

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

JHENIFER KLIEMCHEN RODRIGUES

**Marcadores de estresse oxidativo em pacientes inférteis não obesas com
Síndrome dos ovários policísticos e inférteis por fator tubário e/ou
masculino e resultados de reprodução assistida**



RIBEIRÃO PRETO

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Marcadores de estresse oxidativo em pacientes inférteis não obesas com Síndrome dos ovários policísticos e inférteis por fator tubário e/ou masculino e resultados de reprodução assistida

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

Área de concentração: Biologia da Reprodução

Pós-graduanda: Jhenifer Kliemchen Rodrigues

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

RIBEIRÃO PRETO

2010

Marcadores de estresse oxidativo em pacientes inférteis não obesas com Síndrome dos ovários policísticos e inférteis por fator tubário e/ou masculino e resultados de reprodução assistida

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

Área de concentração: Biologia da Reprodução
Pós-graduanda: Jhenifer Kliemchen Rodrigues

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

Banca examinadora:

Prof. Dra. Anaglória Pontes

UNESP – Botucatu-SP Assinatura:.....

Prof. Dr. Rui Alberto Ferriani

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP Assinatura:.....

Profa. Dra. Paula A. A. Sales Navarro

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP Assinatura:.....

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Rodrigues, Jhenifer Kliemchen

Marcadores de estresse oxidativo em pacientes inférteis não obesas com Síndrome dos ovários policísticos e inférteis por fator tubário e/ou masculino e resultados de reprodução assistida, 2010.
98 p.

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

Orientador: Navarro, Paula Andrea Albuquerque Sales

1. Estresse oxidativo. 2. Infertilidade feminina. 3. Resposta à estimulação ovariana. 4. Peroxidação lipídica. 5. Glutathiona. 6. Vitamina E. 7. Resultados de RA. 8. SOP

Dedicatória

*À meus pais, Sirleney e Antonio Claret com todo o meu amor
e gratidão pelo apoio, presença e carinho sempre
constantemente ao longo de minha vida.*

*À meu companheiro, Nivaldo, com toda a admiração,
pelo amor, paciência, compreensão, carinho e bons conselhos
em todos os momentos que precisei.*

*À meu irmão, Jhonatan, com toda a minha admiração,
pelo carinho fraterno que sempre me deu.*

Agradecimientos

À Deus pela luz que sempre me guiou pelos meus caminhos e pela força e persistência quando mais precisei.

À minha família e companheiro, que sempre estiveram do meu lado dispostos a oferecer todo o amor e carinho, mesmo estando todos separados fisicamente pela distância.

À minha orientadora e amiga, Profa. Dra. Paula. Navarro pela atenção, carinho e oportunidade de constante aquisição e troca de conhecimento.

Às minhas amigas e amigos, companheiros de pós-graduação, pela amizade, força e bons conselhos, em especial às minhas irmãzinhas de coração, Luciana Dib, Jacira e Aline, que caminharam ao meu lado nesta etapa importante da minha vida.

Às funcionárias e amigas do Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia – Setor de Reprodução Humana – HC-FMRP-USP, Maria Cristina Araújo, Roberta Giorgenon, Maria Albina Bortoliero, Marisa, Marilda Dantas, Maria Aparecida Vasconcelos, Maria Auxiliadora Rosa e Sandra Viana, pela amizade e auxílio durante a execução do projeto.

Ao Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Junior, por ter cedido espaço no Laboratório de Nutrição de Metabolismo – FMRP-USP para a realização de parte desta pesquisa, e pela amizade e apoio.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, Virgínia Lipoli, Paula Payao e José Eduardo Bueno pela amizade e pelo apoio técnico prestado.

Ao Prof. Dr. Rui Alberto Ferriani, por ter me recebido no laboratório de Ginecologia e Obstetrícia- HC-FMRP – USP, e pela atenção e apoio sempre prestados.

À Profa. Dra. Anaglória Pontes pela disponibilidade em participar da banca examinadora desta dissertação, pela atenção e por suas preciosas sugestões para nosso trabalho

À Fundação de Apoio e Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa de Mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

"Quase tudo é possível quando se tem dedicação e habilidade. Grandes trabalhos são realizados não pela força, mas pela perseverança"

(Autor desconhecido)

Rodrigues,JK.. **Marcadores de estresse oxidativo em pacientes inférteis não obesas com Síndrome dos ovários policísticos e inférteis por fator tubário e/ou masculino e resultados de reprodução assistida.** Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto - SP, Brasil

Objetivos: As espécies reativas de oxigênio (ROS) são produtos intermediários da metabolização celular e em concentrações fisiológicas tem importância na modulação de processos fisiológicos do trato reprodutivo feminino. Todavia, o estresse oxidativo (EO) pode estar envolvido nas alterações da foliculogênese e na suposta piora da qualidade oocitária em pacientes com SOP. Os dados disponíveis acerca da associação entre EO, infertilidade e efeitos deletérios e/ou benéficos sobre a qualidade oocitária, fertilização, qualidade embrionária e o sucesso em Reprodução assistida (RA) são inconsistentes e conflitantes. É possível que os distintos fenótipos de pacientes com SOP apresentem diferenças relacionadas à qualidade oocitária e resultados dos procedimentos de RA, contribuindo para as controvérsias encontradas na literatura. Neste sentido, nosso objetivo primário foi comparar os níveis de cinco marcadores de EO entre pacientes inférteis não obesas com SOP e inférteis por fator tubário e/ou masculino (Controle) no soro, durante a fase folicular precoce do ciclo que antecedeu a estimulação ovariana, após bloqueio hipofisário, e ao longo da estimulação com gonadotrofinas e no fluido folicular. Como objetivo secundário comparamos os resultados de RA entre os grupos.

Metodologia: Estudo prospectivo, no qual foram consecutivamente incluídas setenta de duas pacientes inférteis (66 ciclos de 57 pacientes com infertilidade por fator tubário e/ou masculino e 16 ciclos de 15 pacientes com SOP) submetidas à estimulação ovariana controlada para a realização de injeção intracitoplasmática do espermatozóide (ICSI). Foi realizada coleta de sangue periférico na fase folicular precoce do ciclo menstrual prévio à

estimulação ovariana (D1), após bloqueio hipofisário com agonista do GnRH (D2) e ao longo da estimulação com gonadotrofinas (no dia da administração da gonadotrofina coriônica humana-hCG – D3 e no dia da captação oocitária – D4), e de fluido folicular (FF). Foram analisados os níveis de malondialdeído (MDA), hidroperóxidos (FOX), produtos de oxidação protéica (AOPP), glutathione e vitamina E, pela leitura da absorbância em espectrofotômetro e por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Foram avaliados a resposta à estimulação ovariana e os resultados de ICSI nos dois grupos.

Resultados: Os níveis séricos de MDA foram significativamente maiores na fase folicular precoce do ciclo que antecedeu a estimulação ovariana nas pacientes do grupo SOP em relação ao controle (SOP - $27,9 \pm 8,9 \mu\text{mol/g pt}$; Controle - $22,6 \pm 9,0 \mu\text{mol/g pt}$). No grupo Controle observou-se aumento significativo dos níveis séricos de MDA após bloqueio hipofisário com gonadotrofinas (D2), quando comparados aos níveis em D1, e em D2 quando comparados com os níveis no dia da captação oocitária (D4). Os níveis de AOPP foram mais elevados em D2, D3 e D4 em relação a D1, enquanto os níveis de FOX foram significativamente menores em D2, D3 e D4 em relação a D1. No grupo SOP não se observou diferença significativa entre os níveis séricos destes marcadores de estresse oxidativo após bloqueio hipofisário com agonista do GnRH e durante a estimulação ovariana, quando comparados aos obtidos no ciclo não estimulado. Os níveis de MDA foram mais elevados no grupo SOP em comparação ao grupo Controle em D3 e D4. Não identificamos diferença significativa nos níveis foliculares dos cinco marcadores de estresse oxidativo e nos resultados de RA entre os grupos analisados.

Conclusões: Evidenciamos níveis significativamente maiores de MDA no soro de pacientes inférteis não obesas com SOP comparadas a mulheres com infertilidade por fatores tubário e/ou masculino, em ciclos não estimulados, sugerindo a presença de estresse oxidativo sistêmico. Observamos maiores níveis séricos de MDA nas pacientes com SOP comparadas

às controles também durante a estimulação ovariana com gonadotrofinas. Todavia, neste grupo, não houve variação significativa dos valores séricos dos cinco marcadores de estresse oxidativo após bloqueio hipofisário e durante a estimulação ovariana. No grupo infértil por causa tubária e/ou masculina, evidenciamos aumento significativo da peroxidação lipídica e dano oxidativo às proteínas, assim como redução dos níveis de hidroperóxidos, após bloqueio hipofisário com gonadotrofinas e durante a estimulação ovariana, sugerindo associação positiva entre estimulação ovariana e estresse oxidativo. Não observamos diferença entre os grupos em relação aos marcadores de estresse oxidativo no fluido folicular e resultados de RA, sugerindo que neste grupo específico de pacientes com SOP, não haja estresse oxidativo ovariano e piora da qualidade oocitária. As interpretações acerca da influência do estresse oxidativo sobre os resultados de RA, assim como suas potenciais implicações reprodutivas precisam ser mais bem avaliadas.

Palavras-chave: Estresse oxidativo, infertilidade feminina, resposta à estimulação ovariana, peroxidação lipídica, glutathione, vitamina E, resultados de RA, SOP

Rodrigues,JK.. **Oxidative stress markers in non-obese infertile patients with polycystic ovary syndrome and with infertility due to tubal and/or male factor, and results of assisted reproduction.** Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto - SP, Brasil

Objectives: Reactive oxygen species (ROS) are intermediate products of cell metabolism which, at physiological concentrations, play an important role in the modulation of physiological processes of the female reproductive tract. However, oxidative stress (OS) may be involved in changes in folliculogenesis and in the presumed worse oocyte quality in patients with polycystic ovary syndrome (POS). Available data about the association of OS, infertility and deleterious and/or beneficial effects on oocyte quality, fertilization, embryo quality and successful assisted reproduction are inconsistent and conflicting. It is possible that the different phenotypes of patients with POS differ in terms of oocyte quality and of the results of AR procedures, contributing to the controversies observed in the literature. In this respect, our primary objective was to compare the serum levels of five OS markers between non-obese infertile patients with POS and patients with infertility due to tubal and/or male factor (control) during the early follicular phase of the cycle preceding ovarian stimulation, after pituitary blockade, throughout stimulation with gonadotropins, and in follicular fluid. A secondary objective was to compare AR results between groups.

Methodology: A prospective study was conducted on 72 consecutive infertile patients (66 cycles of 57 patients with infertility due to tubal and/or male factor and 16 cycles of 15 patients with POS) submitted to control ovarian stimulation for intracytoplasmic sperm injection (ICSI). Peripheral blood was collected during the early follicular phase of the menstrual cycle preceding ovarian stimulation (D1), after pituitary blockade with a GnRH agonist (D2) and throughout stimulation with gonadotropins (on the day of the administration

of human chorionic gonadotropin (hCG) – D3, and on the day of oocyte retrieval – D4), together with follicular fluid (FF) samples. Malondialdehyde (MDA), hydroperoxide (FOX), advanced oxidation protein products (AOPP), glutathione and vitamin E levels were determined by absorbance readings with a spectrophotometer and by high performance liquid chromatography. The response to ovarian stimulation and the results of ICSI were evaluated in both groups.

Results: Serum MDA levels were significantly higher during the early follicular phase of the cycle preceding ovarian stimulation in the patients with POS compared to control (POS: $-27.9 \pm 8.9 \mu\text{mol/g pt}$; Control: $-22.6 \pm 9.0 \mu\text{mol/g pt}$). A significant increase in serum MDA levels was observed in the control group after pituitary blockade with gonadotropins (D2) compared to the levels on D1, and to the levels on D2 compared to the levels on the day of oocyte retrieval (D4). AOPP levels were higher on D2, D3 and D4 compared to D1, whereas FOX levels were significantly lower on D2, D3 and D4 compared to D1. No significant differences in the serum levels of these OS markers were detected in the POS group after pituitary blockade with a GnRH agonist or during ovarian stimulation when compared to those detected in the non-stimulated cycle. MDA levels were higher in the POS group compared to control on D3 and D4. No significant differences in the follicular levels of the five OS markers or in the AR results were detected between groups.

Conclusions: Significantly higher MDA levels were observed in the serum of non-obese infertile women with POS compared to women with infertility due to tubal and/or male factors in non-stimulated cycles, suggesting the presence of systemic OS. We observed higher serum MDA levels in patients with OS compared to control also during ovarian stimulation with gonadotropins. However, in this group there was no significant variation in the serum values of the five markers of OS after pituitary blockade or during ovarian stimulation. In the group with infertility due to tubal and/or male factor, there was a significant increase in lipid

peroxidation and oxidative damage to proteins, as well as a reduction of hydroxyperoxides after pituitary blockade with gonadotropins and during ovarian stimulation, suggesting a positive association between ovarian stimulation and OS. There were no differences between groups regarding OS markers in follicular fluid or AR results, suggesting that ovarian OS or worsened oocyte quality were not present in this specific group of patients with POS. The influence of OS on the results of AR, and its potential reproductive implications need to be better interpreted and evaluated.

Key-words: Oxidative stress, female infertility, response to ovarian stimulation, lipid peroxidation, glutathione, vitamin E, AR results, POS

Figura 1. Esquema das principais reações ocorridas durante o processo de peroxidação lipídicapág. 33

Figura 2. Esquema representativo da peroxidação lipídica, enfocando as principais substâncias formadas durante o processo e as metodologias disponíveis para a sua avaliação.....pág. 34

Figura 3. Esquema da reciclagem e manutenção dos níveis de vitamina E no organismo.....pág. 37

Tabela 1 - Comparação entre as variáveis demográficas, resposta à estimulação ovariana com gonadotrofinas e resultados de ICSI em pacientes Controle (fator tubário e/ou masculino de infertilidade) e Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP).....pág.66

Tabela 2 - Marcadores séricos de estresse oxidativo na fase folicular precoce do ciclo que antecedeu a estimulação ovariana com gonadotrofinas em pacientes com infertilidade de causa tubária e/ou masculina (Grupo Controle) e Síndrome dos Ovários Policísticos).....pág.68

Tabela 3 - Marcadores séricos de estresse oxidativo na fase folicular precoce do ciclo que antecedeu a estimulação ovariana (D1), no dia de início da estimulação ovariana (D2), no dia da administração da gonadotrofina coriônica humana (D3) e no dia da captação oocitária (D4) de pacientes com infertilidade por fator tubário e/ou masculino.....pág 69

Tabela 4 - Marcadores séricos de estresse oxidativo na fase folicular precoce do ciclo que antecedeu a estimulação ovariana (D1), no dia de início da estimulação ovariana (D2), no dia da administração da gonadotrofina coriônica humana (D3) e no dia da captação oocitária (D4) de pacientes inférteis com Síndrome dos ovários policísticos.....pág.70

Tabela 5 - Marcadores séricos de estresse oxidativo na fase folicular precoce do ciclo que antecedeu a estimulação ovariana (D1), no dia de início da estimulação ovariana (D2), no dia da administração da gondotrofina coriônica humana (D3) e no dia da captação oocitária (D4)

de pacientes com infertilidade por fator tubário e/ou masculino (Grupo Controle) e com Síndrome dos ovários policísticos.....pág 71

Tabela 6 - Comparação entre marcadores de estresse oxidativo no fluido folicular em pacientes com infertilidade por fator tubário e/ou masculino (Grupo Controle) e com Síndrome dos ovários policísticos.....pág 72

Tabela 7 - Comparação entre os valores de malondialdeído (MDA) no soro na fase folicular precoce do ciclo que antecedeu a estimulação ovariana (D1), no dia de início da estimulação (D2), no dia da administração da gonadotrofina coriônica humana (D3) e no dia da captação oocitária (D4) e no fluido folicular entre pacientes dos grupos Controle e SOP.....pág 73

Tabela 8 - Comparação entre os valores de produtos de oxidação protéica (AOPP) no soro na fase folicular precoce do ciclo que antecedeu a estimulação ovariana (D1), no dia de início da estimulação (D2), no dia da administração da gonadotrofina coriônica humana (D3) e no dia da captação oocitária (D4) e no fluido folicular entre pacientes dos grupos Controle e SOP.....pág 73

Tabela 9 - Comparação entre os valores de hidroperóxidos (FOX) no soro na fase folicular precoce do ciclo que antecedeu a estimulação ovariana (D1), no dia de início da estimulação (D2), no dia da administração da gonadotrofina coriônica humana (D3) e no dia da captação

oocitária (D4) e no fluido folicular entre pacientes dos grupos Controle e SOP.....pág 74

Tabela 10 - Comparação entre os valores de glutathiona (GSH) no soro na fase folicular precoce do ciclo que antecedeu a estimulação ovariana (D1), no dia de início da estimulação (D2), no dia da administração da gonadotrofina coriônica humana (D3) e no dia da captação oocitária (D4) e no fluido folicular entre pacientes dos grupos Controle e SOP.....pág 74

Tabela 11 - Comparação entre os valores de vitamina E no soro na fase folicular precoce do ciclo que antecedeu a estimulação ovariana (D1), no dia de início da estimulação (D2), no dia da administração da gonadotrofina coriônica humana (D3) e no dia da captação oocitária (D4) e no fluido folicular entre pacientes dos grupos Controle e SOP.....pág 75

Tabela 12 - Correlação entre os valores séricos dos marcadores de estresse oxidativo na fase folicular precoce do ciclo que antecedeu a estimulação ovariana e os níveis foliculares em pacientes com infertilidade por fator tubário e/ou masculino (Grupo Controle).....pág. 76

Tabela 13 - Correlação entre os valores séricos dos marcadores de estresse oxidativo na fase folicular precoce do ciclo que antecedeu a estimulação ovariana e os níveis foliculares em pacientes inférteis com Síndrome dos ovários policísticos.....pág 77

AOPP – Produtos de oxidação protéica

CAT – Capacidade antioxidante total

FOX – Hidroperóxidos

FSH – Hormônio folículo estimulante

GSH – Glutathiona

LH – Hormônio luteinizante

MDA – Malondialdeído

PBS – Tampão Fosfato salino

RA – Reprodução assistida

RNOS – Espécies reativas de nitrogênio

ROS – Espécies reativas de oxigênio

SOP – Síndrome dos ovários policísticos

TRA – Técnicas de reprodução assistida

RESUMO	12
ABSTRACT	16
1. INTRODUÇÃO	29
2. JUSTIFICATIVA	49
3. OBJETIVOS	52
3.1. Objetivos Primários.....	53
3.2. Objetivos Secundários.....	53
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS	54
4.1. Análise Estatística	63
5. RESULTADOS	64
6. DISCUSSÃO	78
7. CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

1. Introdução

As espécies reativas, substâncias que possuem elétrons desemparelhados e alta capacidade de reagir com outros substratos, são formadas como produtos intermediários da metabolização celular e em concentrações fisiológicas parecem ter importância na modulação de inúmeros processos fisiológicos do trato reprodutivo feminino. O papel das Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) no trato reprodutivo masculino já é objeto de extensa pesquisa ao redor do mundo. Por outro lado, dispomos de dados escassos e controversos acerca do papel dos radicais livres no trato reprodutivo feminino. Baixas concentrações de ROS têm importância em processos fisiológicos do trato reprodutivo feminino, como a maturação oocitária, a atresia folicular, a função do corpo lúteo, a interação gamética, a fertilização, o desenvolvimento e a implantação embrionária, bem como o declínio da fertilidade relacionado à idade. Quando há um desequilíbrio entre os agentes pró-oxidantes (radicais livres) e os mecanismos antioxidantes de defesa do organismo, pode ocorrer o estresse oxidativo, que tem sido envolvido na etiopatogênese da Síndrome dos ovários policísticos (SOP) e da infertilidade de causa tubária, tubo-peritoneal e sem causa aparente. Os fluidos peritoneais, foliculares e das hidrossalpinges são microambientes reprodutivos, que abrigam gametas, zigotos e embriões por tempo variável. Alterações em sua composição química podem ter efeitos adversos nos processos reprodutivos, sendo que a presença de ROS e antioxidantes já foi demonstrada nestes microambientes (AGARWAL et al., 2005a, b; 2008).

