

JHENIFER KLIECHEN RODRIGUES¹
LUCIANA AZÒR DIB²
RUI ALBERTO FERRIANI³
ALCEU AFONSO JORDÃO JUNIOR⁴
PAULA ANDREA DE ALBUQUERQUE SALES
NAVARRO⁵

Marcadores séricos de estresse oxidativo e resultados dos procedimentos de reprodução assistida em pacientes inférteis com síndrome dos ovários policísticos e controles

Serum markers of oxidative stress and assisted reproduction procedures results in infertile patients with polycystic ovary syndrome and controls

Artigo original

Palavras-chave

Estresse oxidativo
Infertilidade feminina
Indução da ovulação
Síndrome do ovário policístico
Técnicas reprodutivas assistidas

Keywords

Oxidative stress
Infertility, female
Ovulation induction
Polycystic ovary syndrome
Reproductive techniques, assisted

Resumo

OBJETIVO: comparar os níveis séricos de cinco marcadores de estresse oxidativo e os resultados de reprodução assistida (RA), entre pacientes com infertilidade por fator tubário e/ou masculino e portadoras de síndrome dos ovários policísticos (SOP). **MÉTODOS:** foram incluídos 70 pacientes, sendo 58 com infertilidade por fator tubário e/ou masculino e 12 com SOP, que foram submetidas à estimulação ovariana controlada para realização de injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI). A coleta de sangue foi realizada entre o terceiro e o quinto dia do ciclo menstrual, no mês anterior à realização da estimulação ovariana. Foram analisados os níveis de malondialdeído, hidroperóxidos, produtos de oxidação proteica, glutatona e vitamina E, pela leitura da absorbância em espectrofotômetro e por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Para a análise estatística, utilizou-se o teste *t* de Student e o teste exato de Fisher. **RESULTADOS:** entre as pacientes com SOP, foi constatado maior índice de massa corporal, volume ovariano e número de folículos antrais e uma menor dose total utilizada de hormônio folículo estimulante. Não observamos diferença em relação à resposta à estimulação ovariana, aos resultados de RA e aos níveis séricos de malondialdeído, hidroperóxidos, produtos de oxidação proteica, glutatona e vitamina E entre os grupos. **CONCLUSÕES:** no estudo não evidenciamos diferença entre os níveis séricos de marcadores de estresse oxidativo, nem nos resultados de RA, comparando pacientes inférteis não-obesas com SOP e controles. Estes dados sugerem que, neste subgrupo específico de portadoras de SOP, os resultados de RA não estejam comprometidos. Todavia, as interpretações acerca da ação do estresse oxidativo sobre os resultados de RA ainda não estão claras e as implicações reprodutivas do estresse oxidativo precisam ser mais bem avaliadas.

Abstract

PURPOSE: to compare the serum levels of five markers of oxidative stress and assisted reproduction (AR) outcomes among infertile patients, with tubal and/or male factor and with polycystic ovary syndrome (PCOS). **METHODS:** 70 patients were included, 58 with tubal and/or male factor infertility and 12 with PCOS, who underwent controlled ovarian stimulation to perform intracytoplasmic sperm injection (ICSI). A blood sample was collected between the third and fifth day of the menstrual cycle in the month prior to ovarian stimulation. We analyzed the levels of malondialdehyde, hydroperoxides, protein oxidation products, glutathione and vitamin E, by reading the absorbance with a spectrophotometer and by high performance liquid chromatography (HPLC). Data were analyzed statistically by the Student's *t*-test and Fisher's exact test. **RESULTS:** significant increases in the body mass index, ovarian volume and number of antral follicles were observed in PCOS patients, as well as the use of a lower total dose of follicle stimulating hormone for these patients. There were no differences in the response to ovarian stimulation, in the results of AR or serum levels of malondialdehyde, hydroperoxides, advanced oxidation protein products, glutathione and vitamin E between groups. **CONCLUSIONS:** the present data did not demonstrate a difference in the levels of serum markers of oxidative stress or in AR results when comparing non-obese infertile patients with PCOS and controls. These data suggest that the results of AR may not be compromised in this specific subgroup of patients with PCOS. However, interpretations of the action of oxidative stress on the results of AR are still not clear and the reproductive implications of oxidative stress need to be better evaluated.

