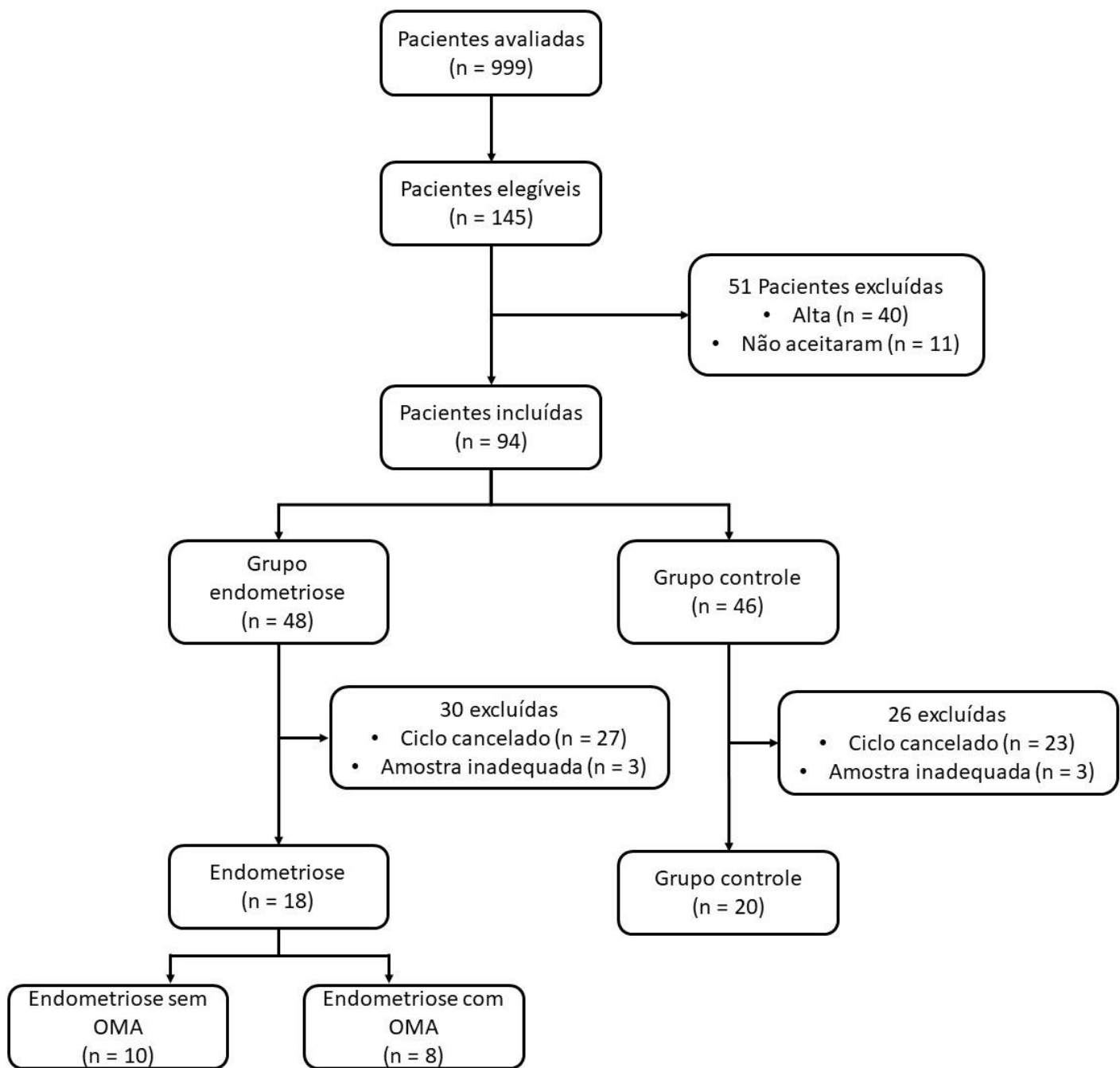


Figura 3: fluxograma do estudo com o número de pacientes elegíveis, incluídas, excluídas e amostras coletadas e analisadas divididas em controle e endometriose.

5.2. Caracterização dos grupos

A comparação das variáveis clínicas: idade, IMC, FSH basal e tempo de infertilidade entre o grupo endometriose e grupo controle não demonstraram diferença estatística significativa, evidenciando a homogeneidade entre os grupos. Os resultados estão expressos na tabela 1.

Tabela 1 – Características clínicas: idade, IMC, tempo de infertilidade e FSH basal em pacientes controle e com endometriose.

Variável	Controle	Endometriose	Valor de p
Idade (anos)	35,6 (\pm 4,02)	36 (\pm 3,51)	0,71
IMC (kg/m ²)	24,4 (\pm 3,26)	23,4 (\pm 2,71)	0,32
FSH basal (mUI/mL)	5,2 (\pm 1,48)	6,5 (\pm 2,21)	0,06
Tempo de infertilidade (meses)	75,6 (\pm 50,37)	77,7 (\pm 47,08)	0,89

Nota: Dados expressos em média e desvio-padrão. Teste t de student. Nível de significância de 5%

Dentre as pacientes do grupo controle, apenas três apresentavam exclusivamente fator tubário de infertilidade, enquanto as demais 17 pacientes foram diagnosticadas com fator masculino de infertilidade. Dentre as pacientes com endometriose, duas apresentaram fator masculino associado a endometriose.

A respeito da gonadotrofina utilizada na EOC de cada grupo, no grupo controle tivemos 15 pacientes utilizando Menopur®, e 5 utilizando alfacorifolitropina. No grupo endometriose, as 18 paciente fizeram a EOC utilizando Menopur®.

Em relação aos resultados de TRA, para os grupos controle e endometriose, observou-se maior número de oócitos maduros, oócitos fertilizados, número de embriões clivados, e número de embriões formados em D2 no grupo controle comparado ao endometriose. As demais variáveis, incluindo as taxas de fertilização, clivagem, implantação, gestação química, gestação clínica e nascidos vivos, não apresentaram diferença estatística significativa (tabelas 2 e 3).

Tabela 2 – Resultados de TRA no grupo controle e endometriose: número de oócitos captados, número de oócitos maduros, número de embriões clivados, número de embriões formados em D2, número de embriões de boa qualidade em D2, número de embriões formados em D3, número de embriões de boa qualidade em D3.

Variável	Controle	Endometriose	Valor de p
Nº de oócitos captados	9,7 (6; 13)	6,2 (3; 8,5)	0,06
Nº de oócitos maduros	8 (5; 11)	4,6 (2,5; 6,5)	0,02*
Nº de oócitos fertilizados	5,8 (3; 7,5)	3,3 (1,5; 5,5)	0,04*
Nº de embriões clivados	5,7 (3; 7)	3,2 (1,5; 5)	0,02*
Nº de embriões formados em D2	5,7 (3; 7)	3,2 (1,5; 5)	0,02*
Nº de embriões de boa qualidade em D2	2,9 (0,5; 4)	1,3 (0; 3)	0,07
Nº de embriões formados em D3	5,4 (3; 6,5)	3 (1,5; 4,5)	0,14
Nº de embriões de boa qualidade em D3	2,6 (1; 3)	1,4 (0,5; 3)	0,15
Nº de embriões transferidos a fresco	2 (2; 2)	1,5 (1; 2)	0,18
Nº de sacos gestacionais	0,7 (0; 1)	0,2 (0; 0,5)	0,15
Nº de embriões com batimento cardíaco	0,5 (0; 1)	0,25 (0; 0,5)	0,68
Nº de nascidos vivos	0,5 (0; 1)	0,25 (0; 0,5)	0,68

Nota: Dados expressos como mediana (intervalo interquartil). Teste de Mann Whitney. Nível de significância: 5%

Tabela 3 – Resultados de TRA no grupo controle e endometriose: taxa de fertilização, taxa de clivagem, taxa de implantação, taxa de gestação química, taxa de gestação clínica e taxa de nascidos vivos.

Variável	Controle	Endometriose	Valor de p
Taxa de fertilização	66,7%	70,5%	0.56
Taxa de clivagem	92,9%	96,6%	0.97
Taxa de implantação	41,7%	22,9%	0.51
Taxa de gestação química	50,0%	37,5%	0.70
Taxa de gestação clínica	50,0%	25,0%	0.68
Taxa de nascidos vivos	50,0%	25,0%	0.68

Nota: Dados expressos em porcentagem. Teste do qui-quadrado. Nível de significância: 5%

Ao separarmos o grupo endometriose nos subgrupos com endometrioma, e sem endometrioma, o resultado permaneceu o mesmo, não havendo diferença estatística para todas as variáveis analisadas (tabela 4).

Tabela 4 – Características clínicas: idade, IMC, tempo de infertilidade e FSH basal em pacientes controle, com endometriose sem endometrioma, e com endometriose com endometrioma.

Variável	Controle	Endometriose sem OMA	Endometriose com OMA	Valor de p
Idade (anos)	35,6 (\pm 4,02)	36,1 (\pm 3,38)	36,7 (\pm 3,73)	0,76
IMC (kg/m ²)	24,4 (\pm 3,26)	23,6 (\pm 3,42)	23,6 (\pm 3,42)	0,79
FSH basal (mUI/mL)	5,2 (\pm 1,48)	6,9 (\pm 2,23)	6,0 (\pm 1,87)	0,06
Tempo de infertilidade (meses)	75,6 (\pm 50,37)	88,5 (\pm 46,12)	47,88 (\pm 45,23)	0,89

Nota: Dados expressos em média (desvio-padrão). Teste de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. Nível de significância de 5%. Valores do pós teste de Tukey para a variável CTEP: controle

x endometriose sem endometrioma (p = 0,008); controle x endometriose com endometrioma (p = 0,002); endometriose sem endometrioma x endometriose com endometrioma (p = 0,36).

Em relação aos resultados de TRA, a análise com a subdivisão do grupo endometriose em endometriose com OMA e endometriose sem OMA, e grupo controle, não evidenciou diferença estatística entre as variáveis analisadas (tabelas 5 e 6).

Tabela 5 – Resultados de TRA nos grupos controle, endometriose sem endometrioma e endometriose com endometrioma: número de oócitos captados, número de oócitos maduros, número de embriões clivados, número de embriões formados em D2, número de embriões de boa qualidade em D2, número de embriões formados em D3, número de embriões de boa qualidade em D3, número de embriões transferidos a fresco, número de sacos gestacionais, número de embriões com batimento cardíaco e número de nascidos vivos.

Variável	Controle	Endometriose sem OMA	Endometriose com OMA	Valor de p
Nº de oócitos captados	9,7 (6; 13)	5,7 (3; 8)	5,4 (1,5; 7,5)	0,06
Nº de oócitos maduros	8 (5; 11)	4,8 (3; 6)	4,3 (2; 7)	0,06
Nº de oócitos fertilizados	5,8 (3; 7,5)	3,1 (2; 5)	3,5 (1; 6)	0,13
Nº de embriões clivados	5,7 (3; 7)	2,9 (2; 4)	4 (2; 6)	0,14
Nº de embriões formados em D2	5,7 (3; 7)	2,9 (2; 4)	4 (2; 6)	0,09
Nº de embriões de boa qualidade em D2	2,9 (0,5; 4)	1,1 (0; 2)	1,6 (0; 3)	0,11
Nº de embriões formados em D3	5,4 (3; 6,5)	3,3 (2; 4,5)	4 (2; 6)	0,21
Nº de embriões de boa qualidade em D3	2,6 (1; 3)	1,5 (0,5; 3)	1,3 (0,5; 2)	0,19
Nº de embriões transferidos a fresco	2 (2; 2)	1,4 (1; 2)	1,67 (1; 2)	0,42
Nº de sacos gestacionais	0,7 (0; 1)	0,4 (0; 1)	0,3 (0; 1)	0,73
Nº de embriões com batimento cardíaco	0,5 (0; 1)	0,4 (0; 1)	0	0,56

Nº de nascidos vivos	0,5 (0; 1)	0,4 (0; 1)	0	0,56
----------------------	------------	------------	---	------

Nota: Dados expressos como mediana e intervalo interquartil. Teste de Kruskal-Wallis. Nível de significância: 5%

Tabela 6 – Resultados de TRA nos grupos controle, endometriose sem endometrioma e endometriose com endometrioma: taxa de fertilização, taxa de clivagem, taxa de implantação, taxa de gestação química, taxa de gestação clínica e taxa de nascidos vivos.

Variável	Controle	Endometriose sem OMA	Endometriose com OMA	Valor de p
Taxa de fertilização	67%	74%	64%	0,68
Taxa de clivagem	93%	96%	98%	0,85
Taxa de implantação	42%	27%	17%	0,70
Taxa de gestação química	50%	40%	33%	0,90
Taxa de gestação clínica	50%	40%	0%	0,56
Taxa de nascidos vivos	50%	40%	0%	0,56

Nota: Dados expressos em porcentagem. Teste do qui-quadrado. Nível de significância: 5%

5.3. Concentração de eicosanoides

Na análise do perfil dos eicosanoides, foram avaliados um total de 41 analitos tanto no soro quanto no fluido folicular, conforme previsto a metodologia utilizada no estudo. Dos 41 eicosanoides analisados, cinco foram detectados nas amostras de soro, incluindo o ácido 5-hidroxi-eicosatetraenóico (5-HETE), o ácido 11-hidroxi-eicosatetraenóico (11-HETE), o ácido 15-oxo-eicosatetraenóico (15-oxo-EETE), o ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido 15-hidroxi-eicosatetraenóico (15-HETE). Os mesmos cinco estavam presentes nas amostras de fluido folicular, com a adição da prostaglandina E2 (PGE-2).

Ao comparar os grupos de mulheres com endometriose e o grupo controle, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na concentração de cada eicosanoide no soro. A tabela 7 descreve a concentração em picograma por mililitro dos cinco eicosanoides presentes no soro nos grupos controle e endometriose.

Tabela 7: Concentração de eicosanoides no soro. Concentração em picograma por mililitro (pg/mL) dos eicosanoides 5-HETE, 11-HETE, 15-oxo-ETE, EPA e 15-HETE no soro de mulheres inférteis com endometriose e controles inférteis.

Eicosanoide	Controle	Endometriose	Valor de p
5-HETE	82,11 (\pm 61,75)	87,67 (\pm 83,04)	0,81
11-HETE	101,74 (\pm 74,33)	88,76 (\pm 74,94)	0,6
15-oxo-ETE	68,67 (\pm 67,46)	34,27 (\pm 60,29)	0,12
EPA	8197,14 (\pm 7959,79)	8629,82 (\pm 5555,29)	0,85
15-HETE	82,71 (\pm 76,00)	112,47 (\pm 112,91)	0,35

Nota: Dados expressos em média (desvio-padrão). Teste t de student. Nível de significância de 5%

A fim de se entender se a presença de endometrioma estaria relacionada a alguma potencial mudança nos níveis de eicosanoides séricos, o grupo endometriose foi classificado nos subgrupos com endometrioma e sem endometrioma. Tal subdivisão evidenciou uma diferença estatisticamente significante nas concentrações de 5-HETE, sendo maior no grupo endometriose sem OMA (120,45 pg/mL) comparado ao grupo endometriose com OMA (38,47 pg/mL; $p = 0,01$). Os demais eicosanoides não apresentaram diferenças de concentração entre os grupos. A Tabela 8 demonstra a média de concentração de cada eicosanoide nos grupos de estudo. As diferenças de concentração de 5-HETE nas amostras de soro também podem ser observadas no gráfico apresentado na figura 4.

