

CARLA CAMPOS PETEAN<sup>1</sup>  
FERNANDO MARCOS GOMES<sup>2</sup>  
JÚLIO CÉSAR ROSA E SILVA<sup>3</sup>  
RUI ALBERTO FERRIANI<sup>4</sup>  
MARCOS DIAS DE MOURA<sup>5</sup>  
ROSANA MARIA DOS REIS<sup>5</sup>  
PAULA ANDREA DE ALBUQUERQUE  
SALLES NAVARRO<sup>6</sup>

# Peroxidação lipídica e vitamina E no soro e no fluido folicular de mulheres inférteis com endometriose submetidas à estimulação ovariana controlada

*Lipid peroxidation and vitamin E in serum and follicular fluid of infertile women with endometriosis submitted to controlled ovarian hyperstimulation*

## Artigos originais

### Palavras-chave

Endometriose  
Líquido folicular  
Peroxidação de lipídeos  
Vitamina E  
Estresse oxidativo  
Infertilidade feminina  
Técnicas reprodutivas assistidas  
Indução da ovulação

### Keywords

Endometriosis  
Follicular fluid  
Lipid peroxidation  
Vitamin E  
Oxidative stress  
Infertility, female  
Reproductive techniques, assisted  
Ovulation induction

## Resumo

**OBJETIVO:** avaliar o nível de peroxidação lipídica e vitamina E no fluido folicular e soro de pacientes inférteis, com ou sem endometriose, submetidas à indução da ovulação para procedimentos de reprodução assistida. **MÉTODOS:** estudo prospectivo envolvendo, consecutivamente, 36 pacientes inférteis com idade entre 20 e 38 anos, divididas em dois grupos: Endometriose (n=17) e Controle (n=19, laqueadura tubária prévia ou fator masculino). Amostras sanguíneas foram coletadas em: D1 (imediatamente antes do início do uso de gonadotrofinas), D2 (dia da aplicação da gonadotrofina coriônica humana) e D3 (dia da aspiração folicular). Em D3, amostras de fluido folicular livres de contaminação sanguínea foram coletadas e armazenadas. O nível de eroxidação lipídica foi mensurado pela quantificação de malondialdeído (MDA) por espectrofotometria, e o *status* antioxidante por meio da medida da vitamina E por cromatografia líquida de alta pressão. **RESULTADOS:** em D1, nenhuma diferença significativa foi observada entre os Grupos Endometriose (2,4 nmol/mL) e Controle (1,9 nmol/mL) no nível de MDA. Contudo, os níveis de vitamina E foram significativamente mais elevados no Grupo Controle (24 µmol/L). Em D2, os níveis de MDA foram significativamente maiores no Grupo Endometriose (2,3 nmol/mL) quando comparados com o Controle (1,4 nmol/mL), enquanto os níveis de vitamina E permaneceram significativamente mais elevados no Controle (23,4 µmol/L). Em D3 não houve diferença significativa nos níveis de MDA e de vitamina E do soro e fluido folicular entre os grupos. Contudo, em D3, os níveis de vitamina E foram significativamente mais elevados no soro do que no fluido folicular em ambos os grupos, e os níveis de MDA foram significativamente menores no fluido folicular do que no soro apenas no Grupo Controle. **CONCLUSÃO:** antes do início da indução da ovulação, uma diminuição significativa nos níveis séricos de vitamina E foi observada em pacientes com endometriose, cujo consumo poderia estar contribuindo para a manutenção de níveis séricos de MDA similares ao Grupo Controle. Depois da indução da ovulação com gonadotrofinas exógenas, o grupo de pacientes com endometriose apresentou não somente aumento nos níveis séricos de MDA, mas também manteve *status* antioxidante inferior ao Grupo Controle. Contudo, no dia da captação oocitária, ambos os níveis séricos de MDA e de vitamina E foram semelhantes nos dois grupos.