Correspondência:

Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro
Setor de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia
e Obstetria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo
Avenida Bandeirantes, 3.900 – Monte Alegre
CEP: 14049-900 – Ribeirão Preto (SP), Brasil.
Fone: (16) 3602-2821/ Fax: (16) 3602-2810
E-mail: pnavarra@fmrp.usp.br

Recebido

19/11/09

Aceito com modificações

15/1/10

Laboratório de Ginecologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Setor de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – USP. Laboratório de Nutrição e Metabolismo do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – USP – Ribeirão Preto (SP), Brasil.

¹ Pós-graduanda (Mestrado), Área de Concentração Biologia da Reprodução pelo Departamento de Ginecologia e Obstetria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP – Ribeirão Preto (SP), Brasil.

² Pós-graduanda (Mestrado), Área de Concentração Ginecologia e Obstetria pelo Departamento de Ginecologia e Obstetria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, Ribeirão Preto (SP), Brasil.

³ Professor Titular do Departamento de Ginecologia e Obstetria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, Ribeirão Preto (SP), Brasil.

⁴ Professor Doutor do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, Ribeirão Preto (SP), Brasil.

⁵ Professora Doutora do Departamento de Ginecologia e Obstetria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, Ribeirão Preto (SP), Brasil.

Financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – 2008/58197-6. FAPESP - 2008/52789-9.

Introdução

A síndrome dos ovários policísticos (SOP) é uma síndrome heterogênea caracterizada por hiperandrogenismo ovariano, hipersecreção do hormônio luteinizante (LH), ovários policísticos detectados com ultrassonografia, hiperinsulinemia decorrente de resistência insulínica e reduzido potencial reprodutivo¹. A expressão fenotípica variável de anomalias reprodutivas e metabólicas nas pacientes com SOP pode levar a diferenças na competência oocitária para o desenvolvimento²⁻⁵, definida como a capacidade do oócito em completar a meiose e possibilitar o desenvolvimento embrionário subsequente⁶. Apesar do uso cada vez mais frequente de técnicas de reprodução assistida (RA) para o tratamento da infertilidade relacionada à SOP, ainda é incerto se o sucesso destes procedimentos difere entre pacientes com e sem esta síndrome. Alguns autores relataram menores taxas de fertilização e maior incidência de aborto espontâneo depois de RA em pacientes com SOP^{3,7}. O papel da receptividade do endométrio comprometida e da qualidade dos oócitos em contribuir para os efeitos deletérios da SOP na fertilidade feminina está sendo questionado^{8,4}. Postula-se que altas concentrações de LH, durante a fase folicular⁹, assim como outras alterações endócrinas e metabólicas associadas com essa síndrome possam interferir na foliculogênese, resultando em oócitos de pior qualidade.

Na SOP questiona-se a presença de comprometimento na qualidade oocitária¹⁰ relacionado à anomalia na foliculogênese, caracterizada pela diminuição da apoptose nos estágios iniciais do crescimento folicular, gerando um número maior de folículos e conseqüente aumento da síntese de andrógenos, que leva à atresia folicular. Há relatos de que os antioxidantes exerceriam um efeito antiapoptótico em folículos pré-ovulatórios cultivados *in vitro*¹¹, podendo participar desta alteração da foliculogênese associada à SOP. Existem dados evidenciando também que os antioxidantes desempenham um importante papel tanto na síntese de colágeno, essencial para a construção da membrana basal ao longo do crescimento folicular, como na biossíntese de androgênios induzida pelo LH. Os antioxidantes estão envolvidos na regulação da função de enzimas esteroidogênicas dependentes do citocromo P450¹². Tanto o ácido ascórbico como a superóxido dismutase (SOD) 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 folicular¹³⁻¹⁵. Corroborando estes achados, Verit, Erel e Kocyigit¹⁵ demonstraram que a capacidade antioxidante total (CAT) apresentou-se como o melhor fator preditivo para ausência de resposta à indução da ovulação com citrato de clomifeno (CC), encontrando-se significativamente mais elevada nas pacientes não-respondedoras, reforçando o potencial efeito detrimental da alteração no balanço de antioxidantes para a ovulação.

Questiona-se, assim, o 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 SOP, no comprometimento da qualidade oocitária¹⁶⁻²¹ e na piora dos resultados de procedimentos de RA^{15,21}.