Tabela 8: Concentração de eicosanoides no soro de mulheres inférteis com endometriose sem endometrioma, com endometriose com endometrioma, e controles inférteis.

Eicosanoide	Controle	Endometriose sem OMA	Endometriose com OMA	Valor de p
5-HETE	82,11 (\pm 61,75)	120,45 (\pm 88,20)	38,47 (\pm 30,56)	0,04*
11-HETE	101,74 (\pm 73,33)	89,85 (\pm 47,47)	93,91 (\pm 97,90)	0,91
15-oxo-EETE	68,67 (\pm 67,46)	45,33 (\pm 73,93)	44,01 (\pm 67,47)	0,57
EPA	8197,14 (\pm 7959,79)	8149,58 (\pm 3948,42)	10294,82 (\pm 7798,17)	0,75
15-HETE	82,71 (\pm 76,00)	124,54 (\pm 102,57)	102,10 (\pm 123,27)	0,51

Nota: Dados expressos em média (desvio-padrão), concentração em picograma por mililitro (pg/mL). Teste variância ANOVA e pós-teste de Tukey. Nível de significância de 5%. Valores do pós-teste de Tukey para a variável concentração de 5-HETE: controle x endometriose sem endometrioma (p = 0,13); controle x endometriose com endometrioma (p = 0,11); endometriose sem endometrioma x endometriose com endometrioma (p = 0,01)

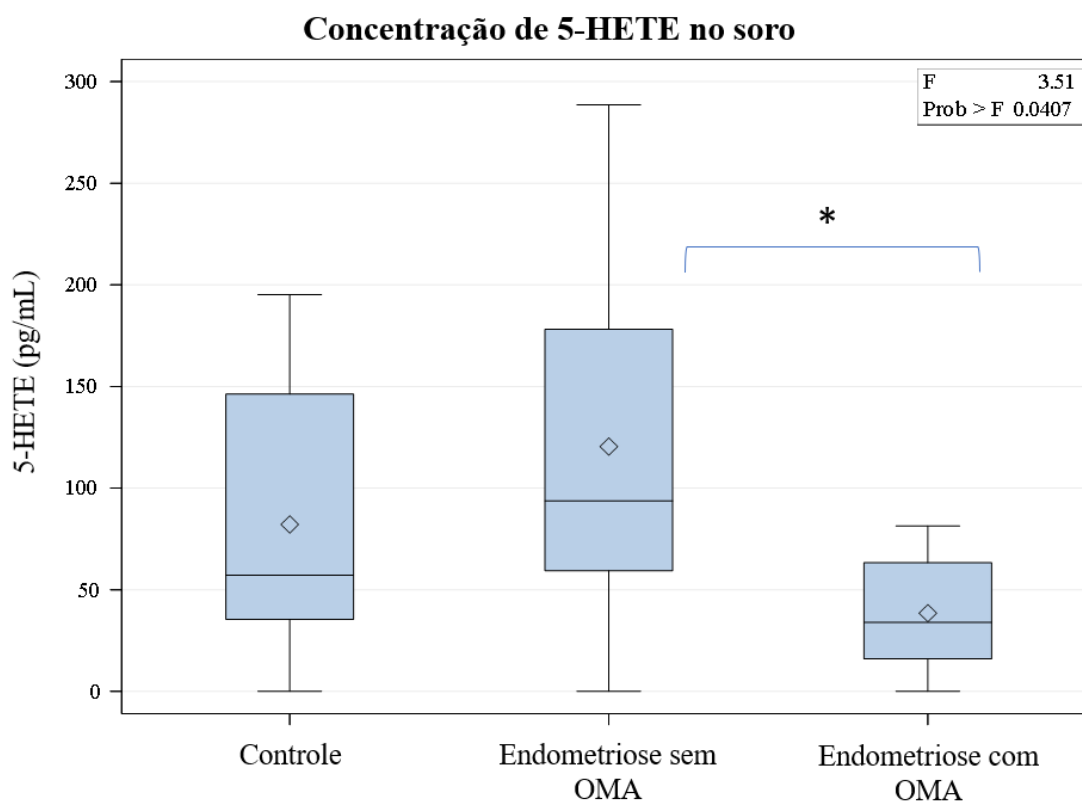


Figura 4: gráfico da concentração do eicosanoide 5-HETE nas amostras de soro dos grupos controle, endometriose sem OMA e endometriose com OMA. * concentração superior no grupo endometriose sem OMA comparado ao grupo com OMA.

Agora, em relação à concentração de cada eicosanoide no fluido folicular, houve diferença estatisticamente relevante nas concentrações de EPA, sendo maior no grupo endometriose (4038,52 pg/mL), comparado ao grupo controle (1159,83 pg/mL, p=0,03). Os demais eicosanoides não apresentaram diferenças relevantes de concentração entre os dois grupos. A Tabela 9 demonstra a média de concentração de cada eicosanoide para os grupos controle e endometriose.

Tabela 9: Concentração de eicosanoides no fluido folicular de mulheres inférteis com endometriose e controles inférteis.

Eicosanoides	Controle	Endometriose	Valor de p
5-HETE	60,61 (\pm 65,10)	91,60 (\pm 236,86)	0,57
11-HETE	114,59 (\pm 80,38)	136,99 (\pm 111,2)	0,33
15-oxo-ETE	23,34 (\pm 33,66)	11,16 (\pm 18,66)	0,2
EPA	1159,83 (\pm 1432,62)	4038,52 (\pm 45637,61)	0,03*
15-HETE	97,43 (\pm 105,95)	150,83 (\pm 200,82)	0,19
PGE-2	18,19 (\pm 64,42)	2,91 (\pm 1,31)	0,31

Nota: Dados expressos em média (desvio-padrão); concentração em picograma por mililitro (pg/mL). Teste t de student. Nível de significância de 5%.

Ao se realizar a divisão do grupo endometriose nos subgrupos endometriose com endometrioma e endometriose sem endometrioma, pode-se observar uma diferença estatisticamente significativa para o mesmo eicosanoide EPA, sendo maior no FF do grupo endometriose com OMA (5811,50 pg/mL), comparado ao grupo controle (1159,83 pg/mL, p = 0,005). Os demais eicosanoides não apresentaram diferenças relevantes de concentração entre os grupos. A Tabela 10 demonstra a média de concentração de cada eicosanoide no grupo controle e subgrupos endometriose. As diferenças de concentração de EPA nas amostras de FF também podem ser observadas no gráfico apresentado na figura 5.

Tabela 10: Concentração de eicosanoides no fluido folicular de mulheres inférteis com endometriose sem endometrioma, endometriose com endometrioma e controles inférteis.

Eicosanoides	Controle	Endometriose sem OMA	Endometriose com OMA	Valor de p
5-HETE	60,61 (\pm 65,10)	45,19 (\pm 90,84)	134,05 (\pm 325,10)	0,46
11-HETE	114,59 (\pm 80,38)	156,10 (\pm 133,43)	92,36 (\pm 53,69)	0,33
15-oxo-EETE	23,34 (\pm 33,66)	7,6 (\pm 12,09)	21,81 (\pm 30,69)	0,36
EPA	1159,83 (\pm 1432,62)	2618,23 (\pm 4802,12)	5811,50 (\pm 5908,08)	0,01*
15-HETE	97,43 (\pm 105,95)	91,84 (\pm 77,70)	205,88 (\pm 270,60)	0,19
PGE-2	18,19 (\pm 64,42)	75,59 (\pm 127,29)	0,0 (\pm 0,0)	0,10

Nota: Dados expressos em média (desvio-padrão). Teste de variância ANOVA e pós-teste de Tukey. Nível de significância de 5%. Valores do pós-teste de Tukey para a variável concentração de EPA: controle x endometriose sem endometrioma ($p = 0,32$); controle x endometriose com endometrioma ($p = 0,005$); endometriose sem endometrioma x endometriose com endometrioma ($p = 0,08$).

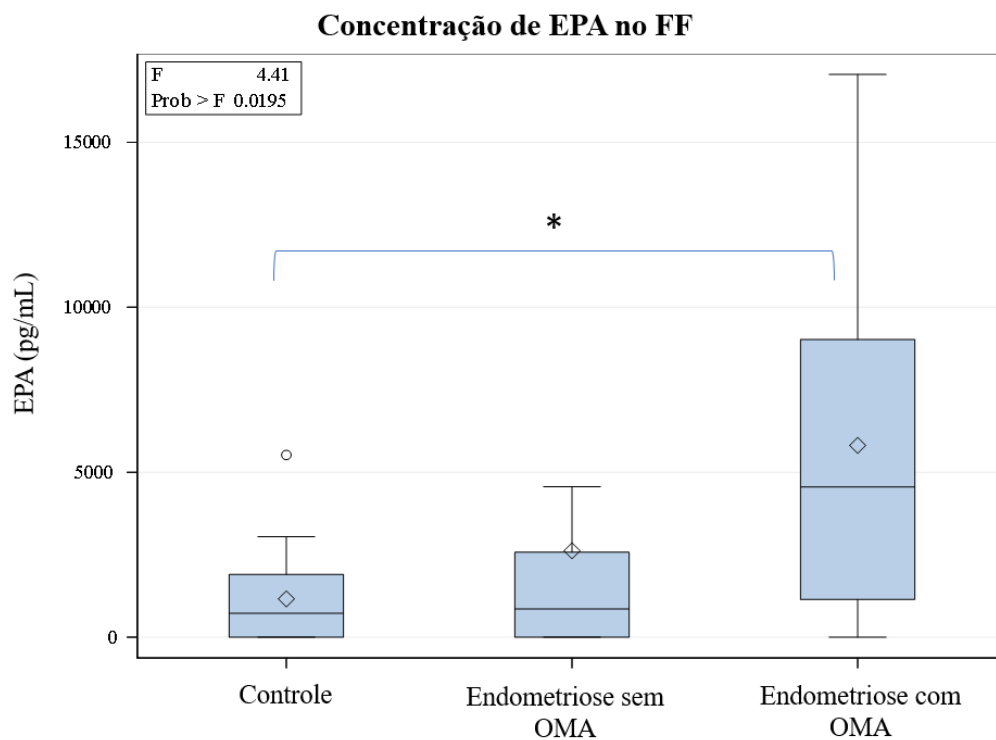


Figura 5: gráfico da concentração do eicosanoide EPA nas amostras de FF dos grupos controle, endometriose sem OMA e endometriose com OMA. * concentração superior no grupo endometriose com OMA comparado ao controle.

5.4. Correlação entre eicosanoides no soro e no FF

As correlações entre a concentração dos eicosanoides do soro com os eicosanoides do fluido folicular demonstraram que existe uma correlação moderada positiva entre o 5-HETE no soro com o 5-HETE no fluido folicular de pacientes controle, e que existe uma correlação fraca positiva entre 11-HETE e 15-oxo-HETE do soro com 5-HETE do fluido folicular em pacientes do grupo controle. Observou-se também que, nas pacientes com endometriose, há correlação fraca positiva entre o 11-HETE e 15-HETE do soro com o 15-oxo-ETE do fluido folicular. Os valores do coeficiente de correlação estão na tabela 11.

Tabela 11: Valores do coeficiente de correlação de Spearman entre as concentrações dos eicosanoides 5-HETE, 11-HETE, 15-oxo-ETE, EPA e 15-HETE no soro com as concentrações de 5-HETE, 11-HETE, 15-oxo-ETE, EPA e 15-HETE no fluido folicular de mulheres inférteis com endometriose e controles inférteis.

	Grupo	5-HETE soro	11-HETE soro	15-oxo-ETE soro	EPA soro	15-HETE soro
5-HETE FF	Controle	0,630* (p = 0,002)	0,481* (p = 0,03)	0,482* (p = 0,03)	0,182	0,109
	Endometriose	0,078	0,031	-0,107	-0,005	0,009
11-HETE FF	Controle	0,392	0,351	0,233	0,246	0,413
	Endometriose	0,100	0,001	-0,285	0,269	-0,188
15-oxo-ETE FF	Controle	-0,006	0,127	-0,001	-0,041	0,353
	Endometriose	-0,023	0,547* (p = 0,01)	0,160	0,151	0,496* (p = 0,03)
EPA FF	Controle	0,107	0,185	0,109	-0,008	-0,188
	Endometriose	0,208	-0,077	-0,332	0,364	-0,088
15-HETE FF	Controle	0,001	-0,278	0,039	-0,286	0,324
	Endometriose	0,036	0,048	-0,193	0,452	-0,121
PGE-2 FF	Controle	0,298	-0,048	0,235	0,263	-0,026
	Endometriose	0,316	0,058	-0,142	0,004	0,019

5.5. Correlação entre eicosanoides no soro e resultados de reprodução assistida

Todas as correlações encontradas entre os eicosanoides do soro e os resultados de RA foram fracas. No grupo controle, foi evidenciada uma correlação negativa entre os níveis de 11-HETE e a taxa de clivagem. No grupo endometriose, encontrou-se uma correlação positiva entre 15-oxo-ETE e a taxa de fertilização, correlações negativas entre 15-HETE e o número de embriões clivados, o número de embriões em D2 e o número de embriões em D3, assim como uma correlação negativa entre o 11-HETE e o número de embriões em D3.

Tabela 12: Valores do coeficiente de correlação de Spearman entre as concentrações dos eicosanoides 5-HETE, 11-HETE, 15-oxo-ETE, EPA e 15-HETE no soro de mulheres inférteis com endometriose e controles inférteis.