Os mecanismos que envolvem a produção e ação dos radicais livres, bem como a prevenção da gênese do estresse oxidativo por antioxidantes endógenos, em processos fisiológicos e patológicos do sistema reprodutivo feminino, ainda necessitam de maior elucidação. O conhecimento do balanço oxidante-antioxidante, tanto em situações fisiológicas, como nas variadas doenças relacionadas à infertilidade humana, com destaque para a SOP, poderá contribuir para o melhor entendimento da fisiopatologia das mesmas e o delineamento de novas estratégias visando o combate ao estresse oxidativo e a conseqüente

melhora potencial da fertilidade natural ou após a realização de técnicas de reprodução assistida (RA).

O equilíbrio oxidativo do trato reprodutivo depende de alguns tipos de radicais livres e dos diferentes mecanismos antioxidantes que os neutralizam. Existem dois grandes grupos de radicais livres: espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNOS). Devido a sua instabilidade e sua alta reatividade, precisam adquirir elétrons de algum substrato, levando à oxidação de componentes como ácidos nucleicos, lipídios, proteínas, carboidratos, tióis, cofatores enzimáticos ou qualquer molécula em sua volta para se tornarem estáveis, causando uma reação em cadeia que pode culminar em dano celular e tecidual (AGARWAL et al., 2005 a; LIMA, ABDALLA, 2001).

1.1. Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

As ROS têm funções fisiológicas e patológicas no trato reprodutivo feminino. Fisiologicamente estão envolvidas em funções reprodutivas como a maturação oocitária, a esteroidogênese ovariana, a função lútea, a luteólise e a interação gamética, além do metabolismo embrionário. Os distúrbios de fertilidade relacionados às ROS apresentam fatores etiopatogênicos comuns (AGARWAL et al., 2005a; b, 2008). Estas espécies reativas são geradas a partir de reações orgânicas enzimáticas ou não-enzimáticas. As reações biológicas via transferência de elétrons ou via oxigenase, que utilizam moléculas de oxigênio (O_2) como substrato, geram grande quantidade de ROS. Como a cadeia respiratória mitocondrial é o principal sistema de consumo de O_2 celular, a maior parte de ROS é produzida por este sistema sob condições fisiológicas (FUJII et al., 2005). O radical superóxido (O_2^-) é produzido quando há vazamento da cadeia de transporte de elétrons por

redução ($O_2 + e^- \rightarrow O_2^-$) (AGARWAL et al., 2005a). A dismutação de superóxidos e algumas enzimas oxidases podem gerar diretamente peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ($2 O_2^- + 2 H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$) (AGARWAL et al., 2005a), que também pode ser gerado pela redução do O_2^- ($O_2^- + e^- + 2 H^+ \rightarrow H_2O_2$) (BABIOR, 1997). O íon hidroxila (OH^-) é formado da aquisição de 1 elétron pelo H_2O_2 ($H_2O_2 + e^- + H^+ \rightarrow OH + H_2O$) (BABIOR, 1997) e este radical é altamente reativo e pode modificar purinas e pirimidinas causando quebras no feixe de DNA (AGARWAL et al., 2005a).

As ROS estão envolvidas em eventos bioquímicos como a peroxidação lipídica, onde cascatas de reações podem levar a dano oxidativo nos lipídios insaturados em membranas, levando à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, em condições extremas, à morte celular (LIMA, ABDALLA, 2001). Nos sistemas biológicos a peroxidação lipídica consiste na incorporação de oxigênio molecular a um ácido graxo poliinsaturado para produzir um hidroperóxido lipídico (LOOH) como produto primário inicial, e pode ocorrer principalmente por duas vias: uma via enzimática envolvendo as ciclooxigenases e lipoxigenases; e a peroxidação não enzimática, que envolve a participação de ROS, RNS, metais de transição e outros radicais livres (AL MEHDI et al., 1993; PORTER et al., 1995. apud LIMA, ABDALLA, 2001). Este processo pode ser dividido em três etapas: iniciação, propagação e terminação (Figura 1). A fase de iniciação representa o início da peroxidação, em que o ácido graxo poliinsaturado sofre ataque de uma espécie que é suficientemente reativa para abstrair um átomo de hidrogênio a partir de um grupo metileno ($-CH_2-$), formando um radical de carbono. Este radical é estabilizado por um rearranjo molecular para formar um dieno conjugado, ou seja, duas duplas ligações intercaladas por uma ligação simples (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1989). Em meio aeróbio, o radical alquila inicialmente formado se combina com o oxigênio formando o radical peroxila, o qual pode abstrair um hidrogênio alílico de um outro ácido graxo, gerando outro radical de carbono

e promovendo a etapa de propagação. A reação do radical peroxila com o átomo de hidrogênio abstraído gera um hidroperóxido lipídico (LOOH). Estes hidroperóxidos formados são prejudiciais para a estrutura e função das membranas celulares, como para estruturas protéicas, como receptores e enzimas (KATSIKI, MANES, 2009). Peróxidos cíclicos também podem ser formados, quando o radical peroxila reage com uma dupla ligação na mesma cadeia de ácido graxo, o que também pode propagar a peroxidação lipídica (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1989).

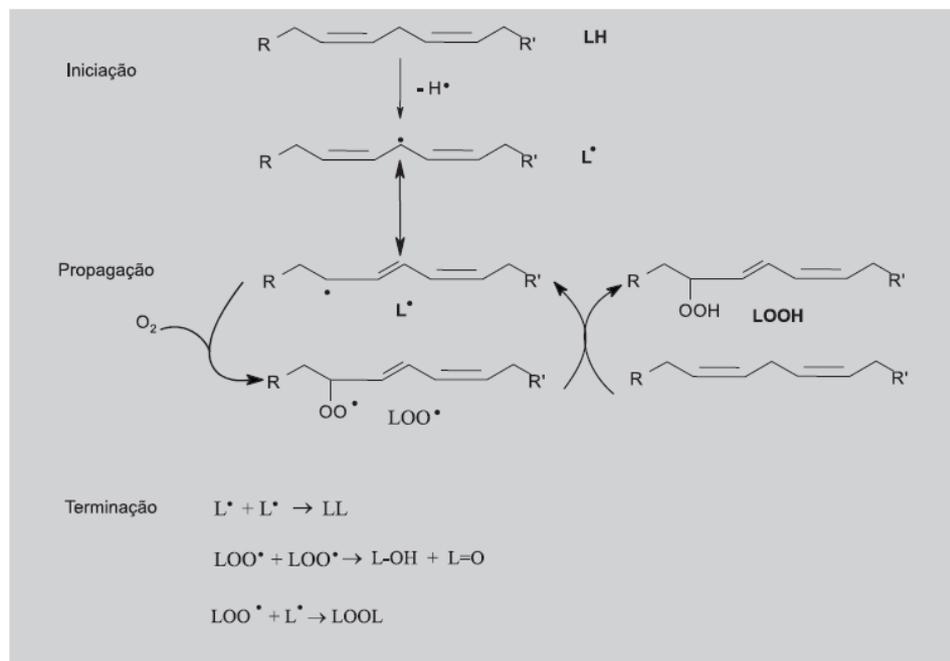


Figura 1. Esquema das principais reações ocorridas durante o processo de peroxidação lipídica (Lima & Abdalla, 2001).

A terceira e última etapa da reação, a fase de terminação, dá-se pela aniquilação dos radicais formados originando produtos não radiculares (GARDNER, 1989; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1989). Os radicais peroxila e alcóxila também podem sofrer dismutação ou clivagem formando aldeídos, como o malondialdeído (MDA) (Figura 2).

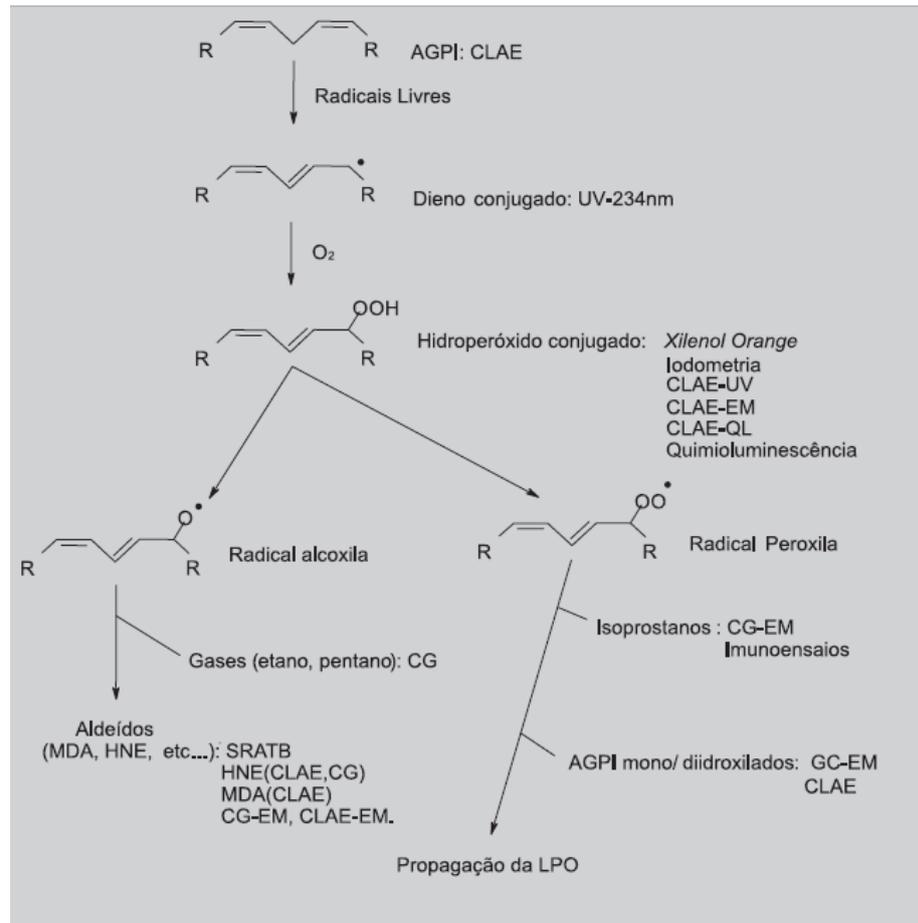


Figura 2. Esquema representativo da peroxidação lipídica, enfocando as principais substâncias formadas durante o processo e as metodologias disponíveis para a sua avaliação (Lima & Abdalla, 2001).

As ROS, além de gerarem dano a lipídios, podem levar a dano protéico com extensas lesões tissulares e alterações no DNA. Proteínas oxidadas são mais sensíveis à proteólise e o aumento destas proteínas oxidadas e dos produtos de sua oxidação pode ser responsável pela perda de funções bioquímicas e fisiológicas (HABER, WEISS, 1934 apud ZADÁK et al., 2009). O processo de estresse oxidativo que leva a formação de produtos de oxidação protéica (AOPP) envolve a ação de oxidantes clorados, principalmente ácido hipocloroso e cloraminas, produzidas por mieloperoxidases em neutrófilos ativados. Acredita-se que os AOPP possam induzir citocinas inflamatórias e moléculas adesivas (KALOUSOVÁ et al., 2002), de modo que seus níveis estão relacionados com marcadores de ativação de monócitos e resposta inflamatória (KELLY et al., 2002; WITKO-SARSAT et al., 1998).

1.2. Espécies Reativas de Nitrogênio (RNOS)

As mais comuns são derivadas do Óxido Nítrico (NO) e do dióxido de nitrogênio. O NO é sintetizado durante a conversão enzimática de L-arginina a L-citrulina pela óxido nítrico sintetase (NOS) que é codificada por 3 genes diferentes: nNOS (neuronal), iNOS (induzível) e eNOS (endotelial), utilizando a NADPH como doador de elétrons. As nNOS e eNOS são constitutivas e responsáveis pela liberação contínua de óxido nítrico. A iNOS está presente em fagócitos mononucleares e é ativada por citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1 e TNF- α , e lipopolissacarídeos em resposta a estímulos imunológicos (AGARWAL et al., 2005 a). A NOS endotelial é expressa em células da teca, granulosa e na superfície do oócito durante o desenvolvimento folicular. Sua expressão está aumentada no pico de hormônio luteinizante ou de gonadotrofina coriônica humana (FUJII et al., 2005).

Admite-se que os efeitos do óxido nítrico são mediados pelo GMP cíclico (GMPc) como segundo mensageiro ou pela geração de ROS após interação com radicais superóxido. Como efetor imune final, o óxido nítrico produzido pela NOS induzível, destrói patógenos e células anormais. Porém, com um elétron não pareado, o óxido nítrico torna-se um radical livre altamente reativo, danifica proteínas, carboidratos, nucleotídeos, lipídios e, juntamente com outros mediadores inflamatórios, resulta em dano celular e tecidual, inflamação de baixo grau e adesões. Já que uma relativa fração de óxido nítrico é convertida em RNOS altamente reativo, como o peroxinitrito, por reação com O_2^- ($O_2^- + NO \rightarrow OONO^- + H^+ \rightarrow NO_2^+ + OH^-$), o estresse oxidativo pela produção de espécies reativas do nitrogênio (estresse nitrosativo) ocorre simultaneamente com a produção de ROS (AGARWAL et al., 2005 a; BABIOR, 1997; FUJII et al., 2005).

1.3. Antioxidantes

Em condições normais, todos os organismos têm mecanismos enzimáticos e não enzimáticos capazes de neutralizar as espécies pró-oxidantes e/ou reparar os danos causados pelas espécies reativas, convertendo-as em H₂O, para prevenir a sua superprodução. Muitos antioxidantes de baixo peso molecular como vitaminas e polifenóis estão normalmente presentes em nutrientes, embora a neutralização enzimática das espécies reativas seja o mecanismo mais eficiente (AGARWAL et al., 2005 a, b; FUJII et al., 2005).

1.3.1. Antioxidantes não-enzimáticos

Também conhecidos como antioxidantes sintéticos ou suplementos dietéticos, este grupo influencia de maneira exógena o sistema de defesa antioxidante do organismo. Os mais comuns são: Vitaminas C e E, selênio, zinco, taurina, hipotaurina, glutathiona, beta-caroteno e caroteno.

A vitamina C é um antioxidante que tanto interrompe a propagação do processo peroxidativo, como ajuda a reciclar a vitamina E e a glutathiona oxidada (GSSG). A vitamina E pode tanto bloquear o início da peroxidação lipídica, como inibir, primariamente a sua etapa de propagação (BORNODEN, 1994; ZINGG, 2007). Estudos mostram que a depleção nutricional de vitamina E é responsável pela diminuição da capacidade de combater as espécies reativas de oxigênio (ZADÁK et al., 2009).

A glutathiona está presente no oócito e no fluido tubário e desempenha importante função permissiva para o desenvolvimento do zigoto além do estágio de duas células, até os estágios de mórula e de blastocisto (AGARWAL et al., 2005 a, b). A glutathiona é o principal componente sulfidril não protéico em células de mamíferos e tem papel importante na

proteção celular ao estresse oxidativo, atuando na neutralização de peróxidos (MEISTER, 1983), além de participar na reciclagem e manutenção dos níveis fisiológicos da vitamina E, auxiliando na eliminação indireta do tocoferol oxidado (NWOSE et al., 2008; SUKKA, 2004) (Figura 3).