Os principais alvos do EO são o DNA, as proteínas e os lipídeos¹⁶. Os produtos de oxidação proteica (AOPP) têm sido considerados novos marcadores de oxidação e dano às proteínas, podendo ser utilizados para estimar o dano oxidativo proteico^{22,23}. 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^{24,25}. Em contrapartida, a vitamina E, sobretudo na forma de α -tocoferol, pode tanto bloquear o início da peroxidação lipídica, como inibir, primariamente, a etapa de propagação da PL, sendo conhecida como um eficiente antioxidante²⁶. A glutatona (GSH), principal componente sulfidril não-proteico, em células de mamíferos, desempenha um papel fundamental na neutralização de peróxidos, na reciclagem e na manutenção de níveis fisiológicos de vitamina E²⁷ e na proteção celular ao estresse oxidativo²⁸. Os níveis de hidroperóxidos podem indicar indiretamente a atividade do superóxido dismutase (SOD)²⁹, quando aumentados sugerem o aumento potencial de produção de espécies reativas, além de serem moléculas importantes nos mecanismos de sinalização celular³⁰.

Em virtude da potencial influência do EO na piora da qualidade oocitária e dos indícios de sua associação com a SOP, propomos comparar os níveis séricos de cinco marcadores de EO entre pacientes com infertilidade por fator tubário e/ou masculino e portadoras de SOP e comparar estes dois grupos quanto à resposta à estimulação ovariana e aos resultados de RA.

Métodos

Foi realizado um estudo prospectivo e controlado no Laboratório de Ginecologia do Setor de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP-USP e no Laboratório de Nutrição e Metabolismo, Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo (USP), no estado de São Paulo. Foram incluídos no estudo todos os casais submetidos à indução da ovulação para a realização de injeção intracitoplasmática de espermatozoide (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, consecutivamente, 70 pacientes, sendo 58 com infertilidade por fator tubário e/ou masculino e 12 com SOP, as quais foram submetidas à estimulação ovariana controlada para realização de ICSI.

Os critérios de inclusão foram: idade igual ou inferior a 38 anos, índice de massa corporal (IMC) menor do que 30 kg/m², 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 propeidética da investigação de infertilidade. Foram excluídas pacientes com *diabetes mellitus* ou quaisquer outras endocrinopatias, doença cardiovascular, dislipidemia, lúpus eritematoso sistêmico e outras doenças reumatológicas, infecção pelo vírus HIV, qualquer infecção ativa, tabagismo ou o uso de medicações hormonais e anti-inflamatórias hormonais e não-hormonais nos últimos seis meses, previamente à programação para o procedimento de RA.

O diagnóstico da SOP foi realizado segundo os critérios definidos pelo consenso de Rotterdam, em 2003 (oligo ou amenorreia, sinais clínicos e/ou laboratoriais de hiperandrogenismo e ovários policísticos à ultrassonografia, excluídas outras causas de anovulação e hiperandrogenismo)¹.

O bloqueio hipofisário foi iniciado usando análogo do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH_a) dez dias antes do dia de realização da ultrasonografia transvaginal (USTV) basal (protocolo longo), por meio da administração de acetato de leuprolide (Lupron[®], Abbott, Brasil). As pacientes receberam de 100 a 300 UI por dia de FSH recombinante (FSHr) (Gonal-F[®], Serono, Brasil; Puregon[®], Organon, Brasil), nos primeiros seis dias da indução. Quando pelo menos dois folículos atingiram 18 mm de diâmetro médio, administrou-se hCG recombinante (Ovidrel[®], Serono, Brasil). A captação dos oócitos foi realizada 34 a 36 horas após a administração do hCG recombinante.

Todo material aspirado durante a 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, Estados Unidos) 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 duas a três horas. Após este período, para realizar a remoção do *cumulus oophorus* e da *corona radiata*, os complexos oócito-*cumulus* foram colocados em microgotas de 25 µL de hialuronidase (H4272 tipo IV-S, Sigma) na diluição de 80 UI/mL de HTF/HEPES (Irvine Scientific, Estados Unidos),

por no máximo 30 segundos e, então, lavados duas ou três vezes com o meio HTF modificado (HTF/HEPES, Irvine Scientific, Estados Unidos) 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*), foi realizada 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 dois pró-núcleos e dois corpúsculos polares. A taxa de fertilização foi calculada nos dois grupos, correspondendo ao número de oócitos fertilizados, divididos pelo número de oócitos injetados *versus* 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 à simetria de blastômeros, percentagem de fragmentação e presença ou não de multinucleação). Foram considerados como embriões de boa qualidade em D2 os que apresentassem quatro blastômeros, simétricos, com menos de 20% de fragmentação e sem multinucleação. Foi realizada 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 ultrassonografia transvaginal quatro a cinco semanas após a transferência embrionária, sendo considerada gravidez clínica a presença de saco gestacional intrauterino com embrião com batimento cardíaco (bcf) presente.