	Grupo	5-HETE	11-HETE	15-oxo-ETE	EPA	15-HETE
Nº de oócitos captados	Controle	0,353	0,322	0,038	0,329	0,403
	Endometriose	-0,134	-0,313	-0,582* (p = 0,01)	-0,317	-0,151
Nº de oócitos maduros	Controle	0,237	0,237	-0,131	0,275	0,250
	Endometriose	-0,137	-0,349	-0,374	-0,017	-0,211
Nº de oócitos fertilizados	Controle	0,345	0,249	-0,099	0,314	0,443
	Endometriose	-0,331	-0,352	-0,130	-0,058	-0,319
Taxa de fertilização	Controle	0,166	-0,075	0,224	0,061	0,372
	Endometriose	-0,260	-0,022	0,558* (p = 0,02)	-0,043	-0,066
Nº de embriões clivados	Controle	0,325	0,209	-0,080	0,285	0,462
	Endometriose	-0,348	-0,461	-0,231	-0,078	-0,583* (p = 0,02)
Taxa de clivagem	Controle	-0,061	-0,516* (p = 0,03)	-0,065	0,065	0,214
	Endometriose	-0,018	0,175	0,070	0,338	0,012
Nº de embriões em D2	Controle	0,299	0,363	-0,004	0,213	0,469
	Endometriose	-0,348	-0,461	-0,231	-0,078	-0,583* (p = 0,02)
Nº de embriões de boa qualidade em D2	Controle	-0,060	-0,111	-0,425	0,397	-0,166
	Endometriose	-0,255	-0,121	-0,181	0,082	-0,472
Nº de embriões de D3	Controle	0,177	0,347	0,044	0,157	0,469
	Endometriose	-0,351	-0,608* (p = 0,03)	-0,280	-0,060	-0,584* (p = 0,04)

Nº de embriões de boa qualidade em D3	Controle	-0,339	-0,146	-0,486	0,400	-0,067
	Endometriose	0,007	-0,119	-0,424	0,446	-0,465
Taxa de implantação	Controle	0,339	-0,308	0,370	0,246	-0,277
	Endometriose	-0,139	0,000	-0,562	-0,109	-0,163
Taxa de gestação química	Controle	0,097	-0,487	0,292	0,097	-0,292
	Endometriose	-0,288	-0,056	-0,580	-0,169	-0,281
Taxa de gestação clínica	Controle	0,540	-0,101	0,371	0,371	-0,338
	Endometriose	0,000	0,377	-0,433	0,125	0,125
Taxa de nascidos vivos	Controle	0,540	-0,101	0,371	0,371	-0,338
	Endometriose	0,000	0,377	-0,433	0,125	0,125

5.6. Correlação entre eicosanoides no FF e resultados de reprodução assistida

Assim como no soro, no FF todas as correlações encontradas entre os eicosanoides e os resultados de RA foram fracas. No grupo controle, foi evidenciada uma correlação positiva entre os níveis de PGE-2 e o número de oócitos captados, o número de oócitos fertilizados, o número de embriões clivados e o número de embriões em D2. Também se evidenciou uma correlação positiva entre a concentração de 15-oxo-ETE e o número de oócitos maduros, e uma correlação negativa entre os níveis de EPA e a taxa de fertilização. No grupo endometriose, encontrou-se correlação negativa entre 15-oxo-ETE e o número de embriões clivados e o número de embriões de boa qualidade em D2.

Tabela 13: Valores do coeficiente de correlação de Spearman entre as concentrações dos eicosanoides 5-HETE, 11-HETE, 15-oxo-ETE, EPA, 15-HETE e PGE-2 no FF de mulheres inférteis com endometriose e controles inférteis.

	Grupo	5-HETE	11-HETE	15-oxo-ETE	EPA	15-HETE	PGE-2
Nº de oócitos captados	Controle	-0,003	0,245	0,323	-0,158	0,244	0,558 * (p = 0,01)
	Endometriose	-0,086	-0,123	-0,287	-0,308	-0,171	0,142
Nº de oócitos maduros	Controle	-0,044	0,023	0,547 * (p = 0,01)	0,057	0,217	0,432
	Endometriose	0,091	-0,334	-0,181	-0,276	-0,165	0,246

Nº de oócitos fertilizados	Controle	0,000	0,136	0,313	-0,139	0,101	0,530 * (p = 0,02)
	Endometriose	0,100	-0,224	-0,361	-0,409	-0,248	0,131
Taxa de fertilização	Controle	-0,071	0,195	-0,200	-0,488 * (p = 0,04)	-0,080	0,451
	Endometriose	0,000	-0,089	-0,260	-0,394	-0,377	-0,084
Nº de embriões clivados	Controle	-0,019	0,138	0,324	-0,152	0,115	0,532 * (p = 0,02)
	Endometriose	-0,013	-0,107	-0,572 * (p = 0,02)	-0,359	-0,071	-0,001
Taxa de clivagem	Controle	-0,179	0,179	-0,008	-0,426	0,140	0,199
	Endometriose	0,003	0,410	-0,101	0,196	0,371	-0,392
Nº de embriões em D2	Controle	-0,022	0,110	0,425	0,014	0,173	0,531 * (p = 0,03)
	Endometriose	-0,013	-0,107	-0,572* (p = 0,02)	-0,359	-0,071	-0,001
Nº de embriões de boa qualidade em D2	Controle	-0,349	-0,102	-0,009	0,213	0,083	0,434
	Endometriose	-0,057	-0,024	-0,567 * (p = 0,02)	-0,348	-0,215	-0,066
Nº de embriões de D3	Controle	-0,137	0,044	0,450	-0,039	0,133	0,507
	Endometriose	0,055	-0,263	-0,547	-0,197	-0,149	-0,200
Nº de embriões de boa qualidade em D3	Controle	-0,495	0,047	0,073	0,011	-0,005	0,217
	Endometriose	0,137	0,141	-0,436	0,103	0,042	-0,097
Taxa de implantação	Controle	-0,092	-0,185	0,032	-0,018	-0,339	0,237
	Endometriose	0,062	-0,163	-0,093	0,027	-0,681	0,000
Taxa de gestação química	Controle	-0,292	-0,292	-0,103	-0,115	-0,097	0,115
	Endometriose	0,064	-0,056	-0,193	-0,057	-0,619	0,000
Taxa de gestação clínica	Controle	0,338	0,033	0,071	0,020	-0,676	0,220
	Endometriose	-0,433	0,377	0,000	-0,258	-0,251	0,000
Taxa de nascidos vivos	Controle	0,338	0,033	0,071	0,020	-0,676	0,220
	Endometriose	-0,433	0,377	0,000	-0,258	-0,251	0,000

DISCUSSÃO

A endometriose é uma doença com alta prevalência em mulheres em idade fértil e é frequentemente associada à infertilidade (BURNEY; GIUDICE, 2012). Apesar disso, ainda não se sabe completamente quais mecanismos estão envolvidos na etiopatogênese da infertilidade relacionada à endometriose. Suspeita-se que a piora da qualidade dos oócitos seja um fator chave na redução da fertilidade natural nessas pacientes (SANCHEZ; VANNI; BARTIROMO; PAPALETTO *et al.*, 2017), sendo a inflamação e o estresse oxidativo possíveis mediadores desse dano oocitário (BARCELOS; VIEIRA; FERREIRA; MARTINS *et al.*, 2009; DA BROI; NAVARRO, 2016; FERREIRA; GIORGI; RODRIGUES; DE ANDRADE *et al.*, 2019; GIORGI; DA BROI; PAZ; FERRIANI *et al.*, 2016; MALVEZZI; DA BROI; J; ROSA-E-SILVA *et al.*, 2018). Hipotetizamos que o processo inflamatório e o estresse oxidativo relacionados à endometriose podem afetar a produção sistêmica e folicular de eicosanoides, moléculas bioativas de origem lipídica que regulam diversos processos fisiopatológicos, inclusive a foliculogênese, maturação oocitária e ovulação (LEROY; VANHOLDER; MATEUSEN; CHRISTOPHE *et al.*, 2005).

Não se observou diferença significativa na concentração sérica de eicosanoides entre os grupos controle e endometriose. Entretanto, quando se subdividiu o grupo endometriose, observou-se que o 5-HETE apresentou aumento significativo no grupo endometriose sem OMA em relação ao grupo endometriose com OMA. Considerando que a endometriose peritoneal é caracterizada pela presença de lesões espalhadas pela cavidade abdominal (AGARWAL; SUBRAMANIAN, 2010), enquanto o endometrioma é uma lesão localizada, restrita aos ovários e encapsulada (HUGHESDON, 1957; PAFFONI; BOLIS; FERRARI; BENAGLIA *et al.*, 2019); esse achado sugere que existe uma repercussão inflamatória sistêmica mais evidente nos casos de endometriose peritoneal e/ou pélvica. As lesões da endometriose peritoneal podem levar à liberação de células e moléculas inflamatórias na corrente sanguínea, resultando em uma resposta inflamatória sistêmica. Acredita-se que essa inflamação crônica induzida pela endometriose, possa estar envolvida na patogênese de vários distúrbios sistêmicos (AHN; MONSANTO; MILLER; SINGH *et al.*, 2015). Portanto, parece importante considerar a natureza e extensão das lesões de endometriose ao se avaliar seu impacto no sistema reprodutivo e na saúde geral da paciente.

A literatura médica destaca que a produção excessiva de 5-HETE está associada a uma série de condições patológicas, incluindo inflamação crônica, dor e doenças cardiovasculares

(KIKUT; KOMORNIK; ZIĘTEK; PALMA *et al.*, 2020; LEUTI; FAZIO; FAVA; PICCOLI *et al.*, 2020). Visto isso, é possível elaborar algumas hipóteses sobre como o aumento do 5-HETE pode estar envolvido na infertilidade associada à endometriose. Primeiramente, sabe-se que a endometriose pode causar alterações no ambiente peritoneal, levando a um estado inflamatório crônico e oxidativo, o que pode afetar a função ovariana e a qualidade dos óvulos e embriões (BARCELOS; VIEIRA; FERREIRA; MARTINS *et al.*, 2009; DA BROI; NAVARRO, 2016; FERREIRA; GIORGI; RODRIGUES; DE ANDRADE *et al.*, 2019; MALVEZZI; HERNANDES; PICCINATO; PODGAEC, 2019). O 5-HETE é um potente quimiotático para neutrófilos e eosinófilos e pode estar envolvido na atração dessas células para o tecido endometrial ectópico, contribuindo para a inflamação local e sistêmica (BITTLEMAN; CASALE, 1995). Além disso, estudos mostram que o 5-HETE pode afetar a angiogênese, a proliferação celular e a apoptose em diferentes tipos de células, incluindo as células do ovário (MILLER; GHOSH; MYERS; MACDONALD, 2000; ZENG; YELLATURU; NEELI; RAO, 2002). Considerando que os folículos ovarianos podem ser impactados pelas alterações séricas, especialmente nos estágios finais de maturação oocitária (EDWARDS, 1974; LEROY; VANHOLDER; DELANGHE; OPSOMER *et al.*, 2004; PRIETO; QUESADA; CAMBERO; PACHECO *et al.*, 2012; VALCKX; DE PAUW; DE NEUBOURG; INION *et al.*, 2012), as alterações pró-inflamatórias encontradas no presente estudo podem indicar possível impacto folicular nessas pacientes. Assim, o aumento da produção de 5-HETE pode estar envolvido na patogênese da endometriose e sua associação com a infertilidade.

A análise da concentração dos eicosanoides no FF demonstrou um aumento na concentração de EPA no grupo endometriose comparado ao controle. Esses resultados sugerem que a endometriose pode estar associada a um desequilíbrio de eicosanoides no FF. O resultado fica ainda mais interessante ao se subdividir o grupo endometriose, evidenciando que existe um aumento de concentração de EPA no FF de mulheres com endometrioma comparado às do grupo controle e endometriose sem endometrioma. Mais uma vez, esse dado reflete um comportamento distinto da doença a depender do tipo de lesão encontrada. Sendo o endometrioma uma lesão ovariana encapsulada (HUGHESDON, 1957; PAFFONI; BOLIS; FERRARI; BENAGLIA *et al.*, 2019), a alteração observada no FF reflete diretamente a condição do microambiente folicular e pode ter implicações clínicas na fertilidade dessas mulheres. Esses achados são importantes e sugerem que o microambiente folicular em mulheres com endometriose é modulado de forma diferente dependendo da presença ou

ausência de endometrioma, e que isso pode ter implicações importantes para a fisiologia reprodutiva dessas pacientes.

O EPA é conhecido por suas propriedades anti-inflamatórias, incluindo a inibição da síntese de prostaglandinas pró-inflamatórias e leucotrienos, e a redução da expressão de moléculas de adesão celular, diminuindo a adesão dos leucócitos aos vasos sanguíneos (CALDER, 2010; SERHAN, 2005). Seu aumento no FF de mulheres com endometrioma pode estar relacionado a um efeito de proteção do organismo contra a inflamação crônica que ocorre nesse tipo de lesão (YLAND; CARVALHO; BESTE; BAILEY *et al.*, 2020). Tal inflamação pode levar a um estresse oxidativo, com aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, o que pode resultar em danos às células e tecidos (NAKAGAWA; HISANO; SUGIYAMA; YAMAGUCHI, 2016). Nesse sentido, o aumento de EPA no FF pode ser uma resposta compensatória a fim de reduzir esse estresse oxidativo e proteger as células ovarianas e foliculares da inflamação crônica presente no endometrioma.

Há poucos estudos avaliando diretamente a associação do EPA com a infertilidade em pacientes com endometriose. Um estudo do nosso grupo evidenciou que a adição de EPA em meio de cultura de maturação oocitária preveniu os danos meióticos provocados pelo FF de mulheres com endometriose em todos os estágios (GIORGI; NAVARRO, 2018). Além disso, há evidências que a suplementação de EPA reduziu a dor pélvica relacionada à endometriose (NETSU; KONNO; ODAGIRI; SOMA *et al.*, 2008) e não impactou negativamente na reserva ovariana de pacientes com endometrioma. No entanto, mais estudos são necessários para entender a relação entre o EPA e a infertilidade em pacientes com endometriose e endometrioma.

A comparação das variáveis clínicas entre os grupos controle e endometriose evidenciou uma homogeneidade, mesmo quando subdividida a endometriose em com e sem endometrioma. Todavia, observou-se uma redução significativa no número de oócitos coletados, número de oócitos maduros, número de oócitos fertilizados, número de embriões clivados e número de embriões formados em D2 no grupo endometriose em comparação com o grupo controle, corroborando achados de outros estudos (HAMDAN; DUNSELMAN; LI; CHEONG, 2015; QU; DU; YU; WANG *et al.*, 2022). A endometriose pode ter um impacto direto sobre o número de folículos recrutados e a qualidade dos oócitos, explicando essas diferenças observadas. É interessante destacar que, apesar dessas reduções, não foram encontradas diferenças significativas nas taxas de fertilização, clivagem, gestações e nascidos

vivos. Nesse sentido, questionamos se o aumento do EPA no FF dessas pacientes poderia ter um efeito protetor, reduzindo o impacto das alterações inflamatórias e oxidativas sobre o potencial de desenvolvimento embrionário, o que precisa ser explorado em estudos futuros. Ao analisar os subgrupos do grupo endometriose, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas variáveis analisadas. No entanto, é importante pontuar que a redução no tamanho da amostra pode ter influenciado essa falta de diferenças estatísticas, uma vez que foi possível observar tendências de diminuição nas variáveis número de oócitos coletados, número de oócitos maduros, número de oócitos fertilizados e número de embriões clivados. É necessário ter cautela ao interpretar esses resultados, pois, apesar da ausência de diferenças estatísticas, essas tendências podem sugerir uma possível influência da endometriose e do endometrioma na qualidade dos gametas e embriões, o que precisa ser avaliado com casuística adequada. A literatura médica nos mostra que a endometriose é uma condição que pode ter um impacto significativo no TRA, afetando várias etapas do processo e influenciando os resultados. A presença de endometriose pode levar a desafios específicos, como a redução do número de oócitos coletados, a diminuição da qualidade oocitária, a redução da taxa de fertilização e a diminuição da taxa de implantação embrionária (HAMDAN; OMAR; G; CHEONG, 2015; INVERNICI; RESCHINI; BENAGLIA; SOMIGLIANA *et al.*, 2022).