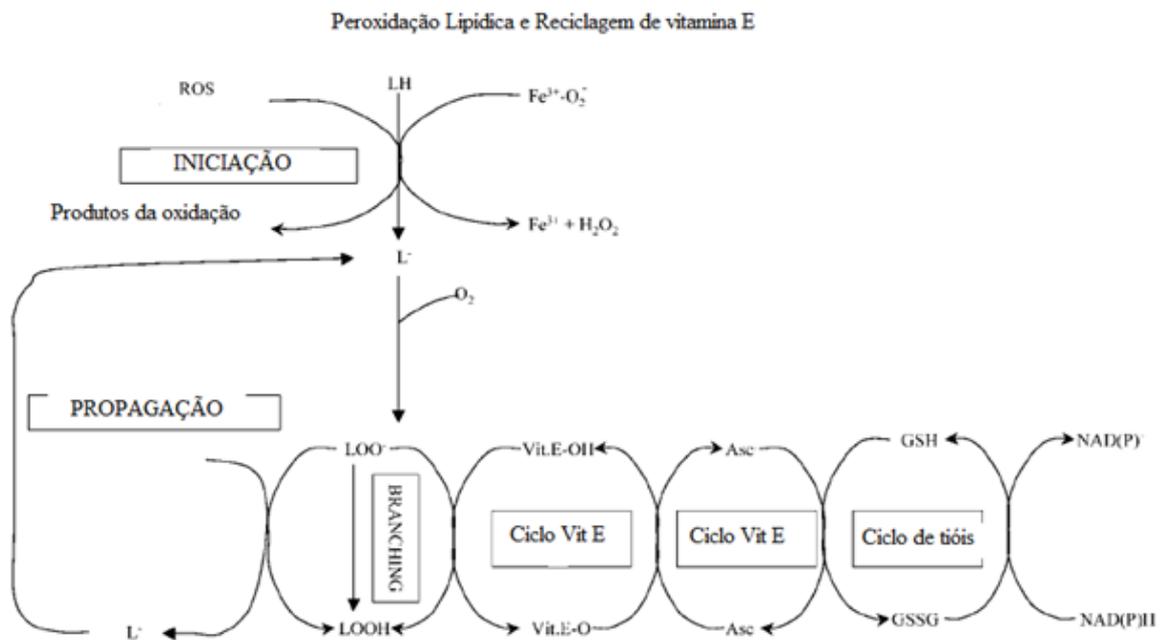


Figura 3. Esquema da reciclagem e manutenção dos níveis de vitamina E no organismo (modificado de Sikka, 2004).

A síntese de glutatona aumenta durante todo o processo de desenvolvimento e maturação oocitária até o estágio de folículo peri-ovulatório (PERREAULT et al, 1984). Após a fertilização, a glutatona participa no processo de descondensação espermática paralelamente ao processo de ativação oocitária, bem como na transformação da cabeça espermatozóide no pronúcleo masculino (CALVIN et al, 1986; PERREAULT et al, 1984, 1988; YOSHIDA, 1993). Estudo realizado com oócitos bovinos demonstrou importante papel das células do *cumulus oophorus* durante o processo de maturação *in vitro*. Através das *gap junctions*, as células do *cumulus* mediarão a síntese de glutatona pelos oócitos, enzima

fundamental no processo de maturação citoplasmática e nuclear oocitária. Essa relação entre as células do *cumulus* e os oócitos ocorre aparentemente mediado pela presença de *gap-junctions* (DE MATOS et al, 1997).

1.3.2. Antioxidantes enzimáticos

As defesas enzimáticas responsáveis pela neutralização de espécies reativas do oxigênio são representadas, principalmente, pela superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPx), dependente e independente de selênio, e glutathione redutase (GR) (FUJII et al., 2005):

- **Superóxido dismutase (SOD)**

O ânion superóxido é produzido pela redução de um elétron de uma molécula de oxigênio, o que inicia a reação em cadeia. Acredita-se que o papel da SOD na conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio ($2 O_2^- + 2 H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$) seja fundamental nas reações antioxidativas. Três isoenzimas são produzidas em mamíferos (FUJII et al., 2005): 1. CuZn-SOD (codificada pela SOD1), que é amplamente citosólica; 2. Mn-SOD (codificada pela SOD2), que é uma isoforma mitocondrial; 3. EC-SOD (codificada pela SOD3), que é a forma extracelular, estruturalmente similar a CuZn-SOD.

Um das conseqüências observadas em camundongos com deficiência de SOD1 é a infertilidade, sugerindo um potencial papel desta enzima na fertilidade feminina. A SOD2 é induzida sob várias condições de estresse oxidativo em processos inflamatórios. A EC-SOD está presente em altos níveis no epidídimo, túbulos seminíferos e nos pulmões (FUJII et al., 2005).

- **Peroxidases**

A catalase neutraliza exclusivamente o peróxido de hidrogênio e não necessita de doador de elétrons ($2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$). Esta enzima participa de funções hepáticas, mas sua função específica no trato genital ainda não foi elucidada (FUJII et al., 2005).

A glutathiona peroxidase (GPx) tem papel fundamental na neutralização de peróxidos, utilizando a forma reduzida da glutathiona (GSH) como doadora de elétrons ($2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GSSG} + 2 \text{H}_2\text{O}$). Pelo menos quatro isoenzimas de GPx dependentes de selênio são produzidas em mamíferos (FUJII et al., 2005): 1. A forma citosólica (codificada pelo GPx1), que é amplamente distribuída nos tecidos e tem sido a mais extensivamente investigada, apesar de camundongos *knockouts* para GPx1 não mostrarem alteração no fenótipo, incluindo na capacidade reprodutiva; 2. A forma gastrointestinal (codificada pelo GPx2), sem função reprodutiva específica identificada; 3. A forma presente no plasma e no fluido epididimal (codificada pelo GPx3); 4. A PhGPx4 (codificada pelo GPx4), isoforma que neutraliza especificamente o hidroperóxido fosfolipídico, expressa em altos níveis nos testículos. Suspeita-se que anomalias na PhGPx4 possam estar associadas à infertilidade masculina desencadeada por deficiência de selênio, o que precisa ser melhor avaliado.

Na reação promovida pela glutathiona peroxidase, a GSH sofre oxidação para GSSG. A regeneração de GSH é, conseqüentemente, de fundamental importância na capacidade das células em combater a exposição a metabólitos oxidantes. Seus níveis são mantidos por síntese *de novo* catalisada por 2 enzimas, γ -glutamilcisteína sintetase (γ -GCS) e glutathiona sintetase (GS). A redução de GSSG é catalisada pela glutathiona redutase (GR) usando NADPH como doador de elétrons ($2 \text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow 2\text{GSH} + \text{NADP}^+$). A GR é inibida por compostos produzidos em resposta ao estresse nitrosativo, como a

nitrosoglutathiona. No sistema reprodutivo feminino, a GSH participa reduzindo o estresse oxidativo por interação direta com ROS, por meio do sistema glutathiona redox, ou doando elétrons a GPx (FUJII et al., 2005).

1.4. Estresse oxidativo e resultados das Técnicas de Reprodução Assistida (TRA)

Marcadores de estresse oxidativo foram localizados no fluido folicular, no meio de preparo de espermatozóides e no meio de cultivo de embriões de pacientes que se submeteram a fertilização *in vitro* (FIV) / transferência embrionária (TE) (AGARWAL et al, 2003). As ROS podem ser produzidas pelos gametas, células do *cumulus*, células inflamatórias, entre outros.

Dados previamente citados sugerem que a produção de ROS é notadamente maior em embriões cultivados *in vitro*, do que naqueles produzidos *in vivo*. A maior produção de ROS tem sido atribuída a alguns fatores presentes quando do emprego de TRA. A centrifugação de espermatozóides imaturos durante o preparo do sêmen, a falta de plasma seminal rico em antioxidantes e a contaminação por leucócitos são algumas fontes de radicais livres. Da mesma forma, as células do *cumulus*, os oócitos e embriões também contribuem para o aumento dos níveis de ROS, produzidas pelo seu metabolismo e pelo possível déficit de mecanismos antioxidantes. Todavia, o mais importante fator externo que pode afetar a viabilidade de gametas e embriões *in vitro* parece ser a pressão de oxigênio (pO_2), mais elevada do que a presente *in vivo*.

Durante a Injeção Intra-Citoplasmática de Espermatozóides (ICSI) o tempo de incubação dos complexos *cumulus-oophorus* é mais curto que na FIV, diminuindo a sua exposição a pO_2 . A incubação é iniciada após o desnudamento das células do *cumulus* que são

outra fonte potencial de produção de ROS. O tempo de contato entre espermatozoides e oócitos também é minimizado (SALEH et al, 2003).

Pelo acima exposto, parece claro que a micromanipulação e o cultivo *in vitro* de gametas e de embriões possam favorecer o risco de exposição dos mesmos a níveis supra-fisiológicos de ROS. Se o aumento da produção de ROS não for contrabalançado pelo aumento das defesas antioxidantes, poderá ocorrer o estresse oxidativo, ao qual têm sido atribuídos danos a lipídios, proteínas e DNA, e, possivelmente, comprometimento dos resultados das TRA. Todavia, têm sido identificadas algumas condições potencialmente modificáveis, presentes quando do emprego de TRA, passíveis de minimizar os efeitos tóxicos das ROS, como: a escolha e a adição de suplementos antioxidantes ao meio de cultura, a redução do tempo de manipulação oocitária e a diminuição da exposição a meios que possam favorecer a produção de ROS (SALEH et al, 2003).

O microambiente folicular tem um papel crucial na determinação da qualidade oocitária, que se reflete nas taxas de fertilização e na qualidade embrionária. Convém ressaltarmos que não dispomos de estudos que tenham avaliado os níveis fisiológicos de espécies reativas do oxigênio e de antioxidantes no fluido folicular de mulheres normais férteis em ciclos não estimulados com gonadotrofinas exógenas. Desta forma, não dispomos de dados acerca da potencial influência de níveis fisiológicos de ROS e antioxidantes no fluido folicular sobre a qualidade oocitária e, conseqüentemente, sobre a qualidade embrionária e o sucesso da gestação subsequente. Os dados disponíveis acerca dos efeitos deletérios e/ ou benéficos das ROS sobre a qualidade oocitária, taxa de fertilização, qualidade embrionária e outros marcadores do sucesso das TRA são inconsistentes e conflitantes. Apesar de alguns autores terem recentemente demonstrado que elevados níveis de ROS no fluido folicular de mulheres inférteis submetidas a FIV/ TE associaram-se a redução do potencial de fertilização oocitário e aumento da produção de embriões de pior qualidade,

existem dados controversos. Diversas variáveis podem justificar as diferenças encontradas na literatura, entre elas os diferentes critérios de seleção das pacientes, os protocolos de estimulação ovariana utilizados, os diferentes marcadores e métodos utilizados para sua mensuração, características particulares dos diferentes laboratórios de FIV, entre tantos outros. Assim, certamente estudos com maiores casuísticas, metodologicamente bem delineados, serão cruciais para elucidarem o papel das ROS no fluido folicular na fisiologia reprodutiva e na etiopatogênese da infertilidade.

1.5. Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP), estresse oxidativo e resultados aos procedimentos de reprodução assistida

A síndrome dos ovários policísticos (SOP) é a endocrinopatia mais comum no menacme, acometendo 5-10% das mulheres em idade reprodutiva. É considerada uma síndrome de disfunção ovariana, cujas principais características incluem o hiperandrogenismo e a morfologia ovariana policística (CARMINA et al., 2006; EHRMANN, 2005; ROTTERDAM ESHRE/ASRM- SPONSORED PCOS CONSENSUS WORKSHOP GROUP, 2004). Todavia, há uma marcante heterogeneidade clínica entre as mulheres com SOP, sendo que as características mais comumente associadas como irregularidade menstrual, hirsutismo, acne, ovários com padrão policístico e obesidade não são uniformes, nem universais (ACIEN et al., 1999), gerando diferentes grupos fenotípicos.

Um dos mecanismos possivelmente envolvidos na alteração da foliculogênese observada na SOP consiste na diminuição da apoptose nos estágios iniciais do crescimento folicular, o que permitiria a um número maior de folículos desenvolver uma teca capaz de sintetizar andrógenos, levando à atresia folicular. Há relatos de que as espécies reativas do oxigênio são capazes de iniciar a cascata apoptótica nas células da granulosa humanas,

secundariamente na função mitocondrial, e de que os antioxidantes exerceriam um efeito anti-apoptótico em folículos pré-ovulatórios cultivados *in vitro* (ZHANG et al., 2006).

Existem dados evidenciando também que antioxidantes desempenham um importante papel tanto na síntese de colágeno, essencial para a construção da membrana basal ao longo do crescimento folicular, como na síntese de androgênio induzida pelo hormônio luteinizante. Os antioxidantes estão envolvidos na regulação da função das enzimas esteroidogênicas dependentes do citocromo P450. Tanto o ácido ascórbico, como a superóxido dismutase exercem efeitos inibitórios sobre a aromatase, enzima responsável pela conversão de andrógenos a estrógenos, o que poderia favorecer o acúmulo de androgênios no conteúdo folicular, propiciando a atresia folicular. Corroborando estes achados, Ferda Verit et al (2007) demonstraram que pacientes com SOP, resistentes ao citrato de clomifeno (CC), apresentam maiores níveis de capacidade antioxidante total (CAT) do que pacientes que ovularam com o CC. Estes autores mostraram que a CAT apresentou-se como melhor fator preditivo para a presença ou não de resposta á indução da ovulação com CC, encontrando-se significativamente mais elevada nas pacientes não respondedoras, reforçando o potencial efeito deletério do estresse oxidativo para a ovulação (FERDA VERIT et al., 2007). Contudo, estes autores não avaliaram os níveis de ROS, nem quais antioxidantes (enzimáticos ou não) seriam os responsáveis pela elevação da CAT, observada nestas pacientes.

É importante ressaltarmos que a elevação da CAT poderia ser decorrente tanto do aumento primário das defesas antioxidantes (não enzimáticas e/ou enzimáticas, por exemplo, secundariamente à maior expressão gênica e produção de enzimas antioxidantes em portadoras de SOP), como de uma resposta ao aumento da produção de ROS, sendo este último o evento primário. Até o presente momento, não dispomos de estudos que tenham avaliado o balanço oxidante/antioxidante em portadoras de SOP, seja em ciclos naturais, seja em ciclos estimulados com gonadotrofinas, que potencialmente poderiam alterar este

desequilíbrio oxidante/antioxidante. Assim, consideramos de suma importância tal análise, a partir da qual poderíamos efetivamente procurar avaliar a potencial associação entre o dito desbalanço oxidante/antioxidante e a etiopatogênese da doença e da infertilidade associada à mesma.

Nas pacientes com SOP com desejo de gestação, a indução farmacológica da ovulação constitui a opção de escolha no intuito de promover a mono-ovulação para ciclos naturais programados ou de inseminação intra-útero. O citrato de clomifeno geralmente é utilizado como droga de primeira linha com boas taxas cumulativas de nascidos vivos. Já as gonadotrofinas exógenas, por promoverem um risco maior de multiparidade e de ocorrência da Síndrome de hiperestimulação ovariana (SHO), são opções de segunda linha, geralmente sendo prescritas nos casos de resistência ao uso do citrato de clomifeno e/ou quando há outro fator de infertilidade associado. Dispomos ainda de outras estratégias visando a promoção de ciclos mono-ovulatórios, como a redução de peso e instituição de mudanças no estilo de vida, a utilização de agentes sensibilizadores à insulina (LORD et al., 2003) ou inibidores da aromatase (MITWALLY, CASPER, 2001) utilizados em associação com o citrato de clomifeno ou as gonadotrofinas ou, alternativamente, como drogas de primeira escolha, assim como a eletrocauterização laparoscópica dos ovários (FARQUHAR et al., 2001).

Adicionalmente à indução convencional da ovulação, as técnicas de reprodução assistida de alta complexidade, como a Fertilização *In Vitro* (FIV) e a Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóides (ICSI) estão sendo aplicadas cada vez mais neste grupo de pacientes como tratamento da infertilidade (HEIJNEN et al, 2006). A introdução destes procedimentos de reprodução assistida na prática clínica tem nos trazido a oportunidade de estudar os efeitos da presente afecção nos estágios específicos do processo reprodutivo, incluindo a foliculogênese, a fertilização, o desenvolvimento embrionário e a implantação. Porém, convém ressaltarmos que os resultados destes procedimentos em pacientes portadoras

de SOP são bastante conflitantes na literatura, aumentando ainda mais a dificuldade de compreensão dos mecanismos envolvidos no etiopatogênese da infertilidade relacionada a esta síndrome.

Desta forma, quando se analisam os dados disponíveis na literatura acerca dos resultados de FIV e ICSI em pacientes portadoras de SOP, evidencia-se que alguns autores observaram menores taxas de fertilização nas pacientes com esta afecção, comparativamente as que foram tratadas por fator tubário (HEIJNEN et al, 2006; MULDERIS et al, 2003; URMAN et al, 2004), enquanto outros não corroboraram estes resultados (HARDY et al., 1995). Por outro lado, a maioria dos autores é concordante em não constatar diferença entre as taxas de clivagem, de implantação, de gravidez clínica e de nascidos vivos, de pacientes portadoras desta causa de anovulação crônica e o grupo controle, constituído por pacientes com fator tubário como causa da infertilidade (ASHKENAZI et al, 1995; DOR et al., 1990; GROCHOWSKI et al., 1997; HARDY, 1995; HEIJNEN et al, 2006; HOMBURG et al, 1993; URMAN et al, 1992; URMAN et al, 2004). Discordância ocorreu também quando foram comparadas as taxas de abortamento entre as portadoras e as não portadoras de SOP. Apesar de alguns autores relatarem uma maior incidência de abortamento espontâneo (20 a 25%) nas pacientes com SOP (HOMBURG et al, 1999), significativamente superiores as das pacientes sem esta afecção (10 a 15%), outros não corroboram este achado, atribuindo as maiores taxas de abortamento à presença de obesidade e/ou outras variáveis mais freqüentes no grupo de pacientes com SOP (WANG et al., 2001).

Apesar da escassez e da falta de uniformidade entre os dados publicados, dados de uma metanálise, em que foram analisados nove estudos que compararam os resultados de FIV entre pacientes com SOP e controles (793 ciclos de FIV em 458 pacientes com SOP e 1116 ciclos no grupo controle), evidenciaram diferença significativa entre os grupos apenas em relação ao maior número de oócitos captados por ciclo, e às menores taxas de captação e de

fertilização nas pacientes com SOP, quando comparadas as grupo controle (HEIJNEN et al, 2006). Neste estudo, as taxas comparativas de abortamento entre os grupos não foram avaliadas, devido à escassez dos dados disponíveis nos estudos incluídos na análise, deixando margem a dúvidas quanto ao real impacto desta síndrome na gênese do abortamento espontâneo.