Para a avaliação da resposta à estimulação ovariana, foi analisada a dose total de FSH administrada e o número de dias necessários à estimulação, número de folículos com diâmetro médio entre 14 e 18 mm e maiores ou iguais a 18 mm no dia da administração do hCG, o número de folículos punccionados e os oócitos captados³¹.

Para a coleta sanguínea foram utilizados tubos estéreis, à vácuo, com EDTA, para coleta de 5 mL de sangue venoso das pacientes entre o terceiro e o quinto dia do ciclo menstrual, no mês anterior à realização da estimulação ovariana controlada para a realização da ICSI. Neste dia, as pacientes não estavam utilizando nenhuma medicação, hormonal ou não-hormonal. As amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por dez minutos e o

soro foi armazenado à -80°C , dividido em duas alíquotas para posterior análise.

■ Métodos laboratoriais

Avaliação da PL (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 0,25N de ácido clorídrico) e aquecido em banho-maria por 15 minutos. Após o resfriamento, o precipitado foi centrifugado em 3.000 rpm por dez minutos. A absorvância do produto foi medida em espectrofotômetro (Spectronic 601-Milto Roy) com comprimento de onda de 535 nm. 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/g proteína.

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 xyleneol orange forma-se um complexo colorido (xyleneol orange-férrico) de cor azul púrpura, cuja absorvância pode ser medida. A determinação do total de hidroperóxidos foi realizada segundo metodologia descrita por Costa, Santos e Lima³². A absorvância foi medida em 560 nm e o resultado foi expresso em $\mu\text{mol/g}$ proteína.

O MDA 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, a qual deve ser lida a 540 nm no espectrofotômetro.

Produtos de oxidação proteica (AOPP)

Os níveis dos produtos de oxidação proteica presentes no soro foram determinados por meio de um método que consiste na mistura de $40\ \mu\text{L}$ de soro a $160\ \mu\text{L}$ de PBS (tampão fosfato salino) e $20\ \mu\text{L}$ de ácido acético glacial (ultrapuro), a qual foi feita diretamente em microplaca de fundo chato. A leitura da absorvância foi realizada com comprimento de onda de 340 nm. 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 $200\ \mu\text{L}$ dos padrões a $10\ \mu\text{L}$ de iodeto de potássio e $20\ \mu\text{L}$ de ácido acético e agitando a placa por seis minutos antes da leitura²⁰. O resultado final foi expresso em $\mu\text{mol/L}$.

GSH

A GSH do soro foi medida por um método, no qual os grupos tióis interagem com o DTNB formando ânions.

Nesse ensaio, uma alíquota de $25\ \mu\text{L}$ 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 absorvância foi realizada em um comprimento de onda de 412 nm. Após esta leitura, uma alíquota de $25\ \mu\text{L}$ de solução estoque de DTNB (10 nmol/L em etanol absoluto) foi adicionada à solução, que é mantida à temperatura ambiente durante 15 minutos. Após este período, uma nova leitura foi realizada utilizando como branco o DTNB³². 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.

Vitamina E

A determinação da concentração de vitamina E (α -tocoferol) no soro foi realizada segundo o método descrito por Arnaud et al.³³. Uma amostra de $200\ \mu\text{L}$ de soro foi homogeneizada em $200\ \mu\text{L}$ de etanol e homogeneizada por cinco segundos em vórtex. Em seguida foi colocada em $400\ \mu\text{L}$ de n-hexano, agitada por um minuto e dez segundos e centrifugada a 3.500 rpm por cinco minutos. Uma alíquota de $200\ \mu\text{L}$ do sobrenadante (n-hexano) foi pipetada em tubo de ensaio, que posteriormente foi seco em nitrogênio, e ressuspensa em $200\ \mu\text{L}$ de fase móvel, composta por acetoneitrila/diclorometanol/metanol (70:10:20, v/v/v) e filtrada. Para a determinação das concentrações da vitamina E, utilizou-se um HPLC, modelo Shimadzu LC-9^A, sendo a leitura realizada por espectrofotometria à 292 nm. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/L}$.