As análises de correlações desempenham um papel crucial na determinação da relação de uma variável com a outra. Neste estudo, avaliamos correlações entre as concentrações de eicosanoides no soro e no fluido folicular, bem como correlações entre as concentrações de eicosanoides no soro e no FF e os resultados do tratamento de RA em mulheres inférteis com e sem endometriose.

Ao examinar a correlação entre as concentrações de eicosanoides no soro e no FF, observamos uma correlação moderada positiva entre o 5-HETE no soro e no fluido folicular de pacientes do grupo controle, sugerindo que a composição deste eicosanoide no soro pode refletir a do ambiente folicular em situações fisiológicas. Todavia, no grupo endometriose, não observamos nenhuma correlação forte ou moderada entre as concentrações séricas e as foliculares de eicosanoides. Isto pode ser decorrente de mecanismos foliculares de defesa anti-inflamatórios na tentativa de preservar a qualidade gamética. Essas descobertas ressaltam a importância de entender as interações entre os eicosanoides no soro e no FF e seu impacto na fertilidade das pacientes com endometriose.

Apesar das correlações entre as concentrações de eicosanoides no soro e os resultados de RA serem fracas, alguns dados interessantes podem ser discutidos. Nas pacientes do grupo controle, nota-se uma correlação negativa entre 11-HETE e taxa de clivagem, sugerindo que um aumento na concentração sérica de 11-HETE pode ter um impacto negativo nessas taxas. Curiosamente, a concentração de 11-HETE se correlacionou positivamente com o 5-HETE no fluido folicular, o qual já se mostrou alterado no soro de mulheres com endometriose. Além disso, encontrou-se, no grupo endometriose, uma associação negativa entre 15-HETE e o número de embriões clivados, o número de embriões em D2 e o número de embriões em D3, assim como uma correlação negativa entre o 11-HETE e o número de embriões em D3. Isso sugere que os eicosanoides do grupo HETE, potencialmente pró-inflamatórios, podem prejudicar o início do desenvolvimento embrionário, e que seu aumento em doenças inflamatórias, como a endometriose, pode justificar uma qualidade embrionária inferior.

Assim como no soro, as correlações entre as concentrações de eicosanoides no FF e os resultados de RA se mostraram fracas. No grupo controle, foi evidenciada uma correlação positiva entre as concentrações de PGE-2 e o número de oócitos captados, o número de oócitos fertilizados, o número de embriões clivados e o número de embriões em D2. A relação entre a PGE-2 e os processos chaves na gametogênese, ovulação e desenvolvimento embrionário é bem estabelecida na literatura. Embora a concentração de várias prostaglandinas aumente paralelamente durante a ovulação, a PGE-2 é considerada o principal mediador (KIM; DUFFY, 2016; VERNUNFT; LAPP; VIERGUTZ; WEITZEL, 2022). A PGE-2 orquestra os processos de ovulação, incluindo expansão do cúmulo, a liberação do oócito, a ruptura folicular e a angiogênese (KIM; DUFFY, 2016). Verificou-se que a PGE-2 está envolvida não apenas na expansão do cúmulo, mas também na maturação meiótica, sendo que o seu aumento favorece as condições moleculares para a conclusão da meiose (NIRINGIYUMUKIZA; CAI; XIANG, 2018). Também está envolvida na regulação do processo de fertilização, atuando na degradação da matriz extracelular do COC, o que permite a chegada do espermatozoide ao óvulo (NIRINGIYUMUKIZA; CAI; XIANG, 2018). Em embriões, níveis gradualmente crescentes de PGE2 de um embrião de 2 células para um blastocisto foram identificados (TAN; LIU; DIAO; YANG, 2005). A PGE-2 é considerada um fator mitogênico, anti-apoptótico e angiogênico para proliferação celular e sobrevivência em outras células (SALES; KATZ; DAVIS; HINZ *et al.*, 2001), o que sugere que a PGE-2 exerce esses efeitos no desenvolvimento do embrião, aumentando assim a proliferação de células embrionárias. Logo, uma alteração nos níveis fisiológicos de PGE-2 pode alterar toda essa precisa regulação,

alterando potencialmente a fertilidade. No grupo controle, também se evidenciou uma correlação positiva entre a concentração de 15-oxo-ETE e o número de oócitos maduros, e uma correlação negativa entre os níveis de EPA e a taxa de fertilização. Nesses casos, a problemática se estabelece quando os mediadores inflamatórios se exacerbam e sobrecarregam as defesas naturais anti-inflamatórias. Assim, a correlação negativa entre EPA e fertilização sugere que a descompensação pode impactar, mesmo com aumento de defesa anti-inflamatória. Já, no grupo endometriose, observou-se uma correlação negativa entre 15-oxo-ETE e o número de embriões clivados e o número de embriões de boa qualidade em D2. Uma vez que esse eicosanoide é um metabólito do 15-HETE, com ação predominantemente pró-inflamatória (WEI; ZHU; SHAH; BLAIR, 2009), uma elevação de 15-oxo-HETE poderia implicar em baixa qualidade embrionária.

CONCLUSÕES

Não se observou diferença na concentração sérica de eicosanoides entre mulheres inférteis controles e com endometriose. Todavia, ao subdividirmos o grupo endometriose, demonstramos maiores concentrações séricas de 5-HETE em mulheres inférteis com endometriose sem endometrioma quando comparadas às com endometrioma e controles, sugerindo que a doença peritoneal favorece a elevação sistêmica deste eicosanoide pró-inflamatório, o que pode favorecer tanto a etiopatogênese da endometriose, como da infertilidade relacionada a mesma. Por outro lado, observou-se maiores concentrações foliculares de EPA em mulheres inférteis com endometriose quando comparadas às controles, especificamente naquelas com endometrioma, o que pode estar relacionado a um efeito de proteção do microambiente folicular contra a inflamação crônica que ocorre nesse tipo de lesão, na tentativa de prevenir o dano oocitário.

Ao avaliarmos a correlação entre as concentrações de eicosanoides no soro e no FF, observamos uma correlação moderada positiva apenas entre o 5-HETE no soro e no fluido folicular de pacientes do grupo controle, sugerindo que a composição deste eicosanoide no soro pode refletir a do ambiente folicular em situações fisiológicas. No grupo endometriose, não observamos qualquer correlação forte ou moderada entre as concentrações séricas e as foliculares de eicosanoides, o que pode ser decorrente de mecanismos foliculares de defesa anti-inflamatória na tentativa de preservar a qualidade gamética.

Observou-se apenas fracas correlações entre as concentrações séricas e foliculares de eicosanoides e os resultados dos tratamentos de RA nos grupos com e sem endometriose. No soro, alguns eicosanoides do grupo HETE se mostraram correlacionados negativamente com parâmetros iniciais do desenvolvimento embrionário, o que sugere que eicosanoides com esse perfil pró-inflamatório podem prejudicar os primeiros dias do desenvolvimento embrionário. No FF, uma correlação positiva do PGE-2 com parâmetros do recrutamento folicular e desenvolvimento embrionário inicial em pacientes controle sugerem a importância dessa molécula em eventos fisiológicos que permeiam a capacidade reprodutiva.

Em conjunto, estes achados são importantes para avançarmos no entendimento dos mecanismos subjacentes à infertilidade relacionada à endometriose. Compreender o papel dos eicosanoides na fisiopatologia da endometriose e na qualidade oocitária pode favorecer o estudo e descoberta de abordagens terapêuticas inovadoras, visando melhorar tanto a

fertilidade natural, como os resultados dos tratamentos de reprodução assistida nas mulheres inférteis com endometriose que apresentam má qualidade gamética e embrionária.

REFERÊNCIAS

AARDEMA, H.; VOS, P.; LOLICATO, F.; ROELEN, B. *et al.* Oleic acid prevents detrimental effects of saturated fatty acids on bovine oocyte developmental competence. **Biology of reproduction**, 85, n. 1, 2011 Jul 2011.

AGARWAL, A.; APONTE-MELLADO, A.; PREMKUMAR, B.; SHAMAN, A. *et al.* The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, 10, 06/29/2012 2012.

AGARWAL, A.; SALEH, R.; BEDAIWY, M. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility and sterility**, 79, n. 4, 2003 Apr 2003.

AGARWAL, N.; SUBRAMANIAN, A. Endometriosis - morphology, clinical presentations and molecular pathology. **Journal of laboratory physicians**, 2, n. 1, 2010 Jan 2010.

AHN, S.; MONSANTO, S.; MILLER, C.; SINGH, S. *et al.* Pathophysiology and Immune Dysfunction in Endometriosis. **BioMed research international**, 2015, 2015 2015.

ALPHA; ESHRE. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. **Human reproduction (Oxford, England)**, 26, n. 6, 2011 Jun 2011.

ANDRADE, A.; RODRIGUES, J.; DIB, L.; ROMÃO, G. *et al.* Serum markers of oxidative stress in infertile women with endometriosis. **Revista brasileira de ginecologia e obstetricia : revista da Federacao Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetricia**, 32, n. 6, 2010 Jun 2010.

ARNOLD, J.; VERCELLINO, G.; CHIANTERA, V.; SCHNEIDER, A. *et al.* Neuroimmunomodulatory alterations in non-lesional peritoneum close to peritoneal endometriosis. **Neuroimmunomodulation**, 20, n. 1, 2013 2013.

ASRM. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. **Fertility and sterility**, 67, n. 5, 1997 May 1997.

ASRM. Endometriosis and infertility: a committee opinion. **Fertility and sterility**, 98, n. 3, 2012 Sep 2012.

AUGOULEA, A.; MASTORAKOS, G.; LAMBRINOUDAKI, I.; CHRISTODOULAKOS, G. *et al.* The role of the oxidative-stress in the endometriosis-related infertility. **Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology**, 25, n. 2, 2009 Feb 2009.

AYALA, C.; STEINBERGER, E.; SMITH, D. The influence of semen analysis parameters on the fertility potential of infertile couples. **Journal of andrology**, 17, n. 6, 1996 Nov-Dec 1996.

BARBOSA, M.; TEIXEIRA, D.; NAVARRO, P.; FERRIANI, R. *et al.* Impact of endometriosis and its staging on assisted reproduction outcome: systematic review and meta-analysis. **Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology**, 44, n. 3, 2014 Sep 2014.

BARCELOS, I.; VIEIRA, R.; FERREIRA, E.; MARTINS, W. *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. **Fertility and sterility**, 92, n. 5, 2009 Nov 2009.

BARNHART, K.; DUNSMOOR-SU, R.; COUTIFARIS, C. Effect of endometriosis on in vitro fertilization. **Fertility and sterility**, 77, n. 6, 2002 Jun 2002.

BITTLEMAN, D.; CASALE, T. 5-Hydroxyeicosatetraenoic acid (HETE)-induced neutrophil transcellular migration is dependent upon enantiomeric structure. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, 12, n. 3, 1995 Mar 1995.

BLANKSBY, S.; MITCHELL, T. Advances in mass spectrometry for lipidomics. **Annual review of analytical chemistry (Palo Alto, Calif.)**, 3, 2010 2010.

BRIZEK, C.; SCHLAFF, S.; PELLEGRINI, V.; FRANK, J. *et al.* Increased incidence of aberrant morphological phenotypes in human embryogenesis--an association with endometriosis. **Journal of assisted reproduction and genetics**, 12, n. 2, 1995 Feb 1995.

BULLETTI, C.; COCCIA, M.; BATTISTONI, S.; BORINI, A. Endometriosis and infertility. **Journal of assisted reproduction and genetics**, 27, n. 8, 2010 Aug 2010.

BURNEY, R.; GIUDICE, L. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. **Fertility and sterility**, 98, n. 3, 2012 Sep 2012.

CALDER, P. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. **The American journal of clinical nutrition**, 83, n. 6 Suppl, 2006 Jun 2006.

CALDER, P. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes. **Nutrients**, 2, n. 3, 2010 Mar 2010.

CATALÁ, A. A synopsis of the process of lipid peroxidation since the discovery of the essential fatty acids. **Biochemical and biophysical research communications**, 399, n. 3, 08/27/2010 2010.

CHOI, Y.; CHO, S.; SEO, S.; PARK, J. *et al.* Alteration in the intrafollicular thiol-redox system in infertile women with endometriosis. **Reproduction (Cambridge, England)**, 149, n. 2, 2015 Feb 2015.

CORDEIRO, F.; CATALDI, T.; PERKEL, K.; DA COSTA, L. *et al.* Lipidomics analysis of follicular fluid by ESI-MS reveals potential biomarkers for ovarian endometriosis. **Journal of assisted reproduction and genetics**, 32, n. 12, 2015 Dec 2015.

D'HOOGHE, T.; DEBROCK, S.; HILL, J.; MEULEMAN, C. Endometriosis and subfertility: is the relationship resolved? **Seminars in reproductive medicine**, 21, n. 2, 2003 May 2003.

DA BROI, M.; DE ALBUQUERQUE, F.; DE ANDRADE, A.; CARDOSO, R. *et al.* Increased concentration of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in follicular fluid of infertile women with endometriosis. **Cell and tissue research**, 366, n. 1, 2016 Oct 2016.

DA BROI, M.; GIORGI, V.; WANG, F.; KEEFE, D. *et al.* Influence of follicular fluid and cumulus cells on oocyte quality: clinical implications. **Journal of assisted reproduction and genetics**, 35, n. 5, 2018 May 2018.

DA BROI, M.; JORDÃO, A.; FERRIANI, R.; NAVARRO, P. Oocyte oxidative DNA damage may be involved in minimal/mild endometriosis-related infertility. **Molecular reproduction and development**, 85, n. 2, 2018 Feb 2018.

DA BROI, M.; MALVEZZI, H.; PAZ, C.; FERRIANI, R. *et al.* Follicular fluid from infertile women with mild endometriosis may compromise the meiotic spindles of bovine metaphase II oocytes. **Human reproduction (Oxford, England)**, 29, n. 2, 2014 Feb 2014.

DA BROI, M.; NAVARRO, P. Oxidative stress and oocyte quality: ethiopathogenic mechanisms of minimal/mild endometriosis-related infertility. **Cell and tissue research**, 364, n. 1, 2016 Apr 2016.

DA BROI, M.; ROCHA, C.; CARVALHO, F.; MARTINS, W. *et al.* Ultrastructural Evaluation of Eutopic Endometrium of Infertile Women With and Without Endometriosis During the Window of Implantation: A Pilot Study. **Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)**, 24, n. 10, 2017 Oct 2017.

DA LUZ, C.; DA BROI, M.; DONABELA, F.; PARO, C. *et al.* PTGS2 down-regulation in cumulus cells of infertile women with endometriosis. **Reproductive biomedicine online**, 35, n. 4, 2017 Oct 2017.