Assim como não há consenso quanto aos possíveis efeitos deletérios da SOP sobre os resultados dos tratamentos da infertilidade por meio dos procedimentos de reprodução assistida, também não existe um fator causal definido para tais repercussões, o que parece ser um importante obstáculo para o sucesso da terapia destas pacientes. Temos evidências de que a resposta exacerbada às gonadotrofinas exógenas administradas para a indução da ovulação, elevando a concentração de estrogênio e androgênio séricos, poderia alterar a receptividade uterina (VALBUENA et al, 1999; WANG et al, 2001). Por outro lado, as concentrações elevadas de hormônio luteinizante (LH) na fase folicular, interferindo na foliculogênese, poderiam resultar em oócitos de má qualidade (HOWLES et al., 1986; REGAN et al., 1990; STANGER, YOVICH, 1985). Desta forma, questiona-se o papel do comprometimento da receptividade endometrial e da qualidade oocitária na gênese dos efeitos deletérios desta síndrome sobre a fertilidade feminina (ASHKENAZI et al, 1995; GIUDICE et al., 2006; LUDWIG et al, 1999; MIYARA et al, 2003; PATEL et al., 2008; SENGOKU et al, 1997). Tanto o comprometimento endometrial, como o, da qualidade oocitária poderiam estar envolvidos na gênese das supostas maiores taxas de abortamento, relatadas por alguns autores. Hipotetizamos que o comprometimento da qualidade oocitária possa produzir redução nas taxas de fertilização e seja mediado, entre outros fatores, pelo estresse oxidativo. Estudos tem mostrado que o comprometimento da qualidade do endométrio pode estar associado ao aumento dos níveis de ROS em pacientes com SOP (PALACIO et al., 2006). Pacientes com disfunção ovulatória relacionada à SOP podem apresentar um processo autoimune associado á

infertilidade (SHANTI et al., 1999) e o dano oxidativo por meio da peroxidação lipídica pode afetar o sistema reprodutivo nestas pacientes, eventos evidenciados pela elevação de auto-anticorpos anti-endométrio e níveis séricos de MDA respectivamente (PALACIO et al., 2006).

A expressão fenotípica variável de anomalias reprodutivas e metabólicas nas pacientes com SOP pode levar a diferenças na competência oocitária para o desenvolvimento (FEDORCSÁK et al., 2001; HEIJNEN et al., 2006; PATEL et al., 2008; SAHU et al., 2008), definida como a capacidade do oócito em completar a meiose e possibilitar o desenvolvimento embrionário subsequente (FERREIRA et al., 2009). Desta forma, é possível que grupos fenotípicos distintos de pacientes com SOP apresentem diferenças relacionadas também à qualidade oocitária e resultados dos procedimentos de reprodução assistida, contribuindo para as controvérsias encontradas na literatura.

Questionamos assim um potencial papel do estresse oxidativo (EO), resultante do desequilíbrio entre os agentes pró-oxidantes (radicais livres) e os mecanismos antioxidantes de defesa do organismo, na etiopatogênese da Síndrome dos ovários policísticos (SOP), no comprometimento da qualidade oocitária (AGARWAL et al., 2008; APASSAMY et al., 2008; FUJII et al., 2005; NAVARRO et al., 2004; 2006; RUDER et al., 2008) e na piora dos resultados de procedimentos de Reprodução Assistida (RA) (APASSAMY et al., 2008; FERDA VERIT et al., 2007). Entre os principais alvos do estresse oxidativo encontramos o DNA, as proteínas, e os lipídeos. Os produtos de oxidação protéica (AOPPs) tem sido considerados novos marcadores de oxidação e dano à proteínas, podendo ser utilizados para estimar o dano oxidativo proteico (KELLY et al., 2002; WITKO-SARSAT et al., 1996). O malondialdeído (MDA) é um dos produtos finais da peroxidação lipídica (PL) e, por ser um produto estável, pode ser utilizado como medida cumulativa deste processo (CAMPOS PETEAN et al., 2008; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1989). Em contrapartida, a vitamina E, sobretudo na forma de α -tocoferol, pode tanto bloquear o início da peroxidação lipídica (PL),

como inibir, primariamente, a etapa de propagação da PL, sendo conhecida como um eficiente antioxidante (BORNODEN, 1994). A glutathiona (GSH), principal componente sulfidril não protéico, em células de mamíferos, desempenha um papel fundamental na neutralização de peróxidos e na proteção celular ao estresse oxidativo (DEMATOS, 2000). Este antioxidante está presente no oócito e no fluido tubário e participa nos processos de maturação oocitária, descondensação espermática, ativação oocitária e desempenha importante função permissiva para o desenvolvimento embrionário pré-implantação (AGARWAL et al., 2005 a,b; DEMATOS, 2000). Uma das atividades antioxidantes da glutathiona consiste em eliminar, indiretamente, o tocoferol oxidado (NWOSE et al.; 2008), importante para a reciclagem e manutenção de níveis fisiológicos de vitamina E, essenciais para o combate ao estresse oxidativo (NWOSE et al., 2008). A CAT tem sido utilizada com a finalidade de se avaliar o balanço antioxidante total, que é resultante das defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas, permitindo uma avaliação global deste processo (COSTA et al., 2006; EREL, 2004). Os hidroperóxidos são produtos primários da peroxidação lipídica (LIMA, ABDALLA, 2001) e seus níveis podem indicar indiretamente a atividade da SOD (KINGSLEY et al, 1998), além disso, são moléculas importantes nos mecanismos de sinalização celular (IMAI, 2004).

2. Justificativa

A oxidação é parte fundamental do metabolismo do corpo humano e os radicais livres são produzidos naturalmente por nosso organismo, porém também estão envolvidos em disfunções biológicas. A produção excessiva de espécies reativas pode cursar com o comprometimento de membranas celulares, dano protéico e enzimático, alterações na estrutura do DNA e morte celular (BARREIROS et al, 2006; PLESSIS et al, 2008).

Níveis fisiológicos de espécies reativas possuem um papel fundamental no processo reprodutivo, participando da interação oócito-espermatozóide, na implantação e no desenvolvimento embrionário pré e pós implantação (AGARWAL et al, 2008; NAVARRO et al., 2004; 2006; SAKKAS et al, 1995). Evidências tem apontado que o desequilíbrio entre a formação de radicais oxidantes e a produção de moléculas antioxidantes tem afetado o sucesso quanto a obtenção de gestação em tratamentos de RA (AGARWAL et al, 2006; GUERIN et al, 2001; GOTO et al, 1993).

Há dados controversos sugerindo que a SOP está relacionada à presença de processo inflamatório e estresse oxidativo sistêmico (PALACIO et al., 2006; SHANTI et al., 1999). Todavia, até o presente momento não dispomos de estudos que tenham avaliado o balanço oxidante/antioxidante em portadoras de SOP, seja em ciclos naturais, seja em ciclos estimulados com gonadotrofinas, que, potencialmente, poderiam alterar este equilíbrio oxidante/antioxidante. Consideramos de suma importância tal análise, a partir da qual poderíamos efetivamente procurar avaliar a potencial associação entre o desbalanço oxidante/antioxidante e a etiopatogênese da doença e da infertilidade associada à mesma. Hipotetizamos que caso haja estresse oxidativo detectável sistemicamente em portadoras desta síndrome, isto poderia contribuir para elucidar os mecanismos envolvidos nas anomalias da foliculogênese, como na piora da qualidade oocitária e nas taxas de fertilização após procedimentos de reprodução assistida em portadoras de SOP.

Como há uma grande heterogeneidade clínica e metabólica entre as portadoras de SOP, passíveis de interferir tanto no balanço oxidativo/antioxidante, como na aquisição da competência oocitária para o desenvolvimento embrionário, propomos analisar, inicialmente, pacientes com SOP não obesas, quanto aos objetivos descritos a seguir.

3. Objetivos

3.1. Objetivo principal

Em virtude da potencial influência do estresse oxidativo na etiopatogênese da infertilidade relacionada à SOP, foi proposto:

1. Comparar a peroxidação lipídica, aferida pela dosagem de malondialdeído (MDA) e hidroperóxidos (FOX), o dano oxidativo protéico, por meio da análise dos níveis dos produtos de oxidação protéica (AOPP), e o status antioxidante, por meio da dosagem dos níveis de glutathiona (GSH) e vitamina E no soro de pacientes inférteis com SOP e infertilidade de causa tubária e/ou masculina (grupo controle), na fase folicular precoce do ciclo imediatamente antes da estimulação ovariana com gonadotrofinas.
2. Comparar a potencial influência da estimulação ovariana com gonadotrofinas sobre os níveis séricos de MDA, FOX, AOPP, GSH e vitamina E entre pacientes inférteis com SOP e com infertilidade de causa tubária e/ou masculina (grupo controle).
3. Comparar os níveis foliculares destes cinco marcadores de estresse oxidativo nos dois grupos.

3.2. Objetivo secundário

Comparar a resposta à estimulação ovariana com gonadotrofinas e os resultados de injeção intra-citoplasmática de espermatozóide (taxas de fertilização e clivagem, formação de embriões de boa qualidade e taxas de gestação química e clínica) entre pacientes inférteis com SOP e infertilidade de causa tubária e/ou masculina.

4. Casuística e Métodos

Realizamos um estudo prospectivo e controlado, realizado no Laboratório de Ginecologia - Setor de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia – FMRP-USP e Laboratório de Nutrição e Metabolismo, Departamento de Clínica Médica – FMRP-USP, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP)-SP. Foram incluídos no estudo todos os casais submetidos à estimulação ovariana para a realização de ICSI, junto ao Setor de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP-USP, que preencheram os critérios de inclusão e manifestaram o desejo de participar do projeto, mediante a assinatura do termo de consentimento pós-informado.

Foram incluídos neste estudo 72 pacientes (82 ciclos), sendo 57 (66 ciclos) com infertilidade por fator tubário e/ou masculino (Grupo Controle) e 15 (16 ciclos) com Síndrome dos Ovários Policísticos (Grupo SOP), que foram submetidas à estimulação ovariana controlada para realização de injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI).

Foram incluídas pacientes com idade igual ou inferior a 38 anos, índice de massa corporal menor do que 30 kg/m^2 , níveis basais de FSH (terceiro dia do ciclo) menores ou iguais a 10 UI/ml e sem quaisquer doenças pélvicas associadas à infertilidade, quando da realização da laparoscopia diagnóstica, utilizada como parte da propedêutica da investigação de infertilidade. Foram excluídas pacientes com diabetes mellitus ou quaisquer outras endocrinopatias, doença cardiovascular, lúpus eritematoso sistêmico e outras doenças reumatológicas, infecção pelo vírus HIV, qualquer infecção ativa, tabagismo ou o uso de medicações hormonais e antiinflamatórias hormonais e não-hormonais nos últimos seis meses, previamente à programação para o procedimento de reprodução assistida. Para o grupo SOP foram excluídas pacientes com endometriose leve, moderada e severa.

O diagnóstico de SOP foi realizado segundo os critérios definidos pelo consenso de Rotterdam, em 2003 (oligo ou amenorréia, sinais clínicos e/ou laboratoriais de

hiperandrogenismo e ovários policísticos à ultrassonografia, excluídas outras causas de anovulação e hiperandrogenismo) (THE ROTTERDAM ESHRE/ASRM-SPONSORED PCOS CONSENSUS WORKSHOP GROUP, 2004).

Protocolo de Estimulação

Com o objetivo de sincronizar e programar o início do ciclo de estimulação ovariana controlada, utilizamos a programação da menstruação, que consistiu 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, suspendendo sua administração de tal forma que o início do sangramento menstrual coincidissem com a realização da ultrassonografia transvaginal (USTV) basal para se observar o padrão endometrial e afastar a presença de cistos ovarianos que pudessem interferir na resposta à administração das gonadotrofinas exógenas e na monitorização ultrassonográfica do crescimento folicular.

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

A hiperestimulação ovariana controlada foi iniciada após confirmação do bloqueio hipofisário com análogo de GnRH. As pacientes receberam 150 a 300 UI por dia de FSH recombinante (FSHr) (Gonal-F®, Serono, Brasil; Puregon®, Organon, Brasil), via subcutânea (SC), nos primeiros 6 dias da estimulação ovariana. A partir do sétimo dia da indução da

ovulação, a dose foi ajustada de acordo com o crescimento folicular e a espessura endometrial, monitorados com USTV diariamente ou em dias alternados. Quando pelo menos dois folículos atingiram 18 mm de diâmetro médio, foi administrada 250 µg de hCG recombinante (Ovidrel®, Serono, Brasil) às 22:00. A captação dos oócitos foi realizada 34 a 36h após a administração do hCG recombinante.

A suplementação da fase lútea foi feita com progesterona natural micronizada (Utrogestan®, Enila, 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.

Captação Oocitária, ICSI, Cultivo e Avaliação Embrionária

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

dos restos celulares foi feita com o auxílio de uma pipeta Pasteur (stripper pipette 130 μm denuding pipette, Cook, Melbourne, Australia).

Após a realização do desnudamento oocitário (remoção do *cumulus oophorus*), realizamos a identificação do grau de maturidade dos oócitos, sob visualização ao microscópio de luz. Os oócitos imaturos (em estágio de vesícula germinativa ou metáfase I) foram descartados. Os oócitos maduros (caracterizados morfológicamente pela presença de um corpúsculo polar extruso) foram injetados por meio da realização da ICSI.

Cerca de 18 a 19 horas após a ICSI foi avaliada a fertilização, caracterizada pela presença de 2 pró-núcleos e 2 corpúsculos polares (a taxa de fertilização, foi calculada nos 2 grupos avaliados, correspondendo ao número de oócitos fertilizados, divididos pelo número de oócitos injetados X 100). A clivagem foi verificada em torno de 24 horas após a fertilização com a observação da divisão celular. Cerca de 44 a 48 horas após a ICSI (D2) foi realizada a análise da qualidade embrionária, (quanto ao número e simetria de blastômeros, percentagem de fragmentação e presença ou não de multinucleação). Foram considerados como embriões de boa qualidade no segundo dia de desenvolvimento (D2) os que apresentaram 4 blastômeros, simétricos, com menos de 20% de fragmentação e sem multinucleação, e considerados de boa qualidade no terceiro dia de desenvolvimento (D3), aqueles que apresentam 8 blastômeros simétricos, com menos de 20% de fragmentação e sem multinucleação. Realizou-se a transferência embrionária em D2 ou D3, de acordo com a individualização de cada caso. Quatorze dias após a transferência embrionária realizou-se a análise do β -hCG sanguíneo, sendo considerada como gravidez química a presença de β -hCG positivo (maior ou igual a 25 UI/ml). Para as pacientes com β -hCG positivo, realizou-se ultrasonografia transvaginal 4 a 5 semanas após a transferência embrionária, sendo considerada gravidez clínica a presença de saco gestacional intra-uterino com embrião com batimento cardíaco (bcf) presente.

Consideramos má resposta à estimulação ovariana com gonadotrofinas o cancelamento do ciclo por má resposta ou a presença de número inferior a 4 oócitos captados (PEÑARRUBIA et al, 2005). Foram considerados critérios indicativos de cancelamento dos ciclos de indução a ausência de pelo menos três folículos com diâmetro médio igual ou superior a 14mm visualizados ao ultra-som transvaginal após 8 a 9 dias de estimulação ovariana com gonadotrofinas (cancelamento precoce) e/ou ausência de critérios de maturidade folicular para administração do hCG após 4 a 5 dias de prorrogação do tratamento com critérios iniciais considerados insatisfatórios (cancelamento tardio) (PEÑARRUBIA et al., 2005). Consideramos como gestação química a presença de β -hCG positivo (> 25 UI/ml) quatorze dias após a realização da transferência embrionária e como clínica a presença de saco gestacional contendo embrião com batimento cardíaco visível em ultra-sonografia transvaginal realizada 4 a 5 semanas após a transferência embrionária.

Amostras obtidas e processamento

Para a coleta sanguínea foram utilizados tubos estéreis, a vácuo, com EDTA, para coleta de 5 mL de sangue venoso das pacientes entre o terceiro ao quinto dias do ciclo menstrual, no mês anterior à realização da estimulação ovariana controlada para a realização da ICSI (D1). Neste dia, as pacientes não estavam utilizando nenhuma medicação, hormonal ou não hormonal. No grupo SOP houve duas pacientes que fizeram uso de anticoncepcional para indução do sangramento.

O sangue também foi coletado no primeiro dia de estimulação (D2), no dia da administração do hCG (D3) e no dia da captação oocitária (D4), quando também foram coletadas amostras de fluido folicular. As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10

minutos e o soro e o fluido folicular foram armazenados a -80°C , divididos em duas alíquotas, para posterior análise.

Mensuração da Peroxidação Lipídica (MDA)

O soro, previamente estocado, foi descongelado até atingir 37°C . Cerca de $250\mu\text{L}$ de cada amostra foi misturado a $500\mu\text{L}$ de TCA-TBA-HCL (15% de ácido tricloracético, 0,375 % de ácido tiobarbitúrico e 0,25 N de ácido clorídrico) e aquecido em banho-maria por 15 minutos. Após resfriamento, o precipitado foi centrifugado em 3000 rpm por 10 min. A absorbância do produto foi medida em espectrofotômetro (Spectronic 601-Milto Roy) com comprimento de onda de 535nm. O cálculo da concentração das TBARS foi realizado considerando-se o coeficiente de absorvidade molar do produto ($E_{535}=1,56 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), sendo os resultados expressos em nmol/gproteína.

Determinação da quantidade total de hidroperóxidos (FOX)

O sistema de teste FOX₁ é baseado na oxidação do Fe^{+2} (íon ferroso) a Fe^{+3} (íon férrico) por vários tipos de peróxidos contidos nas amostras a serem analisadas. Na presença de xilenol orange forma-se um complexo colorido (xilenol orange-férrico) de cor azul púrpura, cuja absorbância pode ser medida (COSTA et al., 2006). Neste método utilizou-se uma substância preparada no dia da leitura (o reagente FOX₁). A solução 1 é preparada com 7,6mg de xilenol orange e 88mg de BHT (butil-hidroxitolueno) em 90mL de metanol . A solução 2 é preparada com 9,8mg de sulfato ferroso em 10 mL de ácido sulfúrico 250mM (0,13mL de ácido sulfúrico em 10mL de água). As duas soluções foram misturadas em concentração 9:1 somente no dia da leitura. Para a análise foram necessários $100\mu\text{L}$ de soro,

100µL de água (para o branco) e 1 mL da solução, que reagem por 30 minutos ao abrigo da luz à temperatura ambiente. Após este período, centrifugou-se por 5 minutos a 3500 rpm e a absorbância do sobrenadante foi medida em 560nm. A curva foi realizada com H₂O₂ em concentrações de 10 a 200µM. O resultado foi expresso em µmol/g proteína.