■ Análise estatística

Para a realização da comparação dos níveis dos cinco marcadores de EO e das variáveis quantitativas relacionadas aos resultados dos procedimentos de RA entre pacientes inférteis controles e com SOP, foi utilizado o teste *t* de Student. Para a comparação das variáveis qualitativas entre os grupos foi utilizado o teste exato de Fisher. Em todas as análises foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

Apesar de terem sido incluídas somente pacientes não-obesas (IMC inferior a $30\ \text{kg/m}^2$) no presente estudo, foi constatado IMC significativamente maior nas pacientes com SOP ($26,7 \pm 4,0\ \text{kg/m}^2$) quando comparadas às controles ($23,4 \pm 3,1\ \text{kg/m}^2$). Comparando-se os Grupos SOP e Controle, observou-se que o volume ovariano esquerdo ($7,4 \pm 2,9\ \text{mm}^3$ e $5,5 \pm 2,3\ \text{mm}^3$, respectivamente), o número de folículos antrais no ovário direito ($7,7 \pm 4,2$ folículos antrais, $4,3 \pm 2,8$ folículos antrais, respectivamente) e esquerdo ($6,6 \pm 3,3$ folículos antrais, $4,4 \pm 3,2$ folículos antrais, respectivamente) foram significativamente maiores nas pacientes do Grupo SOP. A dose de FSH total

Tabela 1 - Comparação entre as variáveis demográficas, resposta à estimulação ovariana com gonadotrofinas e resultados de ICSI em pacientes com fator tubário e/ou masculino de infertilidade e síndrome dos ovários policísticos (SOP)

Variável	Fator tubário e/ou masculino (n=58)	SOP (n=12)	Valor de p
Idade	33,0±3,9	32,00±3,4	0,4
IMC	23,4±3,1	26,7±4,0	<0,01
FSH Basal	5,7±2,6	5,5±1,6	0,84
Volume OD (mm ³)	5,8±2,7	7,3±2,9	0,1
Volume OE (mm ³)	5,5±2,3	7,4±2,9	0,01
N° folículos OD	4,3±2,8	7,7±4,2	<0,01
N° folículos OE	4,4±3,2	6,6±3,3	0,04
Dose FSH (Total) (mUI/mL)	2.041,8±642,6	1.443,8±284,5	<0,01
N° dias estimulação	9,2±1,6	8,4±1,6	0,13
Folículos entre 14 e 18 mm hCG	4,7±3,6	5,6±5,4	0,46
Folículos > 18 mm hCG	2,7±1,8	2,7±1,5	0,93
Endométrio (mm)	10,8±2,5	10,0±2,6	0,33
N° oócitos captados	6,2±3,9	7,6±6,0	0,46
N° oócitos maduros	4,78±3,29	5,67±3,96	0,41
N° oócitos fertilizados	3,21±1,92	3,75±1,82	0,37
N° embriões clivados	2,7±1,5	3,6±1,6	0,06
Taxa de maturidade (%)	77,5±22,8	77,8±18,7	0,96
Taxa de fertilização (%)	80,3±24,6	79,2±30,0	0,89
Taxa de clivagem (%)	88,5±19,3	88,0±16,9	0,94
N° embriões formados	2,5±1,4	3,2±1,2	0,12
N° embriões transferidos	1,9±0,6	2,0±0,8	0,53
Taxa de gravidez química (ciclo iniciado -%)	31	33,3	1
Taxa de gravidez química (ciclo com transferência -%)	32,7	44,4	0,48
Taxa de gravidez clínica (ciclo iniciado -%)	22,4	33,3	0,47
Taxa de gravidez clínica (ciclo com transferência-%)	23,6	44,4	0,23

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. Taxa de gravidez química (para ciclo iniciado): número de pacientes com β -hCG positivo dividido pelo número de ciclos iniciados, multiplicado por 100. Taxa de gravidez química (para ciclo com transferência): número de pacientes com β -hCG positivo, dividido pelo número de ciclos em que foi realizada transferência, multiplicado por 100. Taxa de gravidez clínica (para ciclo iniciado): número de pacientes com batimento cardíaco fetal presente dividido pelo número de ciclos iniciados, multiplicado por 100. Taxa de gravidez clínica (para ciclo com transferência): número de pacientes com batimento cardíaco fetal presente dividido pelo número de ciclos em que foi realizada transferência, multiplicado por 100. OD: ovário direito. OE: ovário esquerdo. Foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Tabela 2 - Comparação entre os níveis séricos de malondialdeído (MDA), total de hidroperóxidos (FOX), produtos de oxidação proteica (AOPP), glutatona (GSH) e vitamina E entre pacientes com fator tubário e/ou masculino de infertilidade e síndrome dos ovários policísticos (SOP)