DAMEWOOD, M.; HESLA, J.; SCHLAFF, W.; HUBBARD, M. *et al.* Effect of serum from patients with minimal to mild endometriosis on mouse embryo development in vitro. **Fertility and sterility**, 54, n. 5, 1990 Nov 1990.

DE LIMA, C.; CORDEIRO, F.; CAMARGO, M.; ZYLBERSZTEJN, D. *et al.* Follicular fluid lipid peroxidation levels in women with endometriosis during controlled ovarian hyperstimulation. **Human fertility (Cambridge, England)**, 20, n. 1, 2017 Apr 2017.

DOMINIC M. DESIDERIO, N. M. N. **Mass Spectrometry: Instrumentation, Interpretation, and Applications**. 2021.

DU, Y.; GAO, M.; SHI, Y.; SUN, Z. *et al.* Endocrine and inflammatory factors and endometriosis-associated infertility in assisted reproduction techniques. **Archives of gynecology and obstetrics**, 287, n. 1, 2013 Jan 2013.

DUNNING, K.; ANASTASI, M.; ZHANG, V.; RUSSELL, D. *et al.* Regulation of fatty acid oxidation in mouse cumulus-oocyte complexes during maturation and modulation by PPAR agonists. **PloS one**, 9, n. 2, 02/05/2014 2014.

EDWARDS, R. Follicular fluid. **Journal of reproduction and fertility**, 37, n. 1, 1974 Mar 1974.

ESKENAZI, B.; WARNER, M. Epidemiology of endometriosis. **Obstetrics and gynecology clinics of North America**, 24, n. 2, 1997 Jun 1997.

FAN, Y.; CHEN, H.; CHEN, W.; LIU, Y. *et al.* Expression of inflammatory cytokines in serum and peritoneal fluid from patients with different stages of endometriosis. **Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology**, 34, n. 6, 2018 Jun 2018.

FENN, J.; MANN, M.; MENG, C.; WONG, S. *et al.* Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science (New York, N.Y.)**, 246, n. 4926, 10/06/1989 1989.

FERREIRA, C.; SOUZA, G.; RICCIO, M.; CATHARINO, R. *et al.* Mass spectrometry fingerprinting of media used for in vitro production of bovine embryos. **Rapid communications in mass spectrometry : RCM**, 23, n. 9, 2009 May 2009.

FERREIRA, C. R.; SARAIVA, S. A.; CATHARINO, R. R.; GARCIA, J. S. *et al.* Single embryo and oocyte lipid fingerprinting by mass spectrometry. **Journal of Lipid Research**, 51, n. 5, p. 1218-1227, May 2010.

FERREIRA, E.; GIORGI, V.; RODRIGUES, J.; DE ANDRADE, A. *et al.* Systemic oxidative stress as a possible mechanism underlying the pathogenesis of mild endometriosis-related infertility. **Reproductive biomedicine online**, 39, n. 5, 2019 Nov 2019.

FUNK, C. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. **Science (New York, N.Y.)**, 294, n. 5548, 11/30/2001 2001.

GARCIA-VELASCO, J.; FASSBENDER, A.; RUIZ-ALONSO, M.; BLESA, D. *et al.* Is endometrial receptivity transcriptomics affected in women with endometriosis? A pilot study. **Reproductive biomedicine online**, 31, n. 5, 2015 Nov 2015.

GIORGI, V.; DA BROI, M.; PAZ, C.; FERRIANI, R. *et al.* N-Acetyl-Cysteine and L-Carnitine Prevent Meiotic Oocyte Damage Induced by Follicular Fluid From Infertile Women With Mild Endometriosis. **Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)**, 23, n. 3, 2016 Mar 2016.

GIORGI, V. S. I.; NAVARRO, P. A. D. A. S. L-carnitine and omega-3 fatty acids prevent meiotic damages in bovine oocytes matured in vitro with follicular fluid from infertile women with endometriosis. 2018-11-30 2018. text.

GIUDICE, L.; KAO, L. Endometriosis. **Lancet (London, England)**, 364, n. 9447, 2004 Nov 13-19 2004.

GUPTA, S.; AGARWAL, A.; KRAJCIR, N.; ALVAREZ, J. Role of oxidative stress in endometriosis. **Reproductive biomedicine online**, 13, n. 1, 2006 Jul 2006.

GUPTA, S.; GOLDBERG, J.; AZIZ, N.; GOLDBERG, E. *et al.* Pathogenic mechanisms in endometriosis-associated infertility. **Fertility and sterility**, 90, n. 2, 2008 Aug 2008.

HAGGARTY, P.; WOOD, M.; FERGUSON, E.; HOAD, G. *et al.* Fatty acid metabolism in human preimplantation embryos. **Hum Reprod**, 21, n. 3, p. 766-773, Mar 2006.

HAMDAN, M.; DUNSELMAN, G.; LI, T.; CHEONG, Y. The impact of endometrioma on IVF/ICSI outcomes: a systematic review and meta-analysis. **Human reproduction update**, 21, n. 6, 2015 Nov-Dec 2015.

HAMDAN, M.; OMAR, S.; G, D.; CHEONG, Y. Influence of endometriosis on assisted reproductive technology outcomes: a systematic review and meta-analysis. **Obstetrics and gynecology**, 125, n. 1, 2015 Jan 2015.

HAMILTON, J.; CISEN, M.; BRANDES, M.; SMEENK, J. *et al.* Total motile sperm count: a better indicator for the severity of male factor infertility than the WHO sperm classification system. **Human reproduction (Oxford, England)**, 30, n. 5, 2015 May 2015.

HARIZI, H.; CORCUFF, J.; GUALDE, N. Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. **Trends in molecular medicine**, 14, n. 10, 2008 Oct 2008.

HAYDARDEDEOGLU, B.; ZEYNELOGLU, H. The impact of endometriosis on fertility. **Women's health (London, England)**, 11, n. 5, 2015 Aug 2015.

HELLIWELL, R.; ADAMS, L.; MITCHELL, M. Prostaglandin synthases: recent developments and a novel hypothesis. **Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids**, 70, n. 2, 2004 Feb 2004.

HOLOCH, K.; LESSEY, B. Endometriosis and infertility. **Clinical obstetrics and gynecology**, 53, n. 2, 2010 Jun 2010.

HSU, A.; TOWNSEND, P.; OEHNINGER, S.; CASTORA, F. Endometriosis may be associated with mitochondrial dysfunction in cumulus cells from subjects undergoing in vitro fertilization-

intracytoplasmic sperm injection, as reflected by decreased adenosine triphosphate production. **Fertility and sterility**, 103, n. 2, 2015 Feb 2015.

HUGHES, E.; FEDORKOW, D.; COLLINS, J. A quantitative overview of controlled trials in endometriosis-associated infertility. **Fertility and sterility**, 59, n. 5, 1993 May 1993.

HUGHESDON, P. E. The structure of endometrial cysts of the ovary. **The Journal of obstetrics and gynaecology of the British Empire**, 64, n. 4, 1957 Aug 1957.

INVERNICI, D.; RESCHINI, M.; BENAGLIA, L.; SOMIGLIANA, E. *et al.* The impact of endometriosis on IVF efficacy: qualitative and quantitative assessment of ovarian response and embryo development. **Reproductive biomedicine online**, 45, n. 2, 2022 Aug 2022.

JUNGHEIM, E.; MACONES, G.; ODEM, R.; PATTERSON, B. *et al.* Associations between free fatty acids, cumulus oocyte complex morphology and ovarian function during in vitro fertilization. **Fertility and sterility**, 95, n. 6, 2011 May 2011.

KIKUT, J.; KOMORNIAK, N.; ZIĘTEK, M.; PALMA, J. *et al.* Inflammation with the participation of arachidonic (AA) and linoleic acid (LA) derivatives (HETEs and HODEs) is necessary in the course of a normal reproductive cycle and pregnancy. **Journal of reproductive immunology**, 141, 2020 Sep 2020.

KIM, S.; DUFFY, D. Mapping PTGERS to the Ovulatory Follicle: Regional Responses to the Ovulatory PGE2 Signal. **Biology of reproduction**, 95, n. 2, 2016 Aug 2016.

KITAJIMA, M.; DEFÈRE, S.; DOLMANS, M.; COLETTE, S. *et al.* Endometriomas as a possible cause of reduced ovarian reserve in women with endometriosis. **Fertility and sterility**, 96, n. 3, 2011 Sep 2011.

KONKEL, A.; SCHUNCK, W. Role of cytochrome P450 enzymes in the bioactivation of polyunsaturated fatty acids. **Biochimica et biophysica acta**, 1814, n. 1, 2011 Jan 2011.

KÜHN, H.; O'DONNELL, V. Inflammation and immune regulation by 12/15-lipoxygenases. **Progress in lipid research**, 45, n. 4, 2006 Jul 2006.

LEROY, J.; VANHOLDER, T.; DELANGHE, J.; OPSOMER, G. *et al.* Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different-sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. **Animal reproduction science**, 80, n. 3-4, 2004 Feb 2004.

LEROY, J.; VANHOLDER, T.; MATEUSEN, B.; CHRISTOPHE, A. *et al.* Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro. **Reproduction (Cambridge, England)**, 130, n. 4, 2005 Oct 2005.

LEUTI, A.; FAZIO, D.; FAVA, M.; PICCOLI, A. *et al.* Bioactive lipids, inflammation and chronic diseases. **Advanced drug delivery reviews**, 159, 2020 2020.

LIU, F.; HE, L.; LIU, Y.; SHI, Y. *et al.* The expression and role of oxidative stress markers in the serum and follicular fluid of patients with endometriosis. **Clinical and experimental obstetrics & gynecology**, 40, n. 3, 2013 2013.

LIU, L.; TRIMARCHI, J.; NAVARRO, P.; BLASCO, M. *et al.* Oxidative stress contributes to arsenic-induced telomere attrition, chromosome instability, and apoptosis. **The Journal of biological chemistry**, 278, n. 34, 08/22/2003 2003.

LIU, Y.; LUO, L.; ZHAO, H. Levels of lipid peroxides and superoxide dismutase in peritoneal fluid of patients with endometriosis. **Journal of Tongji Medical University = Tong ji yi ke da xue xue bao**, 21, n. 2, 2001 2001.

MACER, M.; TAYLOR, H. Endometriosis and infertility: a review of the pathogenesis and treatment of endometriosis-associated infertility. **Obstetrics and gynecology clinics of North America**, 39, n. 4, 2012 Dec 2012.

MALVEZZI, H.; DA BROI, M.; J, M.; ROSA-E-SILVA, J. *et al.* Peritoneal fluid of women with endometriosis reduces SOD1 in bovine oocytes in vitro maturation. **Cell and tissue research**, 372, n. 3, 2018 Jun 2018.

MALVEZZI, H.; HERNANDES, C.; PICCINATO, C.; PODGAEC, S. Interleukin in endometriosis-associated infertility-pelvic pain: systematic review and meta-analysis. **Reproduction (Cambridge, England)**, 158, n. 1, 2019 Jul 2019.

MARTINS, W.; VIEIRA, C.; TEIXEIRA, D.; BARBOSA, M. *et al.* Ultrasound for monitoring controlled ovarian stimulation: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology**, 43, n. 1, 2014 Jan 2014.

MARTORIATI, A.; LALMANACH, A.; GOUDET, G.; GÉRARD, N. Expression of interleukin-1 (IL-1) system genes in equine cumulus-oocyte complexes and influence of IL-1beta during in vitro maturation. **Biology of reproduction**, 67, n. 2, 2002 Aug 2002.

MASSEY, K.; NICOLAOU, A. Lipidomics of polyunsaturated-fatty-acid-derived oxygenated metabolites. **Biochemical Society transactions**, 39, n. 5, 2011 Oct 2011.

MASSEY, K.; NICOLAOU, A. Lipidomics of oxidized polyunsaturated fatty acids. **Free radical biology & medicine**, 59, n. 100, 2013 Jun 2013.

MATORRAS, R.; RUIZ, J.; MENDOZA, R.; RUIZ, N. *et al.* Fatty acid composition of fertilization-failed human oocytes. **Human reproduction (Oxford, England)**, 13, n. 8, 1998 Aug 1998.

MILLER, T.; GHOSH, J.; MYERS, C.; MACDONALD, T. 5-HETE congeners as modulators of cell proliferation. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, 10, n. 17, 09/04/2000 2000.

MIRABI, P.; CHAICHI, M.; ESMAEILZADEH, S.; ALI JORSARAEI, S. *et al.* The role of fatty acids on ICSI outcomes: a prospective cohort study. **Lipids in health and disease**, 16, n. 1, 01/21/2017 2017.

MOK, H.; SHIN, H.; LEE, J.; LEE, G. *et al.* Age-Associated Lipidome Changes in Metaphase II Mouse Oocytes. **PloS one**, 11, n. 2, 02/16/2016 2016.

MORCOS, R.; GIBBONS, W.; FINDLEY, W. Effect of peritoneal fluid on in vitro cleavage of 2-cell mouse embryos: possible role in infertility associated with endometriosis. **Fertility and sterility**, 44, n. 5, 1985 Nov 1985.

MURPHY, A.; SANTANAM, N.; PARTHASARATHY, S. Endometriosis: a disease of oxidative stress? **Seminars in reproductive endocrinology**, 16, n. 4, 1998 1998.

MURPHY, R.; BARKLEY, R.; ZEMSKI BERRY, K.; HANKIN, J. *et al.* Electrospray ionization and tandem mass spectrometry of eicosanoids. **Analytical biochemistry**, 346, n. 1, 11/01/2005 2005.

NAKAGAWA, K.; HISANO, M.; SUGIYAMA, R.; YAMAGUCHI, K. Measurement of oxidative stress in the follicular fluid of infertility patients with an endometrioma. **Archives of gynecology and obstetrics**, 293, n. 1, 2016 Jan 2016.

NASIRI, N.; MOINI, A.; EFTEKHARI-YAZDI, P.; KARIMIAN, L. *et al.* Oxidative Stress Statues in Serum and Follicular Fluid of Women with Endometriosis. **Cell journal**, 18, n. 4, Winter 2017 2017.

NAVARRO, P.; LIU, L.; FERRIANI, R.; KEEFE, D. Arsenite induces aberrations in meiosis that can be prevented by coadministration of N-acetylcysteine in mice. **Fertility and sterility**, 85 Suppl 1, 2006 Apr 2006.

NAVARRO, P.; LIU, L.; KEEFE, D. In vivo effects of arsenite on meiosis, preimplantation development, and apoptosis in the mouse. **Biology of reproduction**, 70, n. 4, 2004 Apr 2004.

NETSU, S.; KONNO, R.; ODAGIRI, K.; SOMA, M. *et al.* Oral eicosapentaenoic acid supplementation as possible therapy for endometriosis. **Fertility and sterility**, 90, n. 4 Suppl, 2008 Oct 2008.