## Abstract

**PURPOSE:** to assess the level of lipid peroxidation (LP) and vitamin E in the follicular fluid and serum of infertile patients, with or without endometriosis, submitted to induction of ovulation for assisted reproduction procedures. **METHODS:** infertile patients aged 20 to 38 years old were selected prospectively and consecutively and divided into Endometriosis Group (17 patients with pelvic endometriosis) and Control Group (19 patients with previous tubal ligation or with male factor). Blood samples were collected on: D1 (before the beginning of the use of gonadotrophins), D2 (day of human chorionic gonadotrophin application) and D3 (day of oocyte retrieval). On D3, follicular fluid samples free from blood contamination were also collected and stored. LP was assessed for malondialdehyde (MDA) quantification by spectrophotometry, and antioxidant *status* by measurement of vitamin E by HPLC. **RESULTS:** on D1, no significant difference in LP was observed between groups. However, vitamin E levels were significantly higher in the Control Group. On D2, LP levels were significantly higher in the Endometriosis Group compared to Control and vitamin E levels continued to be significantly higher in the Control Group.

### Correspondência:

Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro  
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de  
Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo  
Fone: (16) 3602-1238  
Fax: (16) 3633-0946  
E-mail: paosnavarro@uol.com.br

### Recebido

13/03/2007

Aceito com modificações

22/05/2007

Trabalho realizado no Setor de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – USP – Ribeirão Preto (SP), Brasil.

<sup>1</sup> Pós-graduanda do Setor de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – USP – Ribeirão Preto (SP), Brasil.

<sup>2</sup> Médico Ginecologista e Obstetra junto à MATER, Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – USP – Ribeirão Preto (SP), Brasil.

<sup>3</sup> Médico Assistente do Setor de Endoscopia Ginecológica e Dor Pélvica do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – USP – Ribeirão Preto (SP), Brasil.

<sup>4</sup> Professor Titular do Setor de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – USP – Ribeirão Preto (SP), Brasil.

<sup>5</sup> Professor Associado de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – USP – Ribeirão Preto (SP), Brasil.

<sup>6</sup> Professora Adjunta da Área de Saúde da Mulher da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar – São Carlos (SP), Brasil; Orientadora do Programa de Pós-Graduação, Área de Tocoginecologia do Setor de Reprodução Humana da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – USP – Ribeirão Preto (SP), Brasil.

On D3, there was no significant difference in both serum and follicular fluid levels of LP or vitamin E between groups. However, on D3, vitamin E levels were found to be significantly higher in serum than in follicular fluid in both groups, whereas MDA levels were significantly lower in follicular fluid than in serum only in the Control Group. **CONCLUSION:** before the beginning of the induction of ovulation, a significant decrease in antioxidant status was observed in patients with endometriosis, perhaps because antioxidants are consumed during oxidation reactions. After the induction of ovulation with exogenous gonadotrophins, the group of patients with endometriosis presented not only increased lipid peroxidation compared to Control, but also maintained a lower antioxidant status than the Control Group. However, on the day of oocyte retrieval, both serum LP potential and the levels of vitamin E were found to be similar in both groups.

## Introdução

O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio entre a produção e a neutralização das espécies reativas do oxigênio (ERO), podendo ocorrer pelo excesso de produção de ERO e/ou pela deficiência nos mecanismos antioxidantes<sup>1</sup>. O estresse oxidativo, por meio de mecanismos até o momento não completamente estabelecidos, pode promover apoptose e morte em vários tipos celulares<sup>2,3</sup>, além de anomalias na fertilização e no desenvolvimento embrionário pré e pós-implantação<sup>4,5</sup>.

Os radicais livres do oxigênio podem ser importantes marcadores da remodelação dos tecidos, da sinalização hormonal, da esteroidogênese e da função das células germinativas<sup>6</sup>. No que diz respeito à associação entre as ERO e a função das células germinativas, tem sido reportada a ocorrência de radicais livres do oxigênio no sêmen humano, afetando adversamente a viabilidade dos espermatozoides<sup>7</sup>. Contudo, há pouca informação sobre o balanço entre os agentes oxidantes e antioxidantes no ambiente folicular humano, o que poderia trazer repercussões sobre a viabilidade oocitária e, conseqüentemente, sobre a fertilidade feminina.