Variável	Fator tubário e/ou masculino (n=58)	SOP (n=12)	Valor de p
MDA ($\mu\text{mol/g pt}$)	22,8±9,1	27,9±9,3	0,14
FOX ($\mu\text{mol/g pt}$)	8,1±1,9	7,8±1,1	0,62
AOPP ($\mu\text{mol/L}$)	100,2±61,4	124,2±44,7	0,21
GSH (nmol/L)	172,7±47,6	185,6±52,3	0,42
Vitamina E ($\mu\text{mol/L}$)	23,4±6,7	23,4±4,1	0,22

Foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

administrada durante a estimulação também foi significativamente menor no Grupo SOP ($1443,8 \pm 284,5$ mUI/mL) em relação ao Controle ($2041,8 \pm 642,6$ mUI/mL) (Tabela 1). Não foi observada diferença significativa entre os Grupos SOP e Controle em relação à idade ($33,0 \pm 3,9$ anos, $32,00 \pm 3,4$ anos, respectivamente) e níveis de FSH basal ($5,7 \pm 2,6$ UI/mL, $5,5 \pm 1,6$ UI/mL, respectivamente). Também não observamos diferença significativa entre os

Grupos SOP e Controle em relação à resposta à estimulação ovariana com gonadotrofinas (número de dias de estimulação, número de folículos entre 14 e 18 mm no dia de administração do hCG, número de folículos > 18 mm no dia de administração do hCG, número de oócitos captados e de oócitos maduros) e resultados de ICSI (taxas de fertilização e clivagem, número de embriões formados no dia da transferência, número médio de embriões transferidos e taxas de gravidez química e clínica por ciclo iniciado e onde se realizou transferência embrionária) (Tabela 1).

Não observamos diferença significativa entre as pacientes inférteis com SOP e controles nos níveis séricos de MDA ($22,8 \pm 9,1$ $\mu\text{mol/g pt}$ versus $27,9 \pm 9,3$ $\mu\text{mol/g pt}$, respectivamente), hidroperóxidos ($8,1 \pm 1,9$ $\mu\text{mol/g pt}$ versus $7,8 \pm 1,1$ $\mu\text{mol/g pt}$, respectivamente), produtos de oxidação proteica ($100,2 \pm 61,4$ $\mu\text{mol/L}$ versus $124,2 \pm 44,7$ $\mu\text{mol/L}$, respectivamente), GSH ($172,7 \pm 47,6$ nmol/L versus $185,6 \pm 52,3$ nmol/L, respectivamente) e vitamina E ($23,4 \pm 6,7$ $\mu\text{mol/L}$ versus $23,4 \pm 4,1$ $\mu\text{mol/L}$, respectivamente) (Tabela 2).

Discussão

No presente estudo evidenciamos que o volume ovariano esquerdo e o número de folículos antrais foram maiores no Grupo SOP, o que é condizente com os critérios diagnósticos atualmente mais utilizados¹.

Em virtude de a obesidade ser uma variável associada a aumento das taxas de abortamento espontâneo, incluímos apenas pacientes não-obesas no presente estudo. Entretanto, foi observado que houve diferença significativa em relação ao IMC das pacientes deste estudo, sendo os valores de IMC mais elevados nas pacientes com SOP (IMC médio de 26,7 kg/m², compatível com sobrepeso) quando comparadas ao Grupo Controle (IMC médio de 23,4 kg/m², compatível com normalidade). Estes dados são concordantes com alguns dados epidemiológicos³⁴⁻³⁶, que evidenciam maior prevalência de sobrepeso nas portadoras de SOP e mais vulnerabilidade ao insucesso na fertilização e implantação embrionária³⁷.

Apesar do uso cada vez mais rotineiro das técnicas de fertilização assistida no tratamento da infertilidade relacionada à SOP³⁸, persistem as controvérsias sobre os piores resultados destes procedimentos neste grupo de mulheres, especialmente caracterizados pelas menores taxas de fertilização³. Questiona-se o papel da piora da qualidade oocitária, associada a alterações na foliculogênese como potencial contribuinte para estes achados. Todavia, a SOP é uma síndrome bastante heterogênea, sendo que a diversificada expressão de fenótipos e de anomalias reprodutivas e metabólicas associadas à síndrome pode levar a diferenças na foliculogênese e na aquisição da competência oocitária para o desenvolvimento²⁻⁶. É possível que estas diferenças fenotípicas possam justificar as diferenças relativas aos resultados de FIV, e a análise de subgrupos de pacientes poderia auxiliar na elucidação desta questão.