NIRINGIYUMUKIZA, J.; CAI, H.; XIANG, W. Prostaglandin E2 involvement in mammalian female fertility: ovulation, fertilization, embryo development and early implantation. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, 16, n. 1, 05/01/2018 2018.

PAFFONI, A.; BOLIS, V.; FERRARI, S.; BENAGLIA, L. *et al.* The Gametotoxic Effects of the Endometrioma Content: Insights From a Parthenogenetic Human Model. **Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)**, 26, n. 5, 2019 May 2019.

PELLICER, A.; OLIVEIRA, N.; GUTIERREZ, A. Implantation in endometriosis: lessons learned from IVF and oocyte donation. *Progress in endometriosis*: 177–183 p. 1994.

PETEAN, C.; FERRIANI, R.; DOS REIS, R.; DE MOURA, M. *et al.* Lipid peroxidation and vitamin E in serum and follicular fluid of infertile women with peritoneal endometriosis submitted to controlled ovarian hyperstimulation: a pilot study. **Fertility and sterility**, 90, n. 6, 2008 Dec 2008.

PETTA, T.; MORAES, L.; FACCIOLI, L. Versatility of tandem mass spectrometry for focused analysis of oxylipids. **Journal of mass spectrometry : JMS**, 50, n. 7, 2015 Jul 2015.

POLAK, G.; WERTEL, I.; BARCZYŃSKI, B.; KWAŚNIEWSKI, W. *et al.* Increased levels of oxidative stress markers in the peritoneal fluid of women with endometriosis. **European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology**, 168, n. 2, 2013 Jun 2013.

PRIETO, L.; QUESADA, J.; CAMBERO, O.; PACHECO, A. *et al.* Analysis of follicular fluid and serum markers of oxidative stress in women with infertility related to endometriosis. **Fertility and sterility**, 98, n. 1, 2012 Jul 2012.

QU, H.; DU, Y.; YU, Y.; WANG, M. *et al.* The effect of endometriosis on IVF/ICSI and perinatal outcome: A systematic review and meta-analysis. **Journal of gynecology obstetrics and human reproduction**, 51, n. 9, 2022 Nov 2022.

RANA, N.; BRAUN, D.; HOUSE, R.; GEBEL, H. *et al.* Basal and stimulated secretion of cytokines by peritoneal macrophages in women with endometriosis. **Fertility and sterility**, 65, n. 5, 1996 May 1996.

RUDER, E.; HARTMAN, T.; BLUMBERG, J.; GOLDMAN, M. Oxidative stress and antioxidants: exposure and impact on female fertility. **Human reproduction update**, 14, n. 4, Jul-Aug 2008 2008.

SALES, K.; KATZ, A.; DAVIS, M.; HINZ, S. *et al.* Cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E(2) synthesis are up-regulated in carcinomas of the cervix: a possible autocrine/paracrine regulation of neoplastic cell function via EP2/EP4 receptors. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, 86, n. 5, 2001 May 2001.

SANCHEZ, A.; VANNI, V.; BARTIROMO, L.; PAPALETTO, E. *et al.* Is the oocyte quality affected by endometriosis? A review of the literature. **Journal of ovarian research**, 10, n. 1, 07/12/2017 2017.

SERHAN, C. Novel omega -- 3-derived local mediators in anti-inflammation and resolution. **Pharmacology & therapeutics**, 105, n. 1, 2005 Jan 2005.

SHAAKER, M.; RAHIMIPOUR, A.; NOURI, M.; KHANAKI, K. *et al.* Fatty acid composition of human follicular fluid phospholipids and fertilization rate in assisted reproductive techniques. **Iranian biomedical journal**, 16, n. 3, 2012 2012.

SHEBL, O.; SIFFERLINGER, I.; HABELSBERGER, A.; OPPELT, P. *et al.* Oocyte competence in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection patients suffering from endometriosis and its possible association with subsequent treatment outcome: a matched case-control study. **Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica**, 96, n. 6, 2017 Jun 2017.

SIGNORILE, P.; BALDI, A. Endometriosis: new concepts in the pathogenesis. **The international journal of biochemistry & cell biology**, 42, n. 6, 2010 Jun 2010.

SIMÓN, C.; GUTIÉRREZ, A.; VIDAL, A.; DE LOS SANTOS, M. *et al.* Outcome of patients with endometriosis in assisted reproduction: results from in-vitro fertilization and oocyte donation. **Human reproduction (Oxford, England)**, 9, n. 4, 1994 Apr 1994.

SINGH, A.; CHATTOPADHYAY, R.; CHAKRAVARTY, B.; CHAUDHURY, K. Markers of oxidative stress in follicular fluid of women with endometriosis and tubal infertility undergoing IVF. **Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)**, 42, 2013 Dec 2013.

SORGI, C.; PETI, A.; PETTA, T.; MEIRELLES, A. *et al.* Comprehensive high-resolution multiple-reaction monitoring mass spectrometry for targeted eicosanoid assays. **Scientific data**, 5, 08/21/2018 2018.

STILLEY, J.; BIRT, J.; SHARPE-TIMMS, K. Cellular and molecular basis for endometriosis-associated infertility. **Cell and tissue research**, 349, n. 3, 2012 Sep 2012.

SUNG, L.; MUKHERJEE, T.; TAKESHIGE, T.; BUSTILLO, M. *et al.* Endometriosis is not detrimental to embryo implantation in oocyte recipients. **Journal of assisted reproduction and genetics**, 14, n. 3, 1997 Mar 1997.

SZCZUKO, M.; KIKUT, J.; KOMORNIK, N.; BILICKI, J. *et al.* The Role of Arachidonic and Linoleic Acid Derivatives in Pathological Pregnancies and the Human Reproduction Process. **International journal of molecular sciences**, 21, n. 24, 12/17/2020 2020.

TAM, V. Lipidomic profiling of bioactive lipids by mass spectrometry during microbial infections. **Seminars in immunology**, 25, n. 3, 10/31/2013 2013.

TAN, H.; LIU, Y.; DIAO, H.; YANG, Z. Cyclooxygenases and prostaglandin E synthases in preimplantation mouse embryos. **Zygote (Cambridge, England)**, 13, n. 2, 2005 May 2005.

VALCKX, S.; DE PAUW, I.; DE NEUBOURG, D.; INION, I. *et al.* BMI-related metabolic composition of the follicular fluid of women undergoing assisted reproductive treatment and the consequences for oocyte and embryo quality. **Human reproduction (Oxford, England)**, 27, n. 12, 2012 Dec 2012.

VERCELLINI, P.; CHAPRON, C.; DE GIORGI, O.; CONSONNI, D. *et al.* Coagulation or excision of ovarian endometriomas? **American journal of obstetrics and gynecology**, 188, n. 3, 2003 Mar 2003.

VERNUNFT, A.; LAPP, R.; VIERGUTZ, T.; WEITZEL, J. Effects of different cyclooxygenase inhibitors on prostaglandin E2 production, steroidogenesis and ovulation of bovine preovulatory follicles. **The Journal of reproduction and development**, 68, n. 4, 08/01/2022 2022.

VOUK, K.; HEVIR, N.; RIBIĆ-PUCELJ, M.; HAARPAINTNER, G. *et al.* Discovery of phosphatidylcholines and sphingomyelins as biomarkers for ovarian endometriosis. **Human reproduction (Oxford, England)**, 27, n. 10, 2012 Oct 2012.

WEI, C.; ZHU, P.; SHAH, S.; BLAIR, I. 15-oxo-Eicosatetraenoic acid, a metabolite of macrophage 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase that inhibits endothelial cell proliferation. **Molecular pharmacology**, 76, n. 3, 2009 Sep 2009.

WEI, Q.; ST CLAIR, J.; FU, T.; STRATTON, P. *et al.* Reduced expression of biomarkers associated with the implantation window in women with endometriosis. **Fertility and sterility**, 91, n. 5, 2009 May 2009.

WU, M.; SUN, H.; LIN, C.; HSIAO, K. *et al.* Distinct mechanisms regulate cyclooxygenase-1 and -2 in peritoneal macrophages of women with and without endometriosis. **Molecular human reproduction**, 8, n. 12, 2002 Dec 2002.

YLAND, J.; CARVALHO, L.; BESTE, M.; BAILEY, A. *et al.* Endometrioma, the follicular fluid inflammatory network and its association with oocyte and embryo characteristics. **Reproductive biomedicine online**, 40, n. 3, 2020 Mar 2020.

ZENG, Z.; YELLATURU, C.; NEELI, I.; RAO, G. 5(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid stimulates DNA synthesis in human microvascular endothelial cells via activation of Jak/STAT and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling, leading to induction of expression of basic fibroblast growth factor 2. **The Journal of biological chemistry**, 277, n. 43, 10/25/2002 2002.

APÊNDICE

9.1. Condições para LC-MS/MS

A análise LC-MS/MS foi realizada usando um Acquity Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) (Waters Corp., Milford, MA, EUA) com um sistema de bomba quaternária e um amostrador automático com interface com o espectrômetro de massa Xevo TQ-S equipado com um Fonte de ionização por eletrospray Z-spray (Waters Corp., Milford, MA, EUA). Para a separação cromatográfica dos mediadores lipídicos foi utilizada uma coluna HPLC C18 (Supelco, Ascentis Express) com dimensões de $100 \times 3,0$ mm, $2,7 \mu\text{m}$. A eluição foi conduzida com um gradiente binário, onde a fase A consistia em água/acetonitrila/ácido acético (69,98 : 30 : 0,02, v/v/v) e a fase B era acetonitrila/isopropanol (70:30, v/v). O gradiente linear começou com 0% B e foi aumentado para 15% B em 2 min, 20% B em 5 min, 35% B em 8 min, 40% B em 11 min, 100% B em 15 min, 100% B aos 18 min, 0% de B aos 19 min e mantido até 30 min com uma vazão de $0,6 \text{ ml min}^{-1}$. A fonte de ionização por eletrospray (ESI) operou no modo de íon negativo usando os modos MRM, íon precursor e varredura de íon produto.

Para otimização das condições de MRM e MS de íon precursor, padrões puros a 100 ng.ml^{-1} preparados em MeOH/H₂O/AcNH₄ (70 : 29,9 : 0,1, v/v/v) foram infundidos no espectrômetro a um fluxo taxa de $10 \mu\text{L.min}^{-1}$ e fragmentado via CID com argônio para obter espectros de íons de produto para cada eicosanoide individual. Após a seleção das transições MRM, as energias de cone e colisão foram otimizadas por meio da infusão dos padrões para obter a sensibilidade ótima. Para análise LC-MS/MS usando a varredura de íons de produto de m/z 115, os íons selecionados foram fragmentados com energia de colisão de 20 eV e energia de cone de 40 V. Os espectros foram adquiridos na faixa de varredura de massa de m/z 200 a 700 Da com um tempo de varredura de 0,3 s. Parâmetros analíticos adicionais foram os seguintes: capilar, 2,00 V; temperatura da fonte, 150 °C; temperatura de dessolvatação, 350°C; fluxo de gás cônico, 150 l.h^{-1} ; fluxo de gás de dessolvatação, 500 l.h^{-1} ; fluxo de gás de colisão, $0,15 \text{ ml}^{-1}$; fluxo de gás do nebulizador, 7,00 bar; e tempo de permanência, 0,003 s. Os dados foram processados usando o programa Masslynx 4.1 (Waters Corp., Milford, MA, EUA).

O sistema de cromatografia líquida de ultra alta performance (UHPLC) (Nexera X 2, Shimadzu-Kyoto, HO, Japão) foi equipado com um sistema de bomba binária, um amostrador automático SIL-30AC, um desgaseificador DGU-20A e um controlador CBM-20^a. Para isso,

foi utilizada uma coluna Ascentis Express C18 (Supelco - St. Louis, MO, EUA) com diâmetro interno de $100 \times 4,6$ mm e tamanho de partícula de $2,7 \mu\text{m}$. A eluição foi conduzida sob um sistema de gradiente binário que consistia em Fase A, H₂O/ACN/ácido acético (69,98:30:0,02, v/v/v) a pH 5,8 (ajustado com NH₄OH) e Fase B, um ACN/isopropanol (70:30, v/v). A eluição em gradiente foi realizada por 25 min a uma vazão de $0,6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. As condições de gradiente foram as seguintes: 0 a 2,0 min, 0% B; 2,0 a 5,0 min, 15% B; 5,0 a 8,0 min, 20% B; 8,0 a 11,0 min, 35% B; 11,0 a 15,0 min, 70% B; e 15,0 a 19 min, 100% B. Aos 19,0 min, o gradiente voltou à condição inicial de 0% B, e a coluna foi reequilibrada até 25,0 min. Ao longo das análises, a coluna foi mantida a 25 °C e as amostras foram mantidas a 4 °C no amostrador automático. Uma alíquota de 10 μL de cada amostra foi injetada na coluna. O pH da fase móvel A foi otimizado para alcançar a melhor sensibilidade e separação cromatográfica dos metabólitos lipídicos. Assim, os valores de pH da fase A ao longo do experimento foram 3,8, 5,8 e 6,4.

O sistema UHPLC foi interfaceado com um Espectrômetro de Massa TripleTOF5600 + (Sciex-Foster, CA, EUA) equipado com um Turbo-V IonSpray. Uma sonda de Ionização Química de Pressão Atmosférica (APCI) foi usada para calibrações externas do Sistema de Distribuição de Calibrantes (CDS). A calibração automática de massa (<2 ppm) foi realizada usando APCI Negative Calibration Solution (Sciex-Foster, CA, EUA) injetada por infusão direta a uma taxa de fluxo de $300 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$; isso foi feito periodicamente após cada uma das cinco injeções de amostra. Uma fonte de ionização por eletrospray (ESI) no modo de íon negativo foi utilizada para varredura MRM HR. Para otimização do MRM, valores de CE e DP foram determinados para cada analito por meio de infusão direta de soluções de MWS e IS a uma taxa de fluxo de $10 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$. Os compostos foram fragmentados via CAD usando nitrogênio como gás de colisão. Parâmetros instrumentais adicionais foram os seguintes: gás nebulizador (GS1), 50 psi; turbo-gás (GS2), 50 psi; gás de cortina (CUR), 25 psi; tensão de eletrospray (ISVF), -4,0 kV; e temperatura da fonte de pulverização de íon turbo, 550°C. A faixa de massa dos experimentos de íons de produto foi de m/z 50 a 700, o tempo de permanência foi de 10 ms e uma resolução de massa de 35.000 foi alcançada em m/z 400. As aquisições de dados foram realizadas usando o Analyst Software (Sciex-Foster, CA, EUA).

9.2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido grupo endometriose



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO
PRETO-USP

DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA

Av. Bandeirantes, 3900 - 1º andar - Ribeirão Preto-SP - CEP 14049-900

Fone (016) 3602-2821 - Fax (016)3633-0946

Setor de Reprodução Humana

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO E PARA A GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO (Grupo Infértil com Endometriose)

1. NOME DA PESQUISA: “Determinação do perfil lipídico sérico, folicular, em células do cumulus e oócitos maturados *in vitro* de pacientes com endometriose e controles submetidas à estimulação ovariana e fertilização *in vitro*”.