O malondialdeído e o FOX foram expressos por g de proteína, que foi determinada utilizando-se o kit Proteínas Totais Labtest®. O princípio dessa metodologia está na reação entre o íon cobre do reagente biureto, que reage em contato com as ligações peptídicas da proteína, produzindo uma cor púrpura, que deve ser lida a 540nm no espectrofotômetro.

Determinação dos produtos de oxidação protéica (AOPP)

Os níveis dos produtos de oxidação protéica presentes no soro foram determinados através de um método que consiste na mistura de 40µL de soro a 160µL de PBS (Tampão fosfato salino) e 20µL de ácido acético glacial (ultra puro), que foi feita diretamente em microplaca de fundo chato. A leitura da absorbância foi realizada com comprimento de onda de 340nm. A curva para a realização desta leitura foi feita com o uso de cloramina T (curva de 10 a 100 mM) e iodeto de potássio (1,16 M), misturando-se 200µL dos padrões a 10µL de iodeto de potássio e 20µL de ácido acético e agitando a placa por 6 minutos antes da leitura (WITKO-SARSAT et al, 1996). O resultado final foi expresso em µmol/L.

Determinação da Glutathiona (GSH)

A GSH do soro foi medida por um método descrito originalmente por Elmmann (ELMMAN, 1959) e modificado por Hu (HU, 1994), no qual os grupos tióis interagem com o DTNB formando ânios. Nesse ensaio, uma alíquota de 25µL de soro foi misturada a 1 mL de

tris-EDTA buffer (25 nmol/L Tris-base, 20 mmol/L EDTA, pH 8,2) e a leitura da absorbância foi realizada em um comprimento de onda de 412 nm. Após esta leitura, uma alíquota de 25µL de solução estoque de DTNB (10 nmol/L em etanol absoluto) foi adicionada à solução, que é mantida a temperatura ambiente durante 15 minutos. Após este período, nova leitura foi realizada utilizando como branco o DTNB (COSTA et al, 2006). A curva para esta leitura foi realizada em duplicata utilizando DTNB, EDTA e três diferentes concentrações de GSH. O resultado é expresso em nmol/L.

Determinação dos níveis de Vitamina E

A determinação da concentração de vitamina E (α -tocoferol) no soro foi realizada segundo o método descrito por Arnaud et al. (1991). Uma amostra de 200µL de soro foi homogeneizada em 200µL de etanol e homogeneizada por 5 segundos em vórtex. Em seguida foi colocada em 400µL de n-hexano, agitada por 1 minuto e 10 segundos e centrifugada a 3500 rpm por 5 minutos. Uma alíquota de 200µL do sobrenadante (n-hexano) foi pipetada em tubo de ensaio, que posteriormente foi seco em nitrogênio, e ressuspensa em 200µL de fase móvel, composta por acetonitrila/ diclorometanol/ metanol (70:10:20, v/v/v) e filtrada. Uma quantidade de 100µL foi injetada na HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) e a leitura efetuada como descrito a seguir. Para a determinação das concentrações da vitamina E foi utilizado um HPLC modelo Shimadzu LC-9^A, usando uma coluna tipo C-18 (Shimpack CLC-ODS 4,6 x 25 cm), uma pré-coluna de 4 mm x 1 cm, com fluxo de 2 mL/min. A leitura foi realizada por espectrofotometria com um detector UV/Vis a 292nm. O equipamento foi calibrado com soluções padrões de α -tocoferol (SIGMA), nas concentrações de 10, 20 e 200 µmol/L. Antes de cada leitura foi injetada uma solução padrão de α -tocoferol na concentração

de 20 $\mu\text{mol/L}$. O equipamento foi programado para que os resultados fossem expressos em $\mu\text{mol/L}$.

4.1. Análise Estatística

A normalidade das variáveis foi testada e as análises estatísticas foram realizadas utilizando o Software SAS[®] 9.0. Para a realização da comparação das variáveis quantitativas demográficas e relacionadas aos resultados dos procedimentos de RA entre pacientes inférteis controles e SOP foi utilizado o Teste t-Student. Para a comparação das variáveis qualitativas entre os grupos foi utilizado o Teste Exato de Fisher.

Para a comparação dos níveis dos marcadores de estresse oxidativo no fluido folicular e no soro na fase folicular precoce do ciclo que antecedeu a estimulação e ao longo da estimulação nos dois grupos, e para a comparação destes marcadores entre os dias coletados, foi utilizado o modelo linear de efeitos mistos (efeitos aleatórios e fixos). O ajuste do modelo foi feito por meio do procedimento PROC MIXED do software SAS[®] 9.0.

Para a análise da correlação entre os níveis séricos e foliculares dos marcadores entre os grupos foi realizado o teste de correlação de Pearson.

Em todas as análises foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5. Resultados

Os grupos de pacientes incluídas neste estudo, Controle (infertilidade por fator tubário e/ou masculino) e Síndrome dos ovários policísticos (SOP) foram comparadas quanto à idade, IMC, níveis de FSH basal, volume ovariano, número de folículos antrais, dose de FSH total administrada durante a estimulação, número de dias de estimulação, porcentagem de ciclos suspensos por má resposta e que apresentaram resposta inadequada durante a estimulação, folículos entre 14 e 18 mm e maiores ou iguais a 18 mm no dia da administração do hCG, espessura do endométrio (mm) no dia da administração do hCG, número de folículos puncionados, número de oócitos captados, número de oócitos maduros, taxa de maturidade oocitária, número de oócitos fertilizados e clivados, taxa de fertilização e clivagem, número de embriões formados no dia da transferência, número médio de embriões transferidos, porcentagem de ciclos que obtiveram embriões de boa qualidade no segundo e no terceiro dia de desenvolvimento, taxa de gestação química por ciclo com transferência e por ciclo iniciado e taxa de gestação clínica por ciclo com transferência e por ciclo iniciado (Tabela 1). Apesar de terem sido incluídas somente pacientes com IMC inferior a 30 kg/m^2 , foi constatada diferença significativa em relação ao IMC entre os grupos, sendo o IMC maior nas pacientes com SOP ($26,7 \pm 3,8 \text{ kg/m}^2$) em relação ao grupo Controle ($23,7 \pm 3,3 \text{ kg/m}^2$). O volume ovariano esquerdo também se apresentou diferente, sendo maior no grupo SOP ($6,9 \pm 3,2 \text{ mm}^3$) em relação ao grupo Controle (infértil por fator tubário e/ou masculino) ($5,4 \pm 2,3 \text{ mm}^3$). O número de folículos antrais nos ovários foi significativamente maior nas pacientes do grupo SOP ($7,1 \pm 3,9$ – ovário direito; $6,7 \pm 4,1$ – ovário esquerdo) em relação às pacientes Controles ($4,2 \pm 2,8$ – ovário direito; $4,5 \pm 3,2$ – ovário esquerdo), ao passo que a dose de FSH total administrada durante a estimulação foi menor no grupo SOP ($1493,8 \pm 331,1 \text{ mUI/ml}$) em comparação com o grupo de pacientes inférteis por fator tubário e/ou masculino ($2045,1 \pm 633,0 \text{ mUI/ml}$) (Tabela 1). Não houve diferença em relação à idade, ao FSH basal, volume ovariano direito, número de dias de estimulação, porcentagem de ciclos suspensos por

má resposta e ciclos que apresentaram resposta inadequada, tamanho de folículos e do endométrio no dia da administração do hCG, número de folículos puncionados, oócitos captados, oócitos maduros, inseminados e fertilizados, taxa de maturidade oocitária, fertilização e clivagem embrionária, número de embriões formados e transferidos, percentagem de ciclos com embriões de boa qualidade no segundo e terceiro dia de desenvolvimento, taxa de gestação química por ciclo com transferência e iniciado e taxa de gestação clínica por ciclo iniciado e com transferência (Tabela 1).

Tabela 1 - Comparação entre as variáveis demográficas, resposta à estimulação ovariana com gonadotrofinas e resultados de ICSI em pacientes Controle (fator tubário e/ou masculino de infertilidade) e Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP).

Variável	Controle N = 57 (66 ciclos)	SOP N = 15 (16 ciclos)	<i>P</i>
Idade	33,0 ± 3,9	32,2 ± 3,2	0,45
IMC	23,7 ± 3,3	26,7 ± 3,8	<0,01
FSH Basal	5,6 ± 2,6	5,3 ± 1,7	0,64
Volume OD (mm ³)	5,7 ± 2,7	6,7 ± 3,4	0,23
Volume OE (mm ³)	5,4 ± 2,3	6,9 ± 3,2	0,03
Nº folículos OD	4,2 ± 2,8	7,1 ± 3,9	<0,01
Nº folículos OE	4,5 ± 3,2	6,7 ± 4,1	0,02
Dose FSH (Total) (mUI/ml)	2045,1 ± 633,0	1493,8 ± 331,1	<0,01
Nº dias estimulação	9,2 ± 1,6	8,6 ± 1,7	0,20
Ciclos suspensos por má resposta (%)	1,5 (1/66)	6,2 (1/16)	0,35
Resposta inadequada (%)	25,8 (17/66)	12,5 (1/16)	0,34
Folículos entre 14 e 18 mm hCG	4,9 ± 3,5	5,5 ± 5,2	0,67
Folículos > 18 mm hCG	2,7 ± 1,8	2,8 ± 1,4	0,83
Endométrio (mm)	10,8 ± 2,5	10,0 ± 2,4	0,28
Nº folículos puncionados	14,2 ± 8,4	17,3 ± 13,1	0,39

Nº oócitos captados	6,4 ± 3,9	7,3 ± 5,4	0,44
Nº oócitos maduros	4,9 ± 3,4	5,6 ± 3,6	0,49
Nº oócitos fertilizados	3,3 ± 1,9	3,7 ± 1,7	0,48
Nº embriões clivados	2,8 ± 1,5	3,3 ± 1,7	0,30
Taxa de maturidade (%)	77,7 ± 23,3	79,3 ± 18,1	0,69
Taxa de fertilização (%)	79,8 ± 24,1	77,1 ± 28,8	0,71
Taxa de clivagem (%)	88,9 ± 19,1	79,9 ± 27,8	0,15
Nº embriões formados	2,6 ± 1,4	3,1 ± 1,1	0,23
Nº embriões transferidos	1,8 ± 0,7	1,9 ± 0,9	0,73
Ciclos com embriões de qualidade D2 (%)	22,9 (14/61)	15,4 (2/13)	0,72
Ciclos com embriões de qualidade D3 (%)	33,3 (12/36)	22,2 (2/9)	0,70
Taxa de gestação química (ciclo iniciado - %)	30,3 (20/66)	31,2 (5/16)	1,00
Taxa de gestação química (ciclo com transferência-%)	32,3 (20/62)	45,4 (5/11)	0,49
Taxa de gestação clínica (ciclo iniciado - %)	24,2 (16/66)	31,2 (5/16)	0,54
Taxa de gestação clínica (ciclo com transferência-%)	25,8 (16/62)	45,4 (5/11)	0,28

Legenda: Má resposta: obtenção de número inferior a quatro oócitos; Taxa de maturidade: número de oócitos maduros dividido pelo número de oócitos captados, multiplicado por 100; Taxa de fertilização: número de oócitos fertilizados dividido pelo número de oócitos inseminados, multiplicado por 100; Taxa de clivagem: número de embriões clivados dividido pelo número de oócitos fertilizados, multiplicado por 100; D2: segundo dia de desenvolvimento embrionário; D3: terceiro dia de desenvolvimento embrionário; Taxa de gravidez química (p/ ciclo iniciado): número de pacientes com β -hCG positivo dividido pelo número de ciclos iniciados, multiplicado por 100; Taxa de gravidez química (p/ ciclo com transferência: número de pacientes com β -hCG positivo dividido pelo número de ciclos onde foi realizado transferência multiplicado por 100; Taxa de gravidez clínica (p/ ciclo iniciado): número de pacientes com batimento cardíaco fetal presente dividido pelo número de ciclos iniciados, multiplicado por 100; Taxa de gravidez clínica (p/ ciclo com transferência): número de pacientes com batimento cardíaco fetal presente dividido pelo número de ciclos onde foi realizado transferência, multiplicado por 100; OD: ovário direito; OE: ovário esquerdo. Foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Na comparação dos níveis de MDA, FOX, AOPP GSH e vitamina E no soro obtido na fase folicular precoce do ciclo que antecedeu a estimulação ovariana com gonadotrofinas (D1) entre as pacientes inférteis com SOP e Controles (Tabela 2), foi encontrada diferença significativa nos níveis de MDA, que foram maiores nas pacientes do grupo SOP ($27,9 \pm 8,9$ $\mu\text{mol/g pt}$) em relação ao grupo infértil por fator tubário e/ou masculino ($22,6 \pm 9,0$ $\mu\text{mol/g pt}$).

Tabela 2 - Marcadores séricos de estresse oxidativo na fase folicular precoce do ciclo que antecedeu a estimulação ovariana com gonadotrofinas em pacientes com infertilidade de causa tubária e/ou masculina (Grupo Controle) e Síndrome dos Ovários Policísticos).

Marcadores	N	Infertilidade de causa tubária e/ou masculina	N	Síndrome dos ovários policísticos	P
MDA ($\mu\text{mol/g pt}$)	49	$22,6 \pm 9,0$	13	$27,9 \pm 8,9$	0,03
AOPP ($\mu\text{mol/L}$)	51	$100,3 \pm 60,9$	13	$118,6 \pm 45,3$	0,49
FOX ($\mu\text{mol/g pt}$)	51	$8,2 \pm 1,9$	13	$7,5 \pm 1,2$	0,15
GSH (nmol/L)	51	$171,0 \pm 48,8$	13	$188,3 \pm 58,8$	0,15
Vitamina E ($\mu\text{mol/L}$)	51	$22,4 \pm 6,7$	13	$26,3 \pm 4,7$	0,16

Legenda: MDA = malondialdeído (Controle - 55 ciclos, SOP - 14 ciclos); AOPP = produtos de oxidação protéica (Controle - 57 ciclos, SOP - 14 ciclos); FOX = hidroperóxidos (Controle - 59 ciclos, SOP - 14 ciclos); GSH = glutationa (Controle - 59 ciclos, SOP - 14 ciclos); vitamina E (Controle - 58 ciclos, SOP - 14 ciclos). Dados representados em média \pm desvio padrão. Foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Na avaliação da possível influência da estimulação ovariana sobre os marcadores de estresse oxidativo analisados no grupo Controle foi observado aumento significativo dos níveis séricos de MDA após bloqueio hipofisário com gonadotrofinas (D2) ($25,9 \pm 9,1$ $\mu\text{mol/g PT}$), quando comparados aos da fase folicular precoce do ciclo que antecedeu a estimulação (D1) ($22,6 \pm 9,0$ $\mu\text{mol/g pt}$). Os valores séricos de MDA em D2 foram maiores do que em D4

(dia da captação oocitária) ($23,3 \pm 7,2 \mu\text{mol/g pt}$). Em relação aos níveis de AOPP no soro ao longo da estimulação ovariana observaram-se maiores níveis séricos deste marcador em D2 ($135,1 \pm 69,7 \mu\text{mol/L}$), D3 ($118,2 \pm 63,5 \mu\text{mol/L}$), e D4 ($124,9 \pm 67,0 \mu\text{mol/L}$) em relação a D1 ($100,3 \pm 60,9 \mu\text{mol/L}$). Os níveis séricos de FOX foram significativamente menores em D2 ($7,2 \pm 1,3 \mu\text{mol/g pt}$), D3 ($7,1 \pm 1,3 \mu\text{mol/g pt}$) e D4 ($7,2 \pm 1,6 \mu\text{mol/g pt}$) do que em D1 ($8,2 \pm 2,0 \mu\text{mol/g pt}$). Os níveis de GSH e vitamina E não mostraram variação significativa entre os valores prévios e durante a estimulação ovariana controlada (Tabela 3).

Tabela 3 - Marcadores séricos de estresse oxidativo na fase folicular precoce do ciclo que antecedeu a estimulação ovariana (D1), no dia de início da estimulação ovariana (D2), no dia da administração da gonadotrofina coriônica humana (D3) e no dia da captação oocitária (D4) de pacientes com infertilidade por fator tubário e/ou masculino.

Infertilidade por fator tubário e/ou masculino				
Marcadores	D1	D2	D3	D4
MDA ($\mu\text{mol/g pt}$)	$22,6 \pm 9,0^a$	$25,9 \pm 9,1^{a,b}$	$24,2 \pm 7,4$	$23,3 \pm 7,2^b$
AOPP ($\mu\text{mol/L}$)	$100,3 \pm 60,9^{c,d,e}$	$135,1 \pm 69,7^{c,f}$	$118,2 \pm 63,5^{d,f}$	$124,9 \pm 67,0^e$
FOX ($\mu\text{mol/g pt}$)	$8,2 \pm 2,0^{g,h,i}$	$7,2 \pm 1,3^g$	$7,1 \pm 1,3^h$	$7,2 \pm 1,6^i$
GSH (nmol/L)	$171,0 \pm 48,8$	$177,1 \pm 40,9$	$177,7 \pm 35,2$	$187,0 \pm 42,6$
Vitamina E ($\mu\text{mol/L}$)	$22,4 \pm 6,7$	$22,3 \pm 5,9$	$23,6 \pm 8,1$	$22,7 \pm 7,3$

Legenda: ^{a, b, c, d}: diferentes sobrescritos na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Dados representados em média \pm desvio padrão. a: $p = 0,01$; b: $p < 0,01$; c: $p < 0,01$; d: $p = 0,02$; e: $p < 0,01$; g: $p < 0,01$; h: $p < 0,01$; i: $p < 0,01$. MDA: D1 55 ciclos; D2 54 ciclos; D3 50 ciclos; D4 54 ciclos; AOPP: D1 57 ciclos; D2 55 ciclos; D3 50 ciclos; D4 54 ciclos; FOX: D1 59 ciclos; D2 55 ciclos; D3 51 ciclos; D4 54 ciclos; GSH: D1 59 ciclos; D2 55 ciclos; D3 52 ciclos; D4 54 ciclos; Vitamina E: D1 58 ciclos; D2 49 ciclos; D3 49 ciclos; D4 49 ciclos.