Foi sugerida a possibilidade de a endometriose ser uma doença originada ou associada ao estresse oxidativo<sup>8</sup>. Na vigência de endometriose pélvica, haveria a ativação dos macrófagos na cavidade peritoneal, o que poderia promover estresse oxidativo, gerando peroxidação dos lipídeos, de seus produtos de degradação e dos produtos formados pela sua interação com as lipoproteínas de baixa densidade e outras proteínas. Os lipídeos peroxidados, ao serem decompostos, gerariam produtos como o malondialdeído (MDA) e poderiam ser reconhecidos como corpos estranhos, desencadeando resposta antigênica, com conseqüente produção de anticorpos<sup>8,9</sup>. Este processo cursaria com danos oxidativos às células vermelhas do sangue, às células endometriais e peritoneais, o que, por sua vez, estimularia o recrutamento e ativação de mais fagócitos mononucleares, perpetuando os danos oxidativos à cavidade pélvica<sup>10</sup>. Contudo, não é conhecido se o estresse oxidativo desempenha algum papel na patogênese da infertilidade associada à endometriose, bem como não dispomos de dados na literatura comparando a presença ou não de alterações na peroxidação lipídica e nos níveis de vitaminas antioxidantes no fluido folicular de pacientes inférteis, com ou sem endometriose.

Caso seja confirmada a presença de estresse oxidativo em nível folicular em mulheres com endometriose, este fato poderia contribuir tanto para a ocorrência da infertilidade relacionada a esta enigmática doença, como justificaria o comprometimento da qualidade oocitária, ao qual tem sido atribuídas as menores taxas de implantação e gestação observadas em pacientes com endometriose submetidas à estimulação ovariana para a realização de fertilização *in vitro* e transferência embrionária, descritas por alguns autores<sup>11,12</sup>. Também convém ressaltarmos que não dispomos de dados na literatura acerca do potencial efeito da estimulação ovariana com gonadotrofinas exógenas sobre a peroxidação lipídica e os níveis de antioxidantes séricos.

O MDA é um dos produtos finais da peroxidação lipídica e, por ser um produto estável, pode ser utilizado como medida cumulativa deste processo<sup>13</sup>. Em contrapartida, a vitamina E, que, segundo um relato, está aparentemente diminuída no fluido peritoneal de mulheres com endometriose<sup>14</sup>, pode tanto bloquear o início da peroxidação lipídica, como inibir, primariamente, a sua etapa de propagação<sup>15</sup>.

Para melhor compreender o balanço oxidante-antioxidante e seu comportamento nas pacientes com infertilidade secundária à endometriose, previamente à indução da ovulação com gonadotrofinas exógenas e ao longo da estimulação ovariana controlada, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de peroxidação lipídica e os níveis de vitamina E no soro e no fluido folicular de pacientes inférteis com ou sem esta doença, submetidas à hiperestimulação ovariana controlada (HOC) para realização de procedimentos de reprodução assistida de alta complexidade.

## Métodos

### Pacientes

Foram estudadas, prospectiva e consecutivamente, 36 pacientes inférteis atendidas no ambulatório de Infertilidade Conjugal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), submetidas à indução de ovulação para a realização de procedimentos de reprodução assistida de alta complexidade (fertilização *in vitro* ou injeção intracitoplasmática de espermatozoide).

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição, de acordo com o processo HCRP 2112/2001, e todas as pacientes avaliadas assinaram o consentimento informado previamente a sua inclusão no estudo.

Foram incluídas pacientes inférteis com idade entre 20 e 38 anos, distribuídas em dois grupos: Grupo Endometriose, constituído de 17 pacientes com infertilidade secundária à endometriose pélvica, e Grupo Controle, composto por 19 pacientes com infertilidade secundária à laqueadura tubária prévia (oito pacientes) ou fator masculino (11 pacientes).