2. PESQUISADORA RESPONSÁVEL: Profa. Dra. Paula Andrea de A. Salles Navarro.

3. INFORMAÇÕES À PARTICIPANTE DA PESQUISA

Você está sendo convidada a participar voluntariamente da pesquisa intitulada “Determinação do perfil lipídico sérico, folicular, em células do cumulus e oócitos maturados *in vitro* de pacientes com endometriose e controles submetidas à estimulação ovariana e fertilização *in vitro*”. Antes de decidir participar deste estudo, é importante que você leia e compreenda os procedimentos envolvidos. Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e para a Guarda de Material Biológico descreve o motivo, os procedimentos e os potenciais benefícios desta pesquisa. Por favor, sinta-se à vontade para fazer quantas perguntas quiser. É necessário ler e assinar este termo de consentimento antes que você possa participar. Sua decisão de participar ou não participar neste estudo não terá qualquer interferência sobre o seu tratamento para engravidar.

A endometriose é uma doença caracterizada pela presença do endométrio (tecido que reveste o interior do útero) fora da cavidade uterina e uma causa bastante comum de dificuldade para engravidar (denominada infertilidade, que é a não ocorrência de gravidez após 12 meses de atividade sexual regular sem uso de métodos para evitar a gestação). Nas mulheres inférteis com endometriose, questiona-se se um dos motivos responsáveis por essa maior dificuldade em engravidar seja a inadequada qualidade dos óvulos (oócitos), que poderão produzir embriões também de má qualidade, impossibilitando a gestação. O óvulo é envolto por camadas de células, chamada células do cumulus, e está mergulhado em um líquido chamado fluido folicular. Esses componentes formam a “casa” do óvulo com função de estimular e permitir o seu desenvolvimento até que ele possa ser fertilizado pelo espermatozoide. Algumas evidências sugerem que modificações nas gorduras (lipídios) existentes tanto nestes componentes da “casa” do óvulo (células do cumulus e fluido folicular) quanto nos próprios óvulos possam permitir a entrada de substâncias que causam danos ao material genético (região que contém informações necessárias para o bom funcionamento do nosso organismo) deste óvulo, prejudicando a sua qualidade e levando à redução das chances de gravidez mesmo quando se realizam procedimentos de fertilização assistida (obtenção de óvulos da mulher e fertilização dos

TCLE versão 7 datada de 20.05.19

Rubrica da pesquisadora	Rubrica da participante	Termo de Consentimento Página 1 de 5
-------------------------	-------------------------	--------------------------------------

óvulos com os espermatozóides do parceiro no laboratório, seguido pela colocação do óvulo fertilizado, embrião, dentro da cavidade uterina).

4. POR QUE VOCÊ ESTÁ SENDO CONVIDADA A PARTICIPAR?

A senhora está sendo convidada a participar deste estudo na posição de participante da pesquisa do grupo infértil com endometriose. Sua colaboração, portanto, no fornecimento das amostras será fundamental para um melhor conhecimento dos mecanismos envolvidos em casos de infertilidade com endometriose. Esses dados também serão fundamentais para um melhor entendimento da qualidade do óvulo, e se, quando alterados, podem contribuir para menores chances de gestação em mulheres inférteis com endometriose, o que ajudaria na identificação de tratamentos futuros.

5. OBJETIVO DO ESTUDO

O objetivo deste estudo é comparar o perfil de lipídios no sangue, fluido folicular (líquido contido no local aonde os óvulos se desenvolvem), células do cumulus (células que envolvem o óvulo) e em oócitos maturados (óvulos imaturos que não tem capacidade de ser fertilizados) *in vitro* (que serão amadurecidos em laboratório imitando as condições normais de maturação que ocorre no ciclo natural da mulher) de mulheres inférteis com endometriose com as inférteis por outros fatores, como infertilidade por defeitos das tubas uterinas (estruturas que transportam o óvulo até o útero) e/ou masculino (quando a causa de infertilidade está no parceiro do sexo masculino de um casal) submetidas à estimulação ovariana controlada (dosagem hormonal diária indicada pelo ginecologista à participante da pesquisa) para realização de fertilização *in vitro*.

6. O QUE ENVOLVE A SUA PARTICIPAÇÃO?

Para estudarmos as modificações do perfil de lipídios de mulheres inférteis com endometriose e compará-los com o que ocorre em mulheres inférteis sem a doença coletaremos uma amostra de sangue no dia da captação dos óvulos, antes da anestesia geral. Durante a aspiração folicular (aspiração dos óvulos realizada através de um aparelho de ultrassom, em que se é acoplada uma agulha que será guiada até o ovário para que seja aspirado seu conteúdo), junto com os óvulos maduros, aqueles que têm capacidade de ser fertilizados e originar o embrião, também vem óvulos imaturos (óvulos que não conseguiram terminar seu amadurecimento e não têm capacidade de ser fertilizados normalmente), várias células (células do cumulus) e o líquido aonde os óvulos se desenvolvem (fluido folicular). Esses componentes são normalmente descartados, não tendo utilidade no procedimento de reprodução assistida, de modo que solicitamos para que sejam concedidos para a presente pesquisa. A concessão destas amostras para este estudo não prejudicará o seu tratamento, nem promoverá intervenções complementares às da rotina assistencial. Para este estudo não será realizado nenhum procedimento adicional além daquele que você já vai realizar para fazer o tratamento de reprodução assistida. A única diferença é que o material que seria descartado será concedido para esta pesquisa. Os óvulos imaturos concedidos para a pesquisa serão amadurecidos *in vitro* (ou seja, no laboratório) para que seja estudada a sua composição de gorduras (lipídios). Devemos, portanto, ressaltar que este estudo e a concessão de seus óvulos, que não amadureceram, não irá interferir em seu tratamento para engravidar, assim como não causará prejuízo nenhum para sua saúde, nem para a do futuro bebê. Além disso,

TCLE versão 7 datada de 20.05.19

Rubrica da pesquisadora	Rubrica da participante	Termo de Consentimento Página 2 de 5
-------------------------	-------------------------	--------------------------------------

garantimos que esses óvulos serão utilizados apenas para avaliação dos lipídios (não poderão ser utilizados para outros fins que não os desta pesquisa), e jamais serão fertilizados.

7. POSSÍVEIS BENEFÍCIOS

A sua participação neste estudo não implica em benefícios diretos para você. Caso haja benefícios oriundos da sua participação, eles serão indiretos, ou seja, poderão contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos relacionados a pior qualidade do óvulo em mulheres inférteis com endometriose e, talvez, no futuro poderão ser usados no sentido de auxiliar na elaboração de novos tratamentos para a infertilidade associada à endometriose.

8. POSSÍVEIS DESCONFORTOS E RISCOS:

Para conceder uma amostra de sangue serão coletados 10mL de sangue utilizando a punção venosa realizada pelo anestesista para a realização da sedação endovenosa para a aspiração dos folículos. Pode haver discreto dolorimento local e formação de hematoma, mas estes possíveis desconfortos podem ocorrer pela punção, que será realizada como rotina assistencial. Para conceder amostras de fluido folicular, células do cumulus e óvulos imaturos não haverá qualquer desconforto adicional ao do procedimento, realizado como parte da rotina assistencial para obtenção dos óvulos para o seu tratamento.

9. O QUE ACONTECE SE VOCÊ NÃO QUISE PARTICIPAR?

Sua participação neste estudo é totalmente voluntária. Se você decidir não participar, não haverá penalidade, perda de benefícios ou redução na qualidade dos cuidados médicos.

10. E SE VOCÊ QUISE SAIR DO ESTUDO APÓS TER ACEITADO PARTICIPAR?

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. Caso você deseje retirar o seu consentimento, favor notificar as investigadoras, através do número de telefone listado no item 14 deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e para a Guarda de Material Biológico.

11. SIGILO E DIVULGAÇÃO DE INFORMAÇÕES PESSOAIS

Asseguramos o total sigilo em relação aos nomes das integrantes deste estudo, bem como garantimos que será mantido o caráter confidencial de toda informação relacionada a sua privacidade.

12. CUSTOS E REMUNERAÇÃO

É importante ressaltarmos que este estudo não trará nenhuma despesa para você e seu companheiro. Você não terá que pagar para participar deste estudo e nem será paga por sua participação. Você também não terá que pagar por nenhum procedimento que será realizado neste estudo, uma vez que as amostras serão coletadas exclusivamente nos dias que você terá retorno no serviço por indicação médica. Todavia, se houver necessidade de comparecer ao serviço, exclusivamente para a pesquisa, para fins de esclarecimento ou outra demanda relacionada, você e seu acompanhante terão direito ao ressarcimento

TCLE versão 7 datada de 20.05.19

Rubrica da pesquisadora	Rubrica da participante	Termo de Consentimento Página 3 de 5
-------------------------	-------------------------	--------------------------------------

dos gastos decorrentes de sua participação, como por exemplo gastos com transporte e alimentação.

13. NO CASO DE DANO RELACIONADO À PESQUISA

A Resolução CNS Nº 466 de 2012 define como dano associado (ou decorrente) da pesquisa o “agravo imediato ou posterior, direto ou indireto, ao indivíduo ou à coletividade, decorrente da pesquisa” (item II.6). Caso você sofra algum dano supostamente relacionado a esta pesquisa, você tem o direito de buscar indenização, assim como direito à assistência integral imediata, de forma gratuita, pelo tempo que for necessário providenciada pelas pesquisadoras e pelo HC/FMRP-USP/SP como estabelecido dentro do padrão internacional de boas práticas clínicas e resolução vigente no Brasil.

14. CONTATO PARA MAIS INFORMAÇÕES

As pesquisadoras estarão disponíveis para responder a quaisquer perguntas que você possa ter em relação ao estudo que, porventura, possam ocorrer durante a investigação da causa da infertilidade ou do seu tratamento para engravidar. Se você tiver alguma dúvida sobre esta pesquisa, você pode entrar em contato com uma das pesquisadoras principais (Profª. Drª. Paula Andrea de A. Salles Navarro, Drª Michele Gomes da Broi e Mayra Beraldo Andozia) pelos telefones (16) 3602-2816 e/ou (16) 3602-2815 ou procurá-las diretamente no setor de Reprodução Humana do HC-FMRP-USP, sito à avenida Bandeirantes, 3900, Campus Universitário da USP, 1º andar, Ribeirão Preto, SP, de Segunda à Sexta-feira das 08hrs00min às 16hrs00min. Caso ocorra alguma emergência poderá entrar em contato pelo telefone (16) 99179-5680 disponível 24 horas. Se você tem alguma dúvida sobre seus direitos como participante da pesquisa ou em caso de julgamento relacionado com uma lesão, entre em contato com o médico do estudo ou o seu médico de confiança. Caso você queira falar com alguém não diretamente envolvido neste estudo sobre os seus direitos, preocupações, danos relacionados à pesquisa, você pode se comunicar com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo no Campus Universitário, S/N, Monte Alegre, Prédio Central, Subsolo - 14048-900 – Ribeirão Preto/SP, em (16) 3602-2228 com horário de funcionamento de Segunda à Sexta-feira das 08hrs00min às 17hrs00min. Você também poderá entrar em contato, caso se sentir coagido para aceitar ou continuar a participar da pesquisa.

15. INFORMAÇÕES ADICIONAIS

Este estudo encontra-se registrado no Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é um colegiado que deve existir nas instituições que realizam pesquisa envolvendo seres humanos no Brasil, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos (Resolução nº 466/12 Conselho Nacional de Saúde). Já, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) é uma comissão do Conselho Nacional de Saúde (CNS) com a função de implementar as normas e diretrizes regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos em áreas temáticas especiais como genética humana

TCLE versão 7 datada de 20.05.19

Rubrica da pesquisadora	Rubrica da participante	Termo de Consentimento Página 4 de 5
-------------------------	-------------------------	--------------------------------------

e reprodução humana, (área na qual este estudo se enquadra) e atua conjuntamente os CEPs organizados nas instituições onde as pesquisas se realizam.

16. BIORREPOSITÓRIO

Biorrepositório é o armazenamento de material biológico para uso em curto prazo. Esta pesquisa está vinculada ao biorrepositório de sangue, fluido folicular, células do cumulus e oócitos imaturos para determinação do perfil de lipídios criado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP com o objetivo de guardar amostras de sangue, fluido folicular, células do cumulus e oócitos imaturos para o melhor entendimento da infertilidade por endometriose. Gostaríamos de convidá-la a autorizar a coleta, o depósito, o armazenamento e a utilização dos materiais biológicos humano acima discriminados para fins de pesquisa e análise científica. Será coletado 10 ml de sangue por punção venosa e amostras de fluido folicular, células do cumulus e óvulos imaturos por aspiração folicular no dia da aspiração de folículos durante o seu tratamento de Reprodução Assistida para determinação do perfil de lipídios. Após coletadas, as amostras serão processadas, congeladas e armazenadas em Biorrepositório localizado no Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP até que o material esteja completo para ser analisado. As pesquisadoras responsáveis pela equipe se comprometem a identificar as amostras e os dados coletados por meio do número de prontuário, de modo que garanta o seu sigilo e a sua confidencialidade. Após a conclusão do estudo, qualquer material remanescente será destruído de acordo com as boas práticas clínicas. Sua participação é voluntária, tendo liberdade de aceitar ou não que a sua amostra seja guardada, sem risco de qualquer penalização ou prejuízo no atendimento e tratamento que está recebendo. A Sra. também tem o direito de retirar seu consentimento de guarda e utilização do sangue, fluido folicular, células do cumulus e óvulos imaturos armazenados a qualquer momento. Solicitamos também os seus dados de contato para possa ser encontrada posteriormente.

17. ASSINALE AS AMOSTRAS QUE DESEJA CONCEDER:

- Sangue Células do Cumulus
 Fluido Folicular Óvulos imaturos

18. CONSENTIMENTO

Ao assinalar as amostras, assinar e datar este termo, você irá confirmar que foi suficiente informada sobre a natureza e a finalidade deste estudo. Confirma também que foi capaz de discutir dúvidas em detalhes com a pesquisadora, e que estas, foram completamente e satisfatoriamente respondidas. Este termo consta em duas vias. Você receberá uma via datada e assinada e a outra via ficará com a pesquisadora.

Nome da participante da pesquisa	Assinatura	Data
Nome da pesquisadora	Assinatura	Data
Nome do(a) responsável pela coleta	Assinatura	Data
TCLE versão 7 datada de 20.05.19		
Rubrica da pesquisadora	Rubrica da participante	Termo de Consentimento Página 5 de 5

9.3. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido grupo controle



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO
PRETO-USP
DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA
Av. Bandeirantes, 3900 - 1º andar - Ribeirão Preto-SP - CEP 14049-900
Fone (016) 3602-2021 - Fax (016)3633-0046
Setor de Reprodução Humana

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO E PARA A GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO (Grupo Controle Infértil sem Endometriose)

1. NOME DA PESQUISA: "Determinação do perfil lipídico sérico, folicular, em células do cumulus e oócitos maturados *in vitro* de pacientes com endometriose e controles submetidas à estimulação ovariana e fertilização *in vitro*".