No presente estudo comparamos a resposta à estimulação ovariana com gonadotrofinas e os resultados da ICSI, entre pacientes inférteis não-obesas, controles (fatores masculino e/ou tubário) e portadoras de SOP sem hiperinsulinemia. Neste subgrupo de pacientes com SOP não foi encontrada diferença significativa em relação ao controle referente à resposta à estimulação ovariana com gonadotrofinas quando foi analisado o número de dias necessários, a estimulação, a espessura do endométrio, o número de folículos entre 14 e 18 mm e maiores ou iguais a 18 mm no dia da administração do hCG, o número de folículos punccionados e de oócitos captados. A dose total de gonadotrofinas utilizadas para a estimulação ovariana foi menor entre as pacientes com SOP, coerente com vários estudos publicados e, pelo menos em parte, relacionada ao maior número de folículos antrais, um dos

preditores de reserva ovariana mais utilizados em centros de reprodução assistida^{3,39}.

Não foi evidenciada diferença entre o Grupo Controle e o SOP quanto aos resultados de ICSI (taxas de fertilização e clivagem, número de embriões formados no dia da transferência, número médio de embriões transferidos e taxas de gravidez química e clínica por ciclo iniciado e transferido). 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 pacientes³⁸ o que, aliado aos rígidos critérios de inclusão e exclusão, limitou o número de pacientes elegíveis para o presente estudo. Mas, convém salientar que todas as pacientes elegíveis ao longo do período de inclusão aceitaram em participar do estudo, eliminando o potencial viés relativo à inclusão. Em conjunto, estes dados evidenciam que neste subgrupo específico de portadoras de SOP, ou seja, pacientes não-obesas e sem hiperinsulinemia, não há diferença entre a resposta à estimulação ovariana e os resultados da ICSI, o que precisa ser mais bem avaliado em estudos com maiores casuísticas.

Os dados preliminares do presente estudo não evidenciaram diferença significativa nos níveis médios de produtos avançados de oxidação protéica (AOPP) e malondialdeído (MDA) no soro de pacientes inférteis com SOP e com infertilidade por fator tubário e/ou masculino. Todavia, foi observada tendência a maiores níveis destes dois marcadores de EO no soro de pacientes com SOP, confirmando estudos que evidenciaram maiores níveis séricos de AOPP ou grupamentos carbonila^{40,41} e MDA^{41,42} neste grupo. Se considerarmos como objetivo primário a identificação de diferença nos níveis séricos de proteínas oxidadas entre os grupos, pode-se usar os dados do presente estudo piloto para aferir o cálculo amostral. Assim, considerando que os níveis médios de AOPP no Grupo SOP são 124,2 µmol/L, com desvio padrão de 44,7 µmol/L, para a mínima diferença detectável absoluta de 24, com α de 0,05 e poder do teste = 80%, seriam necessárias cerca de 55 pacientes por grupo. Não identificamos diferença nos níveis médios de vitamina E, GSH e total de hidroperóxidos. A análise da influência de diferentes marcadores séricos de EO nos resultados de RA, em pacientes inférteis, com SOP, precisa ser mais bem analisada por estudos com metodologias pertinentes.

É possível que as diferenças fenotípicas (reprodutivas e metabólicas) em portadoras de SOP possam justificar as controvérsias relativas aos resultados de FIV. No presente estudo, comparando a resposta à estimulação ovariana com gonadotrofinas e os resultados da ICSI, entre pacientes inférteis não-obesas, controles (fatores masculino e/ou tubário) e portadoras de SOP sem hiperinsulinemia, não

evidenciamos diferenças significativas entre os grupos analisados. Compatível com estes achados, também não detectamos diferença nos marcadores séricos de EO neste subgrupo de pacientes. Ressaltamos, todavia, que as interpretações acerca da ação do EO sobre os resultados de RA ainda não estão muito claras e as implicações reprodutivas do EO precisam ser melhor avaliadas.

Agradecimentos

Aos funcionários do Laboratório de Reprodução Assistida do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia e do Laboratório de Nutrição e Metabolismo do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP pelo apoio técnico.