Foram considerados como critérios de inclusão para as pacientes com endometriose a presença da confirmação deste diagnóstico pela laparoscopia, a ausência de qualquer tratamento clínico ou cirúrgico para esta afecção nos últimos seis meses e a ausência de doenças clínicas ou ginecológicas associadas. As pacientes do Grupo Controle incluídas neste estudo não apresentaram quaisquer doenças pélvicas associadas à infertilidade, quando da realização da laparoscopia diagnóstica utilizada como parte da propeidética da investigação de infertilidade. A presença de doenças como *diabetes mellitus*, 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 foram critérios de exclusão para ambos os grupos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as medianas de idade das pacientes de ambos os grupos (Endometriose=31,2 anos e Controle=31,4 anos;  $p=0,66$ ).

## Métodos

A HOC seguiu o protocolo do setor, que inclui a dessensibilização hipofisária com agonistas do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), utilizando o protocolo longo, a estimulação ovariana controlada com gonadotrofinas (gonadotrofinas de mulher menopausada – HMG ou FSH recombinante) e a administração de gonadotrofina coriônica humana (hCG) urinária, para promover a indução da ovulação, seguida da captação oocitária realizada 34 a 36 horas após a hCG.

As pacientes foram submetidas a uma injeção subcutânea diária de 0,5 mg de acetato de leuprolide, iniciado dez dias antes da ultra-sonografia basal, quando era realizada a avaliação ultra-sonográfica previamente ao início da hiperestimulação ovariana controlada. Foram utilizadas diariamente três a quatro ampolas de HMG ou FSH recombinante (75 UI por ampola) nos primeiros seis a sete dias da hiperestimulação ovariana controlada, quando foi realizada a monitorização ultra-

sonográfica após o início do uso das gonadotrofinas. A partir deste momento, o controle ultra-sonográfico foi realizado diariamente ou a cada dois dias, e a dose de gonadotrofinas foi ajustada de acordo com o crescimento folicular observado. A suspensão das gonadotrofinas e do agonista do GnRH foi realizada quando pelo menos um folículo apresentava diâmetro médio de 18 mm, quando foi administrada 10.000 UI de hCG urinário. Cerca de 34 a 36 horas após a administração da hCG, a paciente foi submetida à captação oocitária, sob sedação endovenosa com propofol. A aspiração folicular foi realizada por meio de ultra-sonografia com transdutor transvaginal de 5 MHz acoplado a guia de punção. Os folículos foram aspirados separadamente, sendo armazenados os fluidos foliculares livres de contaminação sanguínea à inspeção visual<sup>16</sup> e que apresentaram oócitos capturados. Os fluidos adequados foram centrifugados a 1.900 g por dez minutos e estocados a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para posterior análise.

Foram utilizados tubos estéreis, a vácuo, com EDTA, para coleta de 5 mL de sangue venoso das pacientes, nos seguintes dias: D1, dia da ultra-sonografia basal, antes do início do uso das gonadotrofinas; D2, dia em que foi administrada a hCG; e D3, dia da captação oocitária. Estas amostras foram centrifugadas a 1900 g por dez minutos e o soro armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

As amostras dos soros e dos fluidos foliculares armazenadas foram posteriormente encaminhadas para o Laboratório de Nutrição da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP para a mensuração da peroxidação lipídica e da vitamina E, conforme descrito a seguir.

### Mensuração da peroxidação lipídica

O soro e o fluido folicular previamente estocados foram descongelados até atingir  $37^{\circ}\text{C}$ . Cerca de 1 mL de cada amostra foi misturado com 2 mL de TCA-TBA-HCl (15% de ácido tricloroacético, 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 1.000 g por dez minutos. A absorbância 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 de MDA/litro. Uma curva padrão foi realizada, utilizando-se solução estoque de MDA a 10 mM, preparada a partir do tetrametoxipropano (Sigma), sendo que as concentrações encontradas nas amostras apresentaram-se dentro desta curva, mostrando boa linearidade com o padrão.