2. PESQUISADORA RESPONSÁVEL: Profa. Dra. Paula Andrea de A. Salles Navarro.

3. INFORMAÇÕES À PARTICIPANTE DA PESQUISA

Você está sendo convidada a participar voluntariamente da pesquisa intitulada "Determinação do perfil lipídico sérico, folicular, em células do cumulus e oócitos maturados *in vitro* de pacientes com endometriose e controles submetidas à estimulação ovariana e fertilização *in vitro*". Antes de decidir participar deste estudo, é importante que você leia e compreenda os procedimentos envolvidos. Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e para a Guarda de Material Biológico descreve o motivo, os procedimentos e os potenciais benefícios desta pesquisa. Por favor, sinta-se à vontade para fazer quantas perguntas quiser. É necessário ler e assinar este termo de consentimento antes que você possa participar. Sua decisão de participar ou não participar neste estudo não terá qualquer interferência sobre o seu tratamento para engravidar.

A endometriose é uma doença caracterizada pela presença do endométrio (tecido que reveste o interior do útero) fora da cavidade uterina e uma causa bastante comum de dificuldade para engravidar (denominada infertilidade, que é a não ocorrência de gravidez após 12 meses de atividade sexual regular sem uso de métodos para evitar a gestação). Nas mulheres inférteis com endometriose, questiona-se se um dos motivos responsáveis por essa maior dificuldade em engravidar seja a inadequada qualidade dos óvulos (oócitos), que poderão produzir embriões também de má qualidade, impossibilitando a gestação. O óvulo é envolto por camadas de células, chamada células do cumulus, e está mergulhado em um líquido chamado fluido folicular. Esses componentes formam a "casa" do óvulo com função de estimular e permitir o seu desenvolvimento até que ele possa ser fertilizado pelo espermatozóide. Algumas evidências sugerem que modificações nas gorduras (lipídios) existentes tanto nestes componentes da "casa" do óvulo (células do cumulus e fluido folicular) quanto nos próprios óvulos possam permitir a entrada de substâncias que causam danos ao material genético (região que contém informações necessárias para o bom funcionamento do nosso organismo) deste óvulo, prejudicando a sua qualidade e levando à redução das chances de gravidez mesmo quando se realizam procedimentos de fertilização assistida (obtenção de óvulos da mulher e fertilização dos óvulos com os espermatozóides do parceiro no laboratório, seguido pela colocação do óvulo fertilizado, embrião, dentro da cavidade uterina).

TCLE versão 7 datada de 20.05.19

Rubrica da pesquisadora	Rubrica da participante	Termo de Consentimento Página 1 de 5
-------------------------	-------------------------	--------------------------------------

4. POR QUE VOCÊ ESTÁ SENDO CONVIDADA A PARTICIPAR?

A senhora está sendo convidada a participar deste estudo na posição de participante da pesquisa do grupo controle infértil sem endometriose, pois para podermos dizer se o perfil de lipídios de mulheres com endometriose é diferente daqueles de mulheres inférteis sem a doença, precisamos de amostras de um grupo tido como controle, ou seja, que não tem endometriose, onde você estaria incluída. Sua colaboração, portanto, no fornecimento das amostras será fundamental para um melhor conhecimento dos mecanismos envolvidos em casos de infertilidade sem endometriose. Esses dados também serão fundamentais para um melhor entendimento da qualidade do óvulo, e se, quando alterados, podem contribuir para menores chances de gestação em mulheres inférteis com endometriose, o que ajudaria na identificação de tratamentos futuros.

5. OBJETIVO DO ESTUDO

O objetivo deste estudo é comparar o perfil de lipídios no sangue, fluido folicular (líquido contido no local aonde os óvulos se desenvolvem), células do cumulus (células que envolvem o óvulo) e em oócitos maturados (óvulos imaturos que não tem capacidade de ser fertilizados) *in vitro* (que serão amadurecidos em laboratório imitando as condições normais de maturação que ocorre no ciclo natural da mulher) de mulheres inférteis com endometriose com as inférteis por outros fatores, como infertilidade por defeitos das tubas uterinas (estruturas que transportam o óvulo até o útero) e/ou masculino (quando a causa de infertilidade está no parceiro do sexo masculino de um casal) submetidas à estimulação ovariana controlada (dosagem hormonal diária indicada pelo ginecologista à participante da pesquisa) para realização de fertilização *in vitro*.

6. O QUE ENVOLVE A SUA PARTICIPAÇÃO?

Para estudarmos as modificações do perfil de lipídios de mulheres inférteis com endometriose e compará-los com o que ocorre em mulheres inférteis sem a doença coletaremos uma amostra de sangue no dia da captação dos óvulos, antes da anestesia geral. Durante a aspiração folicular (aspiração dos óvulos realizada através de um aparelho de ultrassom, em que se é acoplada uma agulha que será guiada até o ovário para que seja aspirado seu conteúdo), junto com os óvulos maduros, aqueles que têm capacidade de ser fertilizados e originar o embrião, também vem óvulos imaturos (óvulos que não conseguiram terminar seu amadurecimento e não têm capacidade de ser fertilizados normalmente), várias células (células do cumulus) e o líquido aonde os óvulos se desenvolvem (fluido folicular). Esses componentes são normalmente descartados, não tendo utilidade no procedimento de reprodução assistida, de modo que solicitamos para que sejam concedidos para a presente pesquisa. A concessão destas amostras para este estudo não prejudicará o seu tratamento, nem promoverá intervenções complementares às da rotina assistencial. Para este estudo não será realizado nenhum procedimento adicional além daquele que você já vai realizar para fazer o tratamento de reprodução assistida. A única diferença é que o material que seria descartado será concedido para esta pesquisa. Os óvulos imaturos concedidos para a pesquisa serão amadurecidos *in vitro* (ou seja, no laboratório) para que seja estudada a sua composição de gorduras (lipídios). Devemos, portanto, ressaltar que este estudo e a concessão de seus óvulos, que não amadureceram, não irá interferir em seu tratamento para engravidar, assim como não

TCLE versão 7 datada de 20.05.19

Rubrica da pesquisadora	Rubrica da participante	Termo de Consentimento Página 2 de 5
-------------------------	-------------------------	--------------------------------------

causará prejuízo nenhum para sua saúde, nem para a do futuro bebê. Além disso, garantimos que esses óvulos serão utilizados apenas para avaliação dos lipídios (não poderão ser utilizados para outros fins que não os desta pesquisa), e jamais serão fertilizados.

7. POSSÍVEIS BENEFÍCIOS

A sua participação neste estudo não implica em benefícios diretos para você. Caso haja benefícios oriundos da sua participação, eles serão indiretos, ou seja, poderão contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos relacionados a pior qualidade do óvulo em mulheres inférteis com endometriose e, talvez, no futuro poderão ser usados no sentido de auxiliar na elaboração de novos tratamentos para a infertilidade associada à endometriose.

8. POSSÍVEIS DESCONFORTOS E RISCOS:

Para conceder uma amostra de sangue serão coletados 10mL de sangue utilizando a punção venosa realizada pelo anestesista para a realização da sedação endovenosa para a aspiração dos folículos. Pode haver discreto dolorimento local e formação de hematoma, mas estes possíveis desconfortos podem ocorrer pela punção, que será realizada como rotina assistencial. Para conceder amostras de fluido folicular, células do cumulus e óvulos imaturos não haverá qualquer desconforto adicional ao do procedimento, realizado como parte da rotina assistencial para obtenção dos óvulos para o seu tratamento.

9. O QUE ACONTECE SE VOCÊ NÃO QUISE PARTICIPAR?

Sua participação neste estudo é totalmente voluntária. Se você decidir não participar, não haverá penalidade, perda de benefícios ou redução na qualidade dos cuidados médicos.

10. E SE VOCÊ QUISE SAIR DO ESTUDO APÓS TER ACEITADO PARTICIPAR?

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. Caso você deseje retirar o seu consentimento, favor notificar as investigadoras, através do número de telefone listado no item 14 deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para a Guarda de Material Biológico.

11. SIGILO E DIVULGAÇÃO DE INFORMAÇÕES PESSOAIS

Asseguramos o total sigilo em relação aos nomes das integrantes deste estudo, bem como garantimos que será mantido o caráter confidencial de toda informação relacionada a sua privacidade.

12. CUSTOS E REMUNERAÇÃO

É importante ressaltarmos que este estudo não trará nenhuma despesa para você e seu companheiro. Você não terá que pagar para participar deste estudo e nem será paga por sua participação. Você também não terá que pagar por nenhum procedimento que será realizado neste estudo, uma vez que as amostras serão coletadas exclusivamente nos dias que você terá retorno no serviço por indicação médica. Todavia, se houver necessidade de comparecer ao serviço, exclusivamente para a pesquisa, para fins de esclarecimento ou outra demanda relacionada, você e seu acompanhante terão direito ao ressarcimento

TCLE versão 7 datada de 20.05.19

Rubrica da pesquisadora	Rubrica da participante	Termo de Consentimento Página 3 de 5
-------------------------	-------------------------	--------------------------------------

dos gastos decorrentes de sua participação, como por exemplo gastos com transporte e alimentação.

13. NO CASO DE DANO RELACIONADO À PESQUISA

A Resolução CNS N° 466 de 2012 define como dano associado (ou decorrente) da pesquisa o “agravo imediato ou posterior, direto ou indireto, ao indivíduo ou à coletividade, decorrente da pesquisa” (item II.6). Caso você sofra algum dano supostamente relacionado a esta pesquisa, você tem o direito de buscar indenização, assim como direito à assistência integral imediata, de forma gratuita, pelo tempo que for necessário providenciada pelas pesquisadoras e pelo HC/FMRP-USP/SP como estabelecido dentro do padrão internacional de boas práticas clínicas e resolução vigente no Brasil.

14. CONTATO PARA MAIS INFORMAÇÕES

As pesquisadoras estarão disponíveis para responder a quaisquer perguntas que você possa ter em relação ao estudo que, porventura, possam ocorrer durante a investigação da causa da infertilidade ou do seu tratamento para engravidar. Se você tiver alguma dúvida sobre esta pesquisa, você pode entrar em contato com uma das pesquisadoras principais (Prof.^ª Dr.^ª Paula Andrea de A. Salles Navarro, Dr.^ª Michele Gomes da Broi e Mayra Beraldo Andozia) pelos telefones (16) 3602-2816 e/ou (16) 3602-2815 ou procurá-las diretamente no setor de Reprodução Humana do HC-FMRP-USP, sito à avenida Bandeirantes, 3900, Campus Universitário da USP, 1º andar, Ribeirão Preto, SP, de Segunda à Sexta-feira das 08hrs00min às 16hrs00min. Caso ocorra alguma emergência poderá entrar em contato pelo telefone (16) 99179-5680 disponível 24 horas. Se você tem alguma dúvida sobre seus direitos como participante da pesquisa ou em caso de julgamento relacionado com uma lesão, entre em contato com o médico do estudo ou o seu médico de confiança. Caso você queira falar com alguém não diretamente envolvido neste estudo sobre os seus direitos, preocupações, danos relacionados à pesquisa, você pode se comunicar com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo no Campus Universitário, S/N, Monte Alegre, Prédio Central, Subsolo - 14048-900 – Ribeirão Preto/SP, em (16) 3602-2228 com horário de funcionamento de Segunda à Sexta-feira das 08hrs00min às 17hrs00min. Você também poderá entrar em contato, caso se sentir coagido para aceitar ou continuar a participar da pesquisa.

15. INFORMAÇÕES ADICIONAIS

Este estudo encontra-se registrado no Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é um colegiado que deve existir nas instituições que realizam pesquisa envolvendo seres humanos no Brasil, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos (Resolução nº 466/12 Conselho Nacional de Saúde). Já, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) é uma comissão do Conselho Nacional de Saúde (CNS) com a função de implementar as normas e diretrizes regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos em áreas temáticas especiais como genética humana

TCLE versão 7 datada de 20.05.19

Rubrica da pesquisadora	Rubrica da participante	Termo de Consentimento
-------------------------	-------------------------	------------------------

Página 4 de 5

e reprodução humana (área na qual este estudo se enquadra) e atua conjuntamente os CEPs organizados nas instituições onde as pesquisas se realizam.

16. BIORREPOSITÓRIO

Biorrepositório é o armazenamento de material biológico para uso em curto prazo. Esta pesquisa está vinculada ao biorrepositório de sangue, fluido folicular, células do cumulus e oócitos imaturos para determinação do perfil de lipídios criado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP com o objetivo de guardar amostras de sangue, fluido folicular, células do cumulus e oócitos imaturos para o melhor entendimento da infertilidade por endometriose. Gostaríamos de convidá-la a autorizar a coleta, o depósito, o armazenamento e a utilização dos materiais biológicos humano acima discriminados para fins de pesquisa e análise científica. Será coletado 10 ml de sangue por punção venosa e amostras de fluido folicular, células do cumulus e óvulos imaturos por aspiração folicular no dia da aspiração de folículos durante o seu tratamento de Reprodução Assistida para determinação do perfil de lipídios. Após coletadas, as amostras serão processadas, congeladas e armazenadas em Biorrepositório localizado no Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP até que o material esteja completo para ser analisado. As pesquisadoras responsáveis pela equipe se comprometem a identificar as amostras e os dados coletados por meio do número de prontuário, de modo que garanta o seu sigilo e a sua confidencialidade. Após a conclusão do estudo, qualquer material remanescente será destruído de acordo com as boas práticas clínicas. Sua participação é voluntária, tendo liberdade de aceitar ou não que a sua amostra seja guardada, sem risco de qualquer penalização ou prejuízo no atendimento e tratamento que está recebendo. A Sra. também tem o direito de retirar seu consentimento de guarda e utilização do sangue, fluido folicular, células do cumulus e óvulos imaturos armazenados a qualquer momento. Solicitamos também os seus dados de contato para possa ser encontrada posteriormente.

17. ASSINALE AS AMOSTRAS QUE DESEJA CONCEDER:

- Sangue Células do Cumulus
 Fluido Folicular Óvulos imaturos

18. CONSENTIMENTO

Ao assinalar as amostras, assinar e datar este termo, você irá confirmar que foi suficiente informada sobre a natureza e a finalidade deste estudo. Confirma também que foi capaz de discutir dúvidas em detalhes com a pesquisadora, e que estas, foram completamente e satisfatoriamente respondidas. Este termo consta em duas vias. Você receberá uma via datada e assinada e a outra via ficará com a pesquisadora.

Nome da participante da pesquisa	Assinatura	Data
Nome da pesquisadora	Assinatura	Data
Nome do(a) responsável pela coleta	Assinatura	Data

TCLE versão 7 datada de 20.05.19

Rubrica da pesquisadora	Rubrica da participante	Termo de Consentimento Página 5 de 5
-------------------------	-------------------------	--------------------------------------