Referências

1. 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(1):19-25.
2. 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.
3. 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.
4. Patel SS, Carr BR. Oocyte quality in adult polycystic ovary syndrome. *Semin Reprod Med*. 2008;26(2):196-203.
5. 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.
6. Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA, Navarro PA. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*. 2009;71(5):836-48.
7. 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.
8. Giudice LC. Endometrium in PCOS: implantation and predisposition to endocrine CA. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2006;20(2):235-44.
9. Regan L, Owen EJ, Jacobs HS. Hypersecretion of luteinising hormone, infertility, and miscarriage. *Lancet*. 1990;336(8724):1141-4.
10. Vieira RC, Barcelos IDES, Ferreira EM, Araújo MCPM, Reis RM, Ferriani RA, et al. Avaliação de anomalias meióticas de oócitos em pacientes com síndrome dos ovários policísticos submetidas à estimulação ovariana. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2008;30(5):241-7.
11. 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.
12. Hanukoglu I. Antioxidant protective mechanisms against reactive oxygen species (ROS) generated by mitochondrial P450 systems in steroidogenic cells. *Drug Metab Rev*. 2006;38(1-2):171-96.
13. Murray AA, Molinek MD, Baker SJ, Kojima FN, Smith MF, Hillier SG, et al. Role of ascorbic acid in promoting follicle integrity and survival in intact mouse ovarian follicles in vitro. *Reproduction*. 2001;121(1):89-96.
14. LaPolt PS, Hong LS. Inhibitory effects of superoxide dismutase and cyclic guanosine 3',5'-monophosphate on estrogen production in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*. 1995;136(12):5533-9.
15. Verit FF, 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.
16. 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.
17. 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.
18. Navarro PA, Liu L, Ferriani RA, Keefe DL. Arsenite induces aberrations in meiosis that can be prevented by coadministration of N-acetylcysteine in mice. *Fertil Steril*. 2006;85 Suppl 1:1187-94.
19. Ruder EH, Hartman TJ, Blumberg J, Goldman MB. Oxidative stress and antioxidants: exposure and impact on female fertility. *Hum Reprod Update*. 2008;14(4):345-57.
20. 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.
21. Appasamy 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.
22. Kelly CJ, Speirs A, Gould GW, Petrie JR, Lyall H, Connell JM. Altered vascular function in young women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(2):742-6.
23. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int*. 1996;49(5):1304-13.
24. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 2nd ed. New York: Oxford University Press; 1989.
25. Campos Petean C, Ferriani RA, dos Reis RM, de Moura MD, Jordão AA Jr, Navarro PA. Lipid peroxidation and vitamin E in serum and follicular fluid of infertile women with peritoneal endometriosis submitted to controlled ovarian hyperstimulation: a pilot study. *Fertil Steril*. 2008;90(6):2080-5.
26. Bornoden WR. Antioxidant nutrients and protection from free radicals. In: Kotsonis FN, Mackey M, Hjelle JJ, editors. *Nutritional toxicology*. New York: Raven Press; 1994. p. 19-48.

27. 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. *Med Hypotheses*. 2008;70(5):1002-8.
28. de Matos DG, Furnus CC. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development effects of beta-mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology*. 2000;53(3):761-71.
29. 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.
30. 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.
31. Peñarrubia J, Fábregues F, Manau D, Creus M, Casals G, Casamitjana R, et al. 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.
32. 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.
33. Arnaud J, Fortis I, Blachier S, Kia D, Favier A. Simultaneous determination of retinol, alpha-tocopherol and beta-carotene in serum by isocratic high performance liquid chromatography. *J Chromatogr*. 1991;572(1-2):103-16.
34. DeFronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care*. 1991;14(3):173-94.
35. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet*. 2005;365(9468):1415-28.
36. Vieira CS, Gomes MKO, Rodrigues PC, Pinto APM, Reis RM, Ferriani RA, et al. Avaliação da função das células β pancreáticas através do modelo matemático de HOMA em portadoras de síndrome dos ovários policísticos: comparação entre obesas e não-obesas. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2007;29(3):141-6.
37. Cano F, García-Velasco JA, Millet A, Remohí J, Simón C, Pellicer A. Oocyte quality in polycystic ovaries revisited: identification of a particular subgroup of women. *J Assist Reprod Genet*. 1997;14(5):254-61.
38. 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.
39. Fauser BC, Diedrich K, Devroey P; Evian Annual Reproduction Workshop Group 2007. Predictors of ovarian response: progress towards individualized treatment in ovulation induction and ovarian stimulation. *Hum Reprod Update*. 2008;14(1):1-14.
40. 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):123-7.
41. 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.
42. 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(5):407-13.