No grupo SOP, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nos níveis séricos dos cinco marcadores de estresse oxidativo analisados entre os dias de cada coleta sanguínea antes e ao longo da estimulação ovariana controlada (Tabela 4).

Tabela 4 - Marcadores séricos de estresse oxidativo na fase folicular precoce do ciclo que antecedeu a estimulação ovariana (D1), no dia de início da estimulação ovariana (D2), no dia da administração da gonadotrofina coriônica humana (D3) e no dia da captação oocitária (D4) de pacientes inférteis com Síndrome dos ovários policísticos

Síndrome dos Ovários Policísticos				
Marcadores	D1	D2	D3	D4
MDA ($\mu\text{mol/g pt}$)	27,9 \pm 8,9	28,5 \pm 9,2	28,7 \pm 6,9	29,2 \pm 5,4
AOPP ($\mu\text{mol/L}$)	118,6 \pm 45,3	135,3 \pm 83,9	120,3 \pm 46,5	121,6 \pm 76,0
FOX ($\mu\text{mol/g pt}$)	7,5 \pm 1,2	7,9 \pm 1,3	7,8 \pm 0,8	7,7 \pm 1,3
GSH (nmol/L)	188,3 \pm 58,8	183,9 \pm 46,4	194,3 \pm 37,3	202, 8 \pm 19,0
Vitamina E ($\mu\text{mol/L}$)	26,3 \pm 4,7	25,3 \pm 11,3	26,1 \pm 8,0	25,1 \pm 9,2

Legenda: ^{a, b, c, d}: diferentes sobrescritos na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Dados representados em média \pm desvio padrão. MDA: D1 14 ciclos; D2 13 ciclos; D3 12 ciclos; D4 14 ciclos; AOPP: D1 14 ciclos; D2, 13 ciclos; D3 12 ciclos; D4 14 ciclos; FOX: D1 14 ciclos; D2 13 ciclos; D3 11 ciclos; D4 14 ciclos; GSH: D1, 14 ciclos; D2 13 ciclos; D3 12 ciclos; D4 14 ciclos; Vitamina E: 14 ciclos; D2 12 ciclos; D3 12 ciclos; D4 13 ciclos.

A tabela 5 apresenta a comparação dos níveis séricos durante o período da estimulação nos dois grupos.

Tabela 5 - Marcadores séricos de estresse oxidativo na fase folicular precoce do ciclo que antecedeu a estimulação ovariana (D1), no dia de início da estimulação ovariana (D2), no dia da administração da gondotrofina coriônica humana (D3) e no dia da captação oocitária (D4) de pacientes com infertilidade por fator tubário e/ou masculino (Grupo Controle) e com Síndrome dos ovários policísticos.

Marcadores	Infertilidade por fatores masculino e/ou tubário				Síndrome dos Ovários Policísticos			
	D1	D2	D3	D4	D1	D2	D3	D4
MDA ($\mu\text{mol/g pt}$)	22,6 \pm 9,0 ^a	25,9 \pm 9,1 ^{a,b}	24,2 \pm 7,4	23,3 \pm 7,2 ^b	27,9 \pm 8,9	28,5 \pm 9,2	28,7 \pm 6,9	29,2 \pm 5,4
AOPP (($\mu\text{mol/L}$)	100,3 \pm 60,9 ^{c,d,e}	135,1 \pm 69,7 ^{c,f}	118,2 \pm 63,5 ^{d,f}	124,9 \pm 67,0 ^e	118,6 \pm 45,3	135,3 \pm 83,9	120,3 \pm 46,5	121,6 \pm 76,0
FOX ($\mu\text{mol/g pt}$)	8,2 \pm 2,0 ^{g,h,i}	7,2 \pm 1,3 ^g	7,1 \pm 1,3 ^h	7,2 \pm 1,6 ⁱ	7,5 \pm 1,2	7,9 \pm 1,3	7,8 \pm 0,8	7,7 \pm 1,3
GSH ((nmol/L)	171,0 \pm 48,8	177,1 \pm 40,9	177,7 \pm 35,2	187,0 \pm 42,6	188,3 \pm 58,8	183,9 \pm 46,4	194,3 \pm 37,3	202,8 \pm 19,0
Vitamina E (($\mu\text{mol/L}$)	22,4 \pm 6,7	22,3 \pm 5,9	23,6 \pm 8,1	22,7 \pm 7,3	26,3 \pm 4,7	25,3 \pm 11,3	26,1 \pm 8,0	25,1 \pm 9,2

Legenda: ^{a, b, c, d}: diferentes sobrescritos na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Dados representados em média \pm desvio padrão. a: $p = 0,01$; b: $p < 0,01$; c: $p < 0,01$; d: $p = 0,02$; e: $p < 0,01$; g: $p < 0,01$; h: $p < 0,01$; i: $p < 0,01$.

Os níveis dos marcadores de estresse oxidativo não mostraram diferença significativa entre os grupos Controle e SOP quando analisados no fluido folicular. (Tabela 6).

Tabela 6 - Comparação entre marcadores de estresse oxidativo no fluido folicular em pacientes com infertilidade por fator tubário e/ou masculino (Grupo Controle) e com Síndrome dos ovários policísticos.

Marcadores	N	Infertilidade por fator tubário e/ou masculino	N	Síndrome dos ovários policísticos	P
MDA ($\mu\text{mol/g pt}$)	40	$21,0 \pm 4,4$	10	$23,0 \pm 6,3$	0,09
AOPP ($\mu\text{mol/L}$)	40	$107,3 \pm 38,9$	13	$112,1 \pm 59,7$	0,84
FOX ($\mu\text{mol/g pt}$)	41	$5,8 \pm 0,7$	13	$5,4 \pm 0,4$	0,15
GSH (nmol/L)	42	$265,5 \pm 71,0$	13	$279,1 \pm 59,7$	0,27
Vitamina E ($\mu\text{mol/L}$)	41	$8,6 \pm 2,8$	12	$8,5 \pm 4,6$	0,71

Legenda: MDA = malondialdeído (Controle – 44 ciclos; SOP – 11 ciclos); AOPP = produtos de oxidação protéica (Controle – 47 ciclos; SOP – 14 ciclos); FOX = hidroperóxidos (Controle – 50 ciclos; SOP – 14 ciclos); GSH = glutatona (Controle – 50 ciclos; SOP – 14 ciclos); Vitamina E (Controle – 49 ciclos; SOP – 13 ciclos). Dados representados em média \pm desvio padrão. Foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Os níveis de MDA encontrados foram mais elevados no grupo SOP em comparação com o grupo Controle no soro obtido na fase folicular precoce do ciclo que antecedeu a estimulação (D1) (SOP - $27,9 \pm 8,9 \mu\text{mol/g pt}$; Controle - $22,6 \pm 9,0 \mu\text{mol/g pt}$), no dia de administração do hCG (D3) (SOP - $28,7 \pm 6,9 \mu\text{mol/g pt}$; Controle - $24,2 \pm 7,4 \mu\text{mol/g PT}$) e no dia da captação oocitária (D4) (SOP - $29,2 \pm 5,4 \mu\text{mol/g pt}$; Controle - $23,3 \pm 7,2 \mu\text{mol/g PT}$) (Tabela 7).

Tabela 7 - Comparação entre os valores de malondialdeído (MDA) no soro na fase folicular precoce do ciclo que antecedeu a estimulação ovariana (D1), no dia de início da estimulação (D2), no dia da administração da gonadotrofina coriônica humana (D3) e no dia da captação oocitária (D4) e no fluido folicular entre pacientes dos grupos Controle e SOP.

Material e Dia da coleta	N	Infertilidade por fator tubário e/ou masculino	N	Síndrome dos ovários policísticos	P
Soro D1	49	22,6 ± 9,0 ^{a, b}	13	27,9 ± 8,9 ^e	0,03
Soro D2	47	25,9 ± 9,1 ^{a, c}	12	28,5 ± 9,2	0,20
Soro D3	45	24,2 ± 7,4 ^d	11	28,7 ± 6,9	0,03
Soro D4	47	23,3 ± 7,2 ^c	13	29,2 ± 5,4	<0,01
Fluido Folicular D4	39	21,0 ± 4,4 ^{b, d}	10	22,9 ± 6,3 ^e	0,09

Legenda: ^{a, b, c, d} na mesma coluna indicam diferença estatística. Dados representados em média ± desvio padrão. Foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). a: $p = 0,01$; b: $p = 0,04$; c $p < 0,01$; d $p < 0,01$; e $p = 0,02$. D1: Controle – 55 ciclos, SOP – 14 ciclos; D2 Controle – 54 ciclos, SOP – 13 ciclos; D3 Controle – 50 ciclos, SOP – 12 ciclos; D4 Controle – 54 ciclos, SOP – 14 ciclos; Fluido folicular: Controle – 44 ciclos, SOP – 11 ciclos.

Os níveis de AOPP, FOX, GSH e vitamina E não apresentaram diferença significativa no soro da fase folicular precoce do ciclo que antecedeu a estimulação e ao longo da estimulação ovariana com gonadotrofinas comparando-se as pacientes dos grupos Controle e SOP (Tabelas 8, 9, 10 e 11).

Tabela 8 - Comparação entre os valores de produtos de oxidação protéica (AOPP) no soro na fase folicular precoce do ciclo que antecedeu a estimulação ovariana (D1), no dia de início da estimulação (D2), no dia da administração da gonadotrofina coriônica humana (D3) e no dia da captação oocitária (D4) e no fluido folicular entre pacientes dos grupos Controle e SOP.

Material e Dia da coleta	N	Infertilidade por fator tubário e/ou masculino	N	Síndrome dos ovários policísticos	P
Soro D1	51	100,3 ± 60,9 ^{a, b, c}	13	118,6 ± 45,3	0,49
Soro D2	47	135,1 ± 69,7 ^{a, d}	12	135,3 ± 83,9	0,78
Soro D3	45	118,2 ± 63,5 ^b	11	120,3 ± 46,5	0,63

Soro D4	47	124,9 ± 67,0 ^c	13	121,6 ± 76,0	0,59
Fluido Folicular D4	40	107,3 ± 38,9 ^d	13	112,1 ± 59,7	0,84

Legenda: ^{a, b, c, d} na mesma coluna indicam diferença estatística. Dados representados em média ± desvio padrão. Foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). a: $p < 0,01$; b: $p = 0,02$; c $p < 0,01$; d: $p < 0,01$. AOPP: D1 Controle – 57 ciclos, SOP – 14 ciclos; D2 Controle – 55 ciclos, SOP – 13 ciclos; D3 Controle 50 ciclos, SOP – 12 ciclos; D4 Controle – 54 ciclos, SOP – 14 ciclos; Fluido folicular: Controle – 47 ciclos, SOP – 14 ciclos.

Tabela 9 - Comparação entre os valores de hidroperóxidos (FOX) no soro na fase folicular precoce do ciclo que antecedeu a estimulação ovariana (D1), no dia de início da estimulação (D2), no dia da administração da gonadotrofina coriônica humana (D3) e no dia da captação oocitária (D4) e no fluido folicular entre pacientes dos grupos Controle e SOP.

Material e Dia da coleta	N	Infertilidade por fator tubário e/ou masculino	N	Síndrome dos ovários policísticos	P
Soro D1	51	8,2 ± 2,0 ^{a, b, c, d}	13	7,5 ± 1,2 ^h	0,15
Soro D2	48	7,2 ± 1,3 ^{a, e}	12	7,9 ± 1,3 ⁱ	0,22
Soro D3	46	7,1 ± 1,3 ^{b, f}	10	7,8 ± 0,8 ^j	0,39
Soro D4	47	7,2 ± 1,6 ^{c, g}	13	7,7 ± 1,3 ^l	0,57
Fluido Folicular D4	42	5,8 ± 0,7 ^{d, e, f, g}	13	5,4 ± 0,4 ^{h, i, j, l}	0,15

Legenda: ^{a, b, c, d} na mesma coluna indicam diferença estatística. Dados representados em média ± desvio padrão. Foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). a: $p < 0,01$; b: $p < 0,01$; c: $p < 0,01$; d: $p < 0,01$; e: $p < 0,01$; f: $p < 0,01$; g: $p < 0,01$; h: $p < 0,01$; i: $p < 0,01$; j: $p < 0,01$; l: $p < 0,01$. FOX: D1 Controle – 59 ciclos, SOP – 14 ciclos; D2 Controle – 55 ciclos, SOP – 13 ciclos; D3 Controle – 51 ciclos, SOP – 11 ciclos; D4 Controle – 54 ciclos, SOP – 14 ciclos; Fluido folicular: Controle – 50 ciclos, SOP – 14 ciclos.

Tabela 10 - Comparação entre os valores de glutatona (GSH) no soro na fase folicular precoce do ciclo que antecedeu a estimulação ovariana (D1), no dia de início da estimulação (D2), no dia da administração da gonadotrofina coriônica humana (D3) e no dia da captação oocitária (D4) e no fluido folicular entre pacientes dos grupos Controle e SOP.

Material e Dia da coleta	N	Infertilidade por fator tubário e/ou masculino	N	Síndrome dos ovários policísticos	P
Soro D1	51	171,0 ± 48,8 ^a	13	188,3 ± 58,8 ^e	0,15

Soro D2	48	177,1 ± 40,9 ^b	12	183,9 ± 46,4 ^f	0,56
Soro D3	47	177,7 ± 35,2 ^c	11	194,3 ± 37,3 ^g	0,24
Soro D4	47	187,0 ± 42,6 ^d	13	202,8 ± 19,0 ^h	0,22
Fluido Folicular D4	42	265,5 ± 71,0 ^{a,b,c,d}	13	279,1 ± 59,7 ^{e,f,g,h}	0,27

Legenda: ^{a, b, c, d} na mesma coluna indicam diferença estatística. Dados representados em média ± desvio padrão. Foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). a: $p < 0,01$; b: $p < 0,01$; c: $p < 0,01$; d: $p < 0,01$; e: $p < 0,01$; f: $p < 0,01$; g: $p < 0,01$; h: $p < 0,01$. GSH: D1 Controle – 59 ciclos, SOP – 14 ciclos; D2 Controle – 55 ciclos, SOP – 13 ciclos; D3 Controle – 52 ciclos, SOP – 12 ciclos; D4 Controle – 54 ciclos, SOP – 14 ciclos; Fluido folicular: Controle – 50 ciclos, SOP – 14 ciclos.

Tabela 11 - Comparação entre os valores de vitamina E no soro na fase folicular precoce do ciclo que antecedeu a estimulação ovariana (D1), no dia de início da estimulação (D2), no dia da administração da gonadotrofina coriônica humana (D3) e no dia da captação oocitária (D4) e no fluido folicular entre pacientes dos grupos Controle e SOP.

Material e Dia da coleta	N	Infertilidade por fator tubário e/ou masculino	N	Síndrome dos ovários policísticos	P
Soro D1	51	22,4 ± 6,7 ^a	13	26,3 ± 4,7 ^e	0,16
Soro D2	44	22,3 ± 5,9 ^b	11	25,3 ± 11,3 ^f	0,19
Soro D3	45	23,6 ± 8,1 ^c	11	26,1 ± 8,0 ^g	0,32
Soro D4	44	22,7 ± 7,3 ^d	12	25,1 ± 9,2 ^h	0,25
Fluido Folicular D4	42	8,6 ± 2,8 ^{a,b,c,d}	12	8,5 ± 4,6 ^{e,f,g,h}	0,71

Legenda: ^{a, b, c, d} na mesma coluna indicam diferença estatística. Dados representados em média ± desvio padrão. Foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). a: $p < 0,01$; b: $p < 0,01$; c: $p < 0,01$; d: $p < 0,01$; e: $p < 0,01$; f: $p < 0,01$; g: $p < 0,01$; h: $p < 0,01$. Vitamina E: D1 Controle – 58 ciclos, SOP – 14 ciclos; D2 Controle 49 ciclos, SOP – 12 ciclos; D3 Controle – 49 ciclos, SOP – 12 ciclos; D4 Controle – 49 ciclos, SOP – 13 ciclos, Fluido folicular: Controle – 49 ciclos, SOP – 13 ciclos.

Buscou-se encontrar uma possível correlação dos níveis de MDA, AOPP, FOX, GSH e vitamina E entre o soro obtido na fase folicular precoce do ciclo que antecedeu a estimulação, e o fluido folicular nos grupos Controle e SOP. No grupo Controle, foi

observada uma diferença significativa e uma correlação positiva leve ($r = 0,402$) dos níveis de MDA encontrados no soro em relação aos níveis do fluido, sendo os valores deste marcador mais altos no soro (Tabela 12). Os níveis de GSH significativamente maiores no fluido folicular apresentaram uma correlação positiva moderada ($r = 0,54$) de seus valores entre o soro e o fluido, no grupo Controle (Tabela 12).

Tabela 12 - Correlação entre os valores séricos dos marcadores de estresse oxidativo na fase folicular precoce do ciclo que antecedeu a estimulação ovariana e os níveis foliculares em pacientes com infertilidade por fator tubário e/ou masculino (Grupo Controle).

Marcadores	N	Níveis séricos	N	Níveis foliculares	r	p
MDA ($\mu\text{mol/g pt}$)	49	$23,9 \pm 8,6$	40	$20,6 \pm 4,5$	$0,402^a$	0,01
AOPP ($\mu\text{mol/L}$)	51	$92,7 \pm 60,6$	40	$108,0 \pm 39,6$	$0,212^b$	0,19
FOX ($\mu\text{mol/g pt}$)	51	$7,7 \pm 1,5$	41	$5,8 \pm 0,7$	$-0,021^c$	0,89
GSH (nmol/L)	51	$178,6 \pm 44,9$	42	$260,5 \pm 71,2$	$0,54^d$	0,0002
Vitamina E (nmol/L)	51	$22,8 \pm 6,8$	41	$8,3 \pm 2,6$	$0,247^e$	0,11

Legenda: Dados representados em média \pm desvio padrão. Foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). a, b, e: correlação positiva leve; c: correlação íntima negativa; d: correlação positiva moderada. Níveis séricos: MDA = Malondialdeído (55 ciclos); AOPP = produtos de oxidação protéica (57 ciclos) FOX = hidroperóxidos (59 ciclos); GSH = glutationa (59 ciclos); vitamina E (58 ciclos). Níveis foliculares: MDA (44 ciclos); AOPP (47 ciclos); FOX (50 ciclos); GSH (50 ciclos); Vitamina E (49 ciclos). Dados representados em média \pm desvio padrão. Foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

No grupo SOP não se observou diferença significativa entre os níveis séricos em D1 e foliculares dos cinco marcadores analisados. Encontramos uma correlação positiva mínima nos níveis de MDA ($r = 0,084$) e uma correlação positiva leve nos níveis de AOPP ($r = 0,401$) entre o soro e o fluido. Os níveis de FOX e GSH apresentaram correlação negativa

leve entre os valores séricos e foliculares. Os níveis de vitamina E apresentaram correlação negativa mínima entre os valores séricos e foliculares ($r = -0,099$) (Tabela 13).

Tabela 13. Correlação entre os valores séricos dos marcadores de estresse oxidativo na fase folicular precoce do ciclo que antecedeu a estimulação ovariana e os níveis foliculares em pacientes inférteis com Síndrome dos ovários policísticos.

Marcadores	N	Níveis séricos	N	Níveis foliculares	<i>r</i>	<i>p</i>
MDA ($\mu\text{mol/g pt}$)	13	$27,9 \pm 8,9$	10	$22,9 \pm 6,3$	0,084 ^a	0,80
AOPP ($\mu\text{mol/L}$)	13	$118,6 \pm 45,3$	13	$112,2 \pm 27,7$	0,401 ^b	0,15
FOX ($\mu\text{mol/g pt}$)	13	$7,5 \pm 1,2$	13	$5,4 \pm 0,4$	-0,259 ^c	0,37
GSH (nmol/L)	13	$188,3 \pm 58,8$	13	$279,3 \pm 59,8$	-0,385 ^d	0,17
Vitamina E (nmol/L)	13	$26,3 \pm 4,7$	12	$8,5 \pm 4,6$	-0,099 ^e	0,74

Legenda: Dados representados em média \pm desvio padrão. Foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). a: correlação mínima positiva; b: correlação positiva leve; c: correlação negativa leve; d: correlação negativa leve; e: correlação mínima negativa; Níveis séricos: MDA = malondialdeído (14 ciclos); AOPP = produtos de oxidação protéica (14 ciclos); FOX = hidroperóxidos (14 ciclos); GSH = glutathiona (SOP – 14 ciclos); vitamina E (14 ciclos). Níveis foliculares: MDA (11 ciclos); AOPP (14 ciclos); FOX (14 ciclos); GSH (14 ciclos); Vitamina E (13 ciclos). Dados representados em média \pm desvio padrão. Foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

A oxidação é parte fundamental do metabolismo do corpo humano e os radicais livres são produzidos naturalmente por nosso organismo, porém também estão envolvidos em disfunções biológicas. A produção excessiva de espécies reativas pode cursar com o comprometimento de membranas celulares, dano protéico e enzimático, alterações na estrutura do DNA e morte celular (BARREIROS et al, 2006; PLESSIS et al, 2008).

Níveis fisiológicos de espécies reativas possuem um papel fundamental no processo reprodutivo, participando da interação oócito-espermatozóide, na implantação e no desenvolvimento embrionário pré e pós implantação (SAKKAS et al, 1995; NAVARRO et al., 2004; 2006; AGARWAL et al, 2008). Evidências tem apontado que o desequilíbrio entre a formação de radicais oxidantes e a produção de moléculas antioxidantes tem afetado o sucesso quanto a obtenção de gestação em tratamentos de RA (AGARWAL et al, 2006; GUERIN et al, 2001; GOTO et al, 1993).

Estudos têm demonstrado que o estresse oxidativo está envolvido nas alterações metabólicas e reprodutivas encontradas em pacientes com SOP (FERDA VERIT et al., 2007; ZHANG et al., 2006) e que estas pacientes apresentam piores resultados em tratamentos de RA (HEIJNEN et al, 2006). Temos evidências de que a resposta exacerbada às gonadotrofinas exógenas administradas para a indução da ovulação, elevando a concentração de estrogênio e androgênio séricos, poderia alterar a receptividade uterina (VALBUENA et al, 1999; WANG et al, 2001). Por outro lado, as concentrações elevadas de hormônio luteinizante (LH) na fase folicular, interferindo na foliculogênese, poderiam resultar em oócitos de pior qualidade (HOWLES et al., 1986; REGAN et al., 1990; STANGER et al., 1985). Tanto o comprometimento endometrial, como o, da qualidade oocitária poderiam estar envolvidos na gênese das supostas maiores taxas de abortamento, relatadas por alguns autores. Estudos têm mostrado que o comprometimento da qualidade do endométrio pode estar associado ao aumento dos níveis de ROS em pacientes com SOP (PALACIO et al., 2006), que o dano

oxidativo por meio da peroxidação lipídica, evidenciada pela elevação dos níveis séricos de MDA, pode afetar o sistema reprodutivo nestas pacientes (PALACIO et al., 2006), e que a elevação da capacidade antioxidante total foi o melhor preditor de resistência à indução da ovulação com citrato de clomifeno (FERDA VERIT et al., 2007). Em conjunto, estes dados sugerem que o estresse oxidativo participa da modulação da resposta ovulatória e do sucesso gestacional nestas pacientes. Contudo, os resultados encontrados na literatura são escassos e controversos. As pacientes com SOP apresentam expressões fenotípicas e alterações metabólicas bastante variáveis, que poderiam justificar as divergências dos dados encontrados na literatura. O estudo de sub-grupos de pacientes, potencialmente auxiliaria na elucidação destas controvérsias acerca do papel do estresse oxidativo no sistema reprodutivo de pacientes inférteis com SOP.

A definição das causas que levam a piores resultados nos procedimentos de RA em pacientes com SOP, especialmente, a identificação de subgrupos com pior prognóstico reprodutivo, parece ser um passo importante no sentido de auxiliar o embasamento de estratégias terapêuticas específicas. Neste sentido, a análise de marcadores de estresse oxidativo em pacientes com SOP, em ciclos naturais e estimulados com gonadotrofinas, seria de especial interesse.

Alguns estudos evidenciaram correlação positiva entre determinados níveis de espécies reativas de oxigênio e a atividade da glutathione peroxidase no fluido folicular e as taxas de gestação após procedimentos de reprodução assistida (ATTARAN et al, 2000; PASZKOWSKI et al, 1995). Há evidências de correlação positiva de marcadores de estresse oxidativo no fluido folicular e no soro (APASSAMY et al., 2008), com a particularidade de maior facilidade na obtenção de amostras de sangue, favorecendo a sua aplicabilidade clínica. Como os níveis séricos fisiológicos de espécies reativas e antioxidantes, em ciclos naturais e estimulados, não são conhecidos, é possível que a análise conjunta de diferentes marcadores

de estresse oxidativo, tanto no soro, como no fluido folicular, forneça subsídios para o melhor entendimento da etiopatologia da resposta ovariana exacerbada à estimulação com gonadotrofinas e da piora potencial da fertilização relacionada à SOP.

Tem sido demonstrado que o malondialdeído está presente em maiores níveis no soro de pacientes com SOP (MOHAMADIN et al., 2009) e que este marcador pode estar relacionado a piores resultados em tratamentos de RA, como menores taxas de implantação, já que é indicativo de dano às membranas e seus níveis mostram-se tão aumentados quanto os de anticorpos anti-endométrio encontrados neste grupo de pacientes (PALACIO et al., 2006).

Evidenciamos níveis significativamente maiores de MDA no soro de pacientes inférteis com SOP, na fase folicular precoce do ciclo que antecedeu a estimulação ovariana com gonadotrofinas. Este dado sugere a presença de estresse oxidativo sistêmico em portadoras de SOP quando comparadas a pacientes com infertilidade por fatores masculino e/ou tubário, em ciclos não estimulados, concordante com outros estudos (KAYA et al, 2009; MOHAMADIN et al., 2009; SABUNCU et al, 2001). Pela primeira vez, analisou-se a dinâmica deste marcador de estresse oxidativo após bloqueio hipofisário com agonista do GnRH e durante a estimulação ovariana controlada, comparando-se pacientes inférteis com SOP e inférteis por fator tubário e/ou masculino. Pela análise intergrupos, evidenciamos níveis de MDA mais elevados no soro de pacientes com SOP, no dia da administração do hCG e no dia da captação oocitária. Todavia, considerando a avaliação intra-grupo, não observamos variação significativa da peroxidação lipídica no soro de pacientes com SOP após bloqueio hipofisário com agonista do GnRH e ao longo da estimulação ovariana com gonadotrofinas, sugerindo que estas pacientes apresentam elevação sistêmica da peroxidação lipídica em condições basais (ciclos não estimulados), que persiste inalterada durante a estimulação ovariana. Ainda com relação aos níveis de MDA, foi constatada uma correlação positiva leve entre os valores encontrados no soro coletado na fase folicular precoce do ciclo,

e no fluido folicular. Este achado corrobora os resultados encontrados em outros trabalhos, que também mostram correlação entre os níveis séricos e foliculares de marcadores de estresse oxidativo (APASSAMY et al., 2008).

Pela análise intergrupos, não observamos diferença significativa entre os demais marcadores de estresse oxidativo analisados (AOPP, hidroperóxidos, glutatona e vitamina E) na fase folicular precoce do ciclo, após bloqueio hipofisário e durante a estimulação ovariana controlada com gonadotrofinas comparando-se pacientes inférteis com SOP e controles. Todavia, similarmente ao encontrado para o MDA, observamos uma tendência a maiores níveis sistêmicos de AOPP em ciclos não estimulados de pacientes com SOP, concordante com alguns estudos que demonstraram a ocorrência de estresse oxidativo neste grupo de pacientes, que apresentaram níveis séricos de AOPP ou grupamentos carbonila (FENKCi et al, 2003; KAYA et al, 2009) e MDA mais elevados (KAYA et al, 2009; SABUNCU et al, 2001). Conjuntamente, estes dados sugerem que pacientes com SOP apresentam estresse oxidativo sistêmico em condições basais (ciclos não estimulados), caracterizado tanto pelo aumento da peroxidação lipídica, como protéica, que persistem inalteradas durante a estimulação ovariana com gonadotrofinas.

Constatamos também que os níveis médios de vitamina E, apesar de não terem apresentado diferença significativa, mostraram-se mais elevados no grupo SOP em comparação com o grupo controle, na fase folicular precoce do ciclo, após bloqueio hipofisário com gonadotrofinas e durante a estimulação ovariana controlada com gonadotrofinas. É possível que os níveis séricos deste antioxidante no grupo SOP estejam mais altos na tentativa de neutralizar a propagação da peroxidação lipídica por meio da quebra do lipídio hidroperóxido. A neutralização de radicais como o MDA, durante a etapa de terminação é realizada pela ação de antioxidantes lipossolúveis como a vitamina E sob a forma de α -tocoferol (VASCONCELOS et al, 2007). Observamos uma íntima correlação

negativa entre os níveis séricos de vitamina E na fase folicular precoce do ciclo menstrual e no fluido folicular nas pacientes com SOP.

A GSH, que desempenha um papel fundamental na neutralização de peróxidos (DEMATOS, 2000), não apresentou diferença significativa em seus níveis na comparação entre os grupos SOP e Controle, porém seus valores médios apresentaram-se maiores no grupo SOP e foram aumentando ao longo da estimulação ovariana em ambos os grupos, sendo mais elevados no fluido folicular. Na comparação de seus níveis no soro com os níveis no fluido folicular, encontramos diferença significativa ao longo de toda a estimulação ovariana no grupo SOP e no grupo Controle e também uma correlação positiva moderada dos valores de GSH no soro coletado na fase folicular precoce do ciclo que antecedeu a estimulação ovariana com o fluido neste último grupo. É possível que não tenhamos encontrado esta correlação também no grupo SOP, porque o n amostral analisado foi pequeno. Este marcador é responsável pela eliminação indireta do tocoferol oxidado e é importante para a reciclagem e manutenção de níveis fisiológicos de vitamina E (NWOSE et al.; 2008). Acreditamos que o aumento de GSH ao longo da estimulação, possa contribuir para a manutenção de níveis adequados de vitamina E em ambos os grupos na tentativa de combater o EO gerado, que pode interferir no sucesso do tratamento de RA. Esta contribuição é importante principalmente para o grupo SOP, que mostrou níveis estatisticamente mais elevados de MDA. Os níveis médios maiores de vitamina E no grupo SOP concordam com os níveis médios também maiores de GSH, que possivelmente, como explicado anteriormente, estão agindo na manutenção de níveis adequados de vitamina E, buscando combater a peroxidação lipídica. Além disso, sabe-se que a síntese de glutathione aumenta durante todo o processo de desenvolvimento e maturação oocitária até o estágio de folículo peri-ovulatório (PERREAULT et al, 1984), sendo considerada preditora indireta de aquisição de competência oocitária para o desenvolvimento embrionário (FERREIRA et al., 2009). Os valores mais

elevados de glutathiona no fluido folicular em relação ao soro, observado em ambos os grupos, poderiam ser indicativos de boa qualidade oocitária, o que precisa ser mais bem analisado por meio de estudos específicos.

No presente estudo não evidenciamos diferença significativa nos níveis médios de hidroperóxidos entre as pacientes inférteis com SOP e controles. Todavia, a dinâmica deste marcador foi distinta nos dois grupos após bloqueio hipofisário e durante a estimulação ovariana com gonadotrofinas. No grupo controle, os níveis de hidroperóxidos apresentaram-se significativamente mais elevados no soro da fase folicular precoce do ciclo e no fluido folicular em relação aos demais tempos de análise, apresentando uma tendência a diminuição durante a estimulação ovariana. No grupo SOP, observamos um comportamento completamente invertido deste marcador, em relação ao grupo controle. Neste grupo, os níveis de hidroperóxidos encontrados no soro da fase folicular precoce do ciclo e no fluido folicular tenderam a ser menores do que os dos demais tempos de análise, apresentando uma tendência a elevação durante a estimulação ovariana.

Apesar do IMC das pacientes do grupo SOP ter sido estatisticamente maior que o das pacientes do grupo Controle, excluímos pacientes obesas do presente estudo, já que a obesidade é uma variável associada ao aumento das falhas de implantação embrionária e taxas de abortamento. A ampliação da presente casuística permitirá a subdivisão das pacientes entre magras e com sobrepeso para a avaliação das diferentes variáveis analisadas no estudo. O volume ovariano esquerdo e o número de folículos antrais foi maior no grupo SOP, ao passo que a dose total de FSH utilizada para a estimulação ovariana foi menor, o que é consoante com outros estudos publicados (HEIJNEN et al., 2006).

Em relação aos resultados de RA, que incluíram a resposta à estimulação ovariana, taxas de fertilização e clivagem embrionária, formação de embriões de boa qualidade no segundo e terceiro dia de desenvolvimento, e taxas de gestação química e clínica, não

verificamos diferenças entre os grupos estudados. É possível que o n amostral reduzido do grupo SOP seja uma das razões para não termos observado diferenças nestes resultados. Todavia, acreditamos que neste subgrupo específico de portadoras de SOP, ou seja, pacientes não obesas, não ocorra diferença entre a resposta à estimulação ovariana e os resultados da ICSI, o que precisa ser mais bem avaliado em estudos com maiores casuísticas.

A casuística apresentada no grupo SOP é pequena em comparação a do grupo controle. Ressaltamos que, atualmente, a realização de fertilização *in vitro* é recomendada como terceira linha no tratamento destas pacientes (THE THESSALONIKI ESHRE/ASRM-SPONSORED PCOS CONSENSUS WORKSHOP GROUP, 2008) o que, aliado aos rígidos critérios de inclusão e exclusão, limitaram o número de pacientes elegíveis para o presente estudo. Mas, convém salientar que todas as pacientes elegíveis ao longo do período de inclusão, aceitaram participar do estudo, eliminando o potencial viés relativo à inclusão.

Observamos aumento significativo da peroxidação lipídica no soro de pacientes com SOP não obesas em relação ao grupo Controle, em ciclos não estimulados, sugerindo a presença de estresse oxidativo sistêmico nestas pacientes. Todavia neste grupo de pacientes, não detectamos variações significativas da peroxidação lipídica sérica após bloqueio hipofisário com agonistas do GnRH ou estimulação ovariana com gonadotrofinas, diferentemente do grupo Controle que apresentou elevação significativa tanto do MDA, como do AOPP, após bloqueio hipofisário e do AOPP durante a estimulação ovariana.

Hipotetizamos que eventos relacionados ao estresse oxidativo sistêmico em ciclos não estimulados em pacientes com SOP possam participar das alterações na foliculogênese e repercussões metabólicas associadas a esta doença. Todavia no subgrupo de pacientes avaliado não observamos variação significativa dos marcadores de EO após bloqueio hipofisário e durante a estimulação ovariana com gonadotrofinas, diferentemente das pacientes com infertilidade por fator tubário e/ou masculino, em que houve associação positiva entre o

bloqueio hipofisário e a estimulação e o aumento dos marcadores séricos de EO. Ressaltamos que os níveis foliculares dos marcadores de EO foram similares entre os grupos avaliados. Em conjunto, estes dados sugerem que não haja estresse oxidativo a nível ovariano justificando a similaridade dos resultados encontrados entre os dois grupos de pacientes. As pacientes com SOP apresentem estresse oxidativo sistêmico, que se reflete em níveis mais elevados de MDA no soro em ciclos não estimulados em relação a pacientes com infertilidade por fator tubário e/ou masculino. É possível que este EO sistêmico possa participar das repercussões reprodutivas e metabólicas neste grupo de pacientes e que estes eventos repercutam em alterações de foliculogênese, ovulação, piora da qualidade oocitária e menores taxas de fertilização em grupos específicos de pacientes com esta síndrome heterogênea. Porém, no subgrupo de pacientes SOP não obesas, os resultados em tratamentos de RA são compatíveis com pacientes sem a síndrome, já que fatores como a obesidade também parecem estar relacionadas a estresse oxidativo, infertilidade e resultados de procedimentos de RA.

Acreditamos que níveis adequados de agentes oxidantes e antioxidantes sejam necessários para aquisição de competência oocitária e embrionária, e, conseqüentemente, para o sucesso gestacional. Entretanto, as interpretações acerca da ação do estresse oxidativo sobre os resultados de RA na SOP ainda não estão muito claras e as implicações reprodutivas do estresse oxidativo precisam ser mais bem avaliadas. Se constatada a correlação entre a presença de estresse oxidativo em nível sérico e/ou folicular em mulheres inférteis submetidas a procedimentos de reprodução assistida e piores resultados em tratamentos de RA, este fato poderia contribuir para o esclarecimento de possíveis causas de insucesso no tratamento e abriria perspectivas para novas abordagens terapêuticas no tratamento da infertilidade, incluindo a elaboração de estudos clínicos controlados e randomizados utilizando a suplementação sistêmica de antioxidantes.

7. Conclusão

Com base nos achados do presente estudo concluímos que houve aumento significativo da peroxidação lipídica, evidenciado por níveis mais elevados de MDA no soro de pacientes com SOP não obesas em relação ao grupo controle, em ciclos não estimulados, sugerindo a presença de estresse oxidativo sistêmico nestas pacientes. Similarmente, observamos uma tendência a maiores níveis sistêmicos de AOPPs.

Não foi observado diferença significativa entre os demais marcadores de estresse oxidativo analisados (AOPP, hidroperóxidos, glutaciona e vitamina E) na fase folicular precoce do ciclo, após bloqueio hipofisário com agonistas do GnRH e durante a estimulação ovariana controlada com gonadotrofinas, tampouco no fluido folicular, comparando-se pacientes inférteis com SOP e controles.

Não detectamos variações significativas dos cinco marcadores de estresse oxidativo analisados, após bloqueio hipofisário com agonistas do GnRH ou estimulação ovariana com gonadotrofinas, nas pacientes com SOP.

Nas pacientes do grupo controle, observou-se elevação significativa dos valores séricos de MDA e AOPP, e redução do total de hidroperóxidos, após bloqueio hipofisário com agonistas do GnRH, quando comparados aos valores da fase folicular precoce do ciclo anterior. Observou-se também que a elevação significativa dos valores séricos de MDA e a redução do total de hidroperóxidos persistiu durante a estimulação ovariana com gonadotrofinas.

Não observamos diferença significativa entre os resultados de ICSI entre os dois grupos analisados.

Referências Bibliográficas

Acién P, Quereda F, Matallín P, Villarroya E, López-Fernández JA, Acién M, Mauri M, Alfayate R. Insulin, androgens, and obesity in women with and without polycystic ovary syndrome: a heterogeneous group of disorders. *Fertil Steril*. 1999;72(1):32-40.

Agarwal A, Gupta S, Sekhon L, Shah R. Redox considerations in female reproductive function and assisted reproduction: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10(8):1375-403.

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

Agarwal A, Gupta S, Sharma R. Oxidative stress and its implications in female infertility – a clinician’s perspective – Review. *Reproductive BioMedicine Online*. 2005; 11(5). 641–650 b

Agarwal A, Said TM, Bedaiwy MA, Banerjee J, Alvarez JG. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. *Fertil Steril* 2006; 86(3):503-12.

Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 2003;79: 829–43.

Al Mehdi AB, Dodia C, Jain MK, Fisher AB. A phospholipase A2 inhibitor decreases generation of thiobarbituric acid reactive substances during lung ischemia-reperfusion. *Biophys. Biochim. Acta*. 1993;1166:56-62.

Apassamy M, Jauniaux E, Serhal P, Al-Qahtani A, Groome NP, Muttukrishna S. Evaluation of the relationship between follicular fluid oxidative stress, ovarian hormones, and response to gonadotropin stimulation. *Fertil Steril* 2008; 89(4):912-21.

Arnaud J, Fortis I, Blachier S, Kia D, Favier A. Simultaneous determination of retinol, a - tocopherol and b -carotene in serum by isocratic high performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1991; 572:103-6.

Ashkenazi J, Farhi J, Orvieto R, Homburg R, Dekel A, Feldberg D, Ben Rafael Z. Polycystic ovary syndrome patients as oocyte donors: the effect of ovarian stimulation protocol on the implantation rate of the recipient. *Fertil Steril*. 1995; 64(3):564-7.

Attaran M, Pasqualotto E, Falcone T, Goldberg JM, Miller KF, Agarwal A, et al. The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of in vitro fertilization. *Int J Fertil Womens Med* 2000; 45:314–20.

Babior BM. Superoxide: a two-edged sword. *Bras J Biol Res* 1997; 30: 141-155.

Barreiros ALBS, David JM, David JP. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim Nova* 2006; 29(1):113-23.

Benzie IFF. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. *Int. J. Food Sci. Nut.* 1996; 47: 233-261.

Bornoden WR. Antioxidant nutrients and protection from free radicals. In: Kotsonis FN, Mackey M, Hjelle JJ (eds). *Nutritional Toxicology*. New York, Raven Press 1994; 19-48.

Calvin HI, Grosshans K, Blake EJ. Estimation and manipulation of glutathione levels in prepuberal mouse ovaries and ova: relevance to sperm nucleus transformation in the fertilized egg. *Gamete Res* 1986;14:265-275.

Campos Petean C, Ferriani RA, Dos Reis RM, Dias de Moura M, Jordão AA Jr, Andrea de Albuquerque Salles Navarro P. Lipid peroxidation and vitamin E in serum and follicular fluid of infertile women with peritoneal endometriosis submitted to controlled ovarian hyperstimulation: a pilot study. *Fertil Steril*. 2008; 90(6): 2080-5.

Carmina E. Polycystic ovary syndrome: an update on diagnostic evaluation. *Indian Med Assoc.* 2006. 104(8):439-40, 442-444.

Costa CM, Santos RCC, Lima ES. A simple automated procedure for thiol measurement in human serum samples. *J Bras Patol Med Lab.* 2006; 42(5): 345-50.

De Matos DG, Furnus CC, Moses DF. Glutathione synthesis during in vitro maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. *Biol Reprod.* 1997; 57(6):1420-5.

De Matos DG, Furnus CC. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development effect of beta-mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology.* 2000;53(3):761-71.

Dor J, Shulman A, Levran D, Ben-Rafael Z, Rudak E, Mashiach S. The treatment of patients with polycystic ovarian syndrome by in-vitro fertilization and embryo transfer: a comparison of results with those of patients with tubal infertility. *Hum Reprod.* 1990; 5(7):816-8.

Ehrmann DA. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med.* 2005. 24;352(12):1223-36.

Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem.* 2004; 37:112-9.

Farquhar C, Vandekerckhove P, Lilford R. Laparoscopic "drilling" by diathermy or laser for ovulation induction in anovulatory polycystic ovary syndrome. *Cochrane Database Syst Rev.* 2001;(4):CD001122.

Fenkci V, Fenkci S, Yilmazer M, Serteser M. Decreased total antioxidant status and increased oxidative stress in women with polycystic ovary syndrome may contribute to the risk of cardiovascular disease. *Fertil Steril.* 2003; 80(1): 123-27.

Ferda Verit F, Erel O, Kocyigit A. Association of increased total antioxidant capacity and anovulation in nonobese infertile patients with clomiphene citrate-resistant polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2007; 88(2):418-24.

Fedorcsák P, Dale PO, Storeng R, Tanbo T, Abyholm T. The impact of obesity and insulin resistance on the outcome of IVF or ICSI in women with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod.* 2001;16(6):1086-91.

Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA, Navarro PAAS. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology* 2009; 71 836–848.

Fujii J, Iuchi Y, Okada F. Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 3: 43.

Gardner HW. Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. *Free Radical Biol. Med.* 1989;7:65-86.

Giudice LC. Endometrium in PCOS: Implantation and predisposition to endocrine CA. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2006; 20(2):235-44.

Goto Y, Noda Y, Mori T, Nakano M. Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured in vitro. *Free Radic Biol Med* 1993;15:69-75.

Grochowski D, Kulikowski M, Wołczyński S, Kuczyński W, Szamatowicz M. The outcome of an in vitro fertilization program in women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol.* 1997; 11(4):259-62

Guerin P, El Mouatassim S, Menezo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update* 2001;7:175-89.

Halliwell, B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine.* 2nd ed. New York: Oxford University Press; 1989.

Hardy K, Robinson FM, Paraschos T, Wicks R, Franks S, Winston RM. Normal development and metabolic activity of preimplantation embryos in vitro from patients with polycystic ovaries. *Hum Reprod.* 1995;10(8):2125-35.

Heijnen EM, Eijkemans MJ, Hughes EG, Laven JS, Macklon NS, Fauser BC. A meta-analysis of outcomes of conventional IVF in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update* 2006.12(1):13-21.

Homburg R, Berkowitz D, Levy T, Feldberg D, Ashkenazi J, Ben-Rafael Z. In vitro fertilization and embryo transfer for the treatment of infertility associated with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 1993; 60(5):858-63.

Homburg R, Howles CM. Low-dose FSH therapy for anovulatory infertility associated with polycystic ovary syndrome: rationale, results, reflections and refinements. *Hum Reprod Update* 1999; 5(5): 493-9.

Howles CM, Macnamee MC, Edwards RG, Goswamy R, Steptoe PC. Effect of high tonic levels of luteinising hormone on outcome of in-vitro fertilisation. *Lancet.* 1986; 30;2(8505):521-2.

Imai H. Biological significance of lipid hydroperoxide and its reducing enzyme, phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, in mammalian cells. *Yakugaku Zasshi.* 2004; 124(12):937-57.

Kalousová M, Skrha J, Zima T. Advanced Glycation End-Products and Advanced Oxidation Protein Products in Patients with Diabetes Mellitus. *Physiol. Res.* 2002. 51: 597-604.

Katsiki N, Manes CH. Is there a role for supplemented antioxidants in the prevention of atherosclerosis? *Clin Nutr*. 2009. 28: 3-9.

Kaya C, Erkan AF, Cengiz SD, Dunder I, Demirel OE, Bilgihan A. Advanced oxidation protein products are increased in women with polycystic ovary syndrome: relationship with traditional and nontraditional cardiovascular risk factors in patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2009; 94(4): 1372-7.

Kelly C, Speirs A, Gould G, Petrie J, Lyall H, Connell J. Altered vascular function in young women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:742-6.

Kingsley PD, Whitin JC, Cohen HJ, Palis J. Developmental expression of extracellular glutathione peroxidase suggests antioxidant roles in deciduum, visceral yolk sac, and skin. *Mol Reprod Dev*. 1998; 49(4):343-55.

Lima ES, Abdalla DSP. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2001; 37(3): 293-303.

Lord JM, Flight IH, Norman RJ. Metformin in polycystic ovary syndrome: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2003; 25;327(7421):951-3.

Ludwig M, Finas DF, al-Hasani S, Diedrich K, Ortmann O. Oocyte quality and treatment outcome in intracytoplasmic sperm injection cycles of polycystic ovarian syndrome patients. *Hum Reprod* 1999; 14(2): 354-8.

Meister A. Selective modification of glutathione metabolism. *Science*. 1983; 220:472-477.

Mitwally MF, Casper RF. Use of an aromatase inhibitor for induction of ovulation in patients with an inadequate response to clomiphene citrate. *Fertil Steril*. 2001; 75(2):305-9.

Miyara F, Aubriot FX, Glissant A, Nathan C, Douard S, Stanovici A, Herve F, Dumont-Hassan M, LeMeur A, Cohen-Bacrie P, Debey P. Multiparameter analysis of human oocytes at Metaphase II stage after IVF failure in non-male infertility. *Hum Reprod* 2003 Jul;18(7):1494-503.

Mohamadin AM, Habib FA, Elahi TF. Serum paraoxonase 1 activity and oxidant/antioxidant status in Saudi women with polycystic ovary syndrome. *Pathophysiology*. 2009 Dec 16. [Epub ahead of print]

Mulders AG, Laven JS, Imani B, Eijkemans MJ, Fauser BC. IVF outcome in anovulatory infertility (WHO group 2)--including polycystic ovary syndrome--following previous unsuccessful ovulation induction. *Reprod Biomed Online*. 2003; 7(1):50-8.

Navarro PA, Liu L, Ferriani, RA, Keefe DL. Arsenite induces aberrations in meiosis that can be rescued by co-administration of N-acetylcysteine in mice. *Fertil Steril*. 2006; 85(1): 1187-94.

Navarro PA, Liu L, Keefe DL. In vivo effects of arsenite on meiosis, preimplantation development, and apoptosis in the mouse. *Biol Reprod*. 2004; 70(4): 980-5.

Nwose EU, Jelinek HF, Richards RS, Kerr PG. The vitamin E regeneration system (VERS) and an algorithm to justify antioxidant supplementation in diabetes - A hypothesis. *Medical Hypotheses*. 2008;70(5):1002-8.

Palacio JR, Ulcova-Gallova Z, Badia R, Martínez P. The presence of antibodies to oxidative modified proteins in serum from polycystic ovary syndrome patients. *British Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology*. 2006; 144: 217-222.

Paszkowski T, Traub AI, Robinson SY, McMaster D. Selenium dependent glutathione peroxidase activity in human follicular fluid. *Clin Chim Acta* 1995; 236:173-80.

Patel SS, Carr BR. Oocyte quality in adult polycystic ovary syndrome. *Semin Reprod Med*. 2008; 26(2):196-203.

Peñarrubia J, Fabregues F, Manau D, Creus M, Casals G, Casamitjana R, Carmona F, Vanrell JA, Balasch J. Basal and stimulation day 5 anti-Mullerian hormone serum concentrations as predictors of ovarian response and pregnancy in assisted reproductive technology cycles stimulated with gonadotropin-releasing hormone agonist--gonadotropin treatment. *Hum Reprod*. 2005; 20(4):915-22.

Perreault SD, Barbee RR, Slott VI. Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. *Dev Biol* 1988; 125:181-186.

Perreault SD, Wolff RA, Zirkin BR. The role of disulfide bond reduction during mammalian sperm nuclear decondensation in vivo. *Dev Biol* 1984; 101:160-167.

Plessis SSD, Makker K, Desai NR, Agarwal A. Impact of oxidative stress on IVF. *Expert Rev Obstet Gynecol* 2008; 3(4): 539-54.

Porter NA, Caldwell SE, Mills KA. Mechanism of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids*. 1995; 30(4):277-290.

Regan L, Owen EJ, Jacobs HS. Hypersecretion of luteinising hormone, infertility, and miscarriage. *Lancet*. 1990; 336(8724):1141-4.

Ruder EH, Hartman TJ, Blumberg J, Goldman MB. Oxidative stress and antioxidants: exposure and impact on female fertility. *Human Reproduction Update*. 2008; 14(4):345-357.

Sabuncu T, Vural H, Harma M, Harma M. Oxidative stress in polycystic ovary syndrome and its contribution to the risk of cardiovascular disease. *Clin Biochem* 2001; 34:407–13.

Sahu B, Ozturk O, Ranierrri M, Serhal P. Comparison of oocyte quality and intracytoplasmic sperm injection outcome in women with isolated polycystic ovaries or polycystic ovarian syndrome. *Arch Gynecol Obstet*. 2008;277(3):239-44.

Sakkas D, Manicardi G, Bianchi PG, Bizzaro D, Bianchi U. Relationship between the Presence of Endogenous Nicks and Sperm Chromatin Packaging in Maturing and Fertilizing Mouse Spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 1995; (52): 1149-1155.

Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, El-Tonsy MH, Sharma RK, Meyer A, et al. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertil Steril* 2003;79(Suppl 3):1597– 605.

Shanti A, Santanam N, Morales AJ, Parthasarathy S, Murphy AA. Autoantibodies to marker of oxidative stress are elevated in women with endometriosis. *Fertil Steril* 1999; 71:1115–8.

Sikka SC. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *J Androl* 2004; 25:5-18.

Sengoku K, Tamate K. The chromosomal normality of unfertilized oocytes from patients with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod* 1997;12(3):474-7.

Stanger JD, Yovich JL. Reduced in-vitro fertilization of human oocytes from patients with raised basal luteinizing hormone levels during the follicular phase. *Br J Obstet Gynaecol*. 1985; 92(4):385-93.

The Rotterdam ESHRE/ASRM-sponsored PCOS consensus workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2004; 81: 19–25.

The Thessaloniki ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Consensus on infertility treatment related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2008; 89(3):505-22.

Urman B, Fluker MR, Yuen BH, Fleige-Zahradka BG, Zouves CG, Moon YS. The outcome of in vitro fertilization and embryo transfer in women with polycystic ovary syndrome failing to conceive after ovulation induction with exogenous gonadotropins. *Fertil Steril*. 1992; 57(6):1269-73.

Urman B, Tiras B, Yakin K. Assisted reproduction in the treatment of polycystic ovarian syndrome. *Reprod Biomed Online*. 2004; 8(4):419-30.

Valbuena D, Jasper M, Remohí J, Pellicer A, Simón C. Ovarian stimulation and endometrial receptivity. *Hum Reprod*. 1999; 14 Suppl 2:107-11.

Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V; Benfato MS, Kubota L. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim Nova* 2007; 30(5):1323-328.

Yoshida M. Role of glutathione in the maturation and fertilization of pig oocytes in vitro. *Mol Reprod Dev* 1993; 35:76-81.

Zadák Z, Hyspler R, Tichá A, Hronek M, Fikrová P, Rathouská J, Hrnčiariková, Stetina R. Antioxidants and Vitamins in Clinical Conditions. *Physiol. Res*. 2009;58(1):S13-S17.

Zhang X, Li XH, Ma X, Wang ZH, Lu S, Guo YL. Redox-induced apoptosis of human oocytes in resting follicles in vitro. *J Soc Gynecol Investig* 2006; 13(6): 451-8.

Zingg J-M. Review: Vitamin E: An overview of major research directions. *Molecular Aspects of Medicine*. 2007; 28:400-422.

Wang JX, Davies MJ, Norman RJ. Polycystic ovarian syndrome and the risk of spontaneous abortion following assisted reproductive technology treatment. *Hum Reprod.* 2001; 16(12):2606-9.

Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, Jungers P, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.* 1996; 49(5):1304-13.

Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen-Khoa T, Capeillère-Blandin C, Nguyen AH, Canterloup S, Dryer JM, Jungers P, Drueke T, Deschamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products as novel mediator of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol.* 1998. 161: 2524-2532.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)