## Níveis de vitamina E

A determinação da concentração de vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) no soro e no fluido folicular foi realizada segundo o método descrito por Arnaud et al.<sup>17</sup>, como detalhado a seguir. Uma amostra de 0,5 mL de soro ou fluido folicular foi homogeneizada em 2,0 mL de etanol. Em seguida, foi colocada em 1,0 mL de n-hexano e agitada por dois minutos. Uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante (n-hexano) foi pipetada, cuidadosamente, em tubo de ensaio seco em nitrogênio, ressuspensa em 0,5 mL de fase móvel, composta por acetonitrila/diclorometanol/ metanol (70:10:20, v/v/v) e filtrada. Uma quantidade de 100  $\mu$ L 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 uma HPLC modelo Shimadzu LC-9<sup>A</sup>, usando uma coluna tipo C-18 (Simpack 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 292 nm. O equipamento foi calibrado com soluções padrões de  $\alpha$ -tocoferol (Sigma), nas concentrações de 10, 20 e 200  $\mu$ mol/L. Antes de cada leitura foi injetada uma solução padrão de  $\alpha$ -tocoferol na concentração de 20  $\mu$ mol/L. O equipamento foi programado para que os resultados fossem expressos em  $\mu$ mol/L para o plasma e fluido folicular.

## Análise estatística

Para análise estatística, o teste não-paramétrico de Mann-Whiney foi utilizado para a comparação entre os valores de MDA e vitamina E, do soro e fluido folicular, entre os Grupos Endometriose e Controle. O teste de Friedman foi utilizado para a análise das variações dos valores de MDA e vitamina E, no soro, durante o processo de hiperestimulação controlada (D1, D2 e D3), dentro de cada grupo estudado. O teste de Wilcoxon foi utilizado para a comparação entre as dosagens de MDA e vitamina E no soro e no fluido folicular, no dia da captação oocitária, dentro dos dois grupos de estudo. Em todos os testes estatísticos, o nível de significância adotado foi de 95% ( $p < 0,05$ ).

## Resultados

No dia da amostra basal (D1), antes do início do uso das gonadotrofinas, não se observou diferença significativa nos valores séricos de MDA entre o grupo de pacientes com endometriose e o Grupo Controle, e, após HOC, os valores séricos de MDA foram significativamente mais elevados no Grupo Endometriose quando comparado ao Grupo Controle apenas em D2 (Tabela 1). Os valores séricos de vitamina E foram significativamente menores no Grupo Endometriose

**Tabela 1** - Valores séricos de malondialdeído (MDA), no dia da amostra basal, no dia da administração da gonadotrofina coriônica humana (hCG) e no dia da captação oocitária, nos Grupos Endometriose e Controle.

MDA soro (Nmol MDA/mL)	Grupo Endometriose			Grupo Controle		
	Mediana	P25	P75	Mediana	P25	P75
D1	2,4	1,8	3,1	1,9	1,5	2,7
D2	2,3*	2,0	4,9	1,4*	1,1	2,3
D3	1,8	1,7	3,4	1,6	1,5	5,9

D1=dia da amostra basal; D2=dia da administração do hCG; D3=dia da captação oocitária; hCG=gonadotrofina coriônica humana.

\*Diferença significativa ( $p=0,009$ ).

**Tabela 2** - Valores séricos de vitamina E, no dia da amostra basal, no dia da administração da gonadotrofina coriônica humana (hCG) e no dia da captação oocitária, nos Grupos Endometriose e Controle.

Vitamina E soro ( $\mu$ mol/L)	Grupo Endometriose			Grupo Controle		
	Mediana	P25	P75	Mediana	P25	P75
D1	19,0 <sup>b</sup>	14,3	22,1	24,0 <sup>b</sup>	20,1	29,8
D2	19,7 <sup>c</sup>	17,7	22,1	23,4 <sup>d</sup>	19,8	28,0
D3	21,1	18,1	24,6	21,8	17,6	24,0

D1=dia da amostra basal; D2=dia da administração da hCG; D3=dia da captação oocitária; hCG=gonadotrofina coriônica humana.

<sup>a,b/c,d</sup> Diferentes sobrescritos dentro da mesma linha indicam diferença significante ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 3** - Valores de malondialdeído (MDA) e vitamina E, no dia da captação oocitária (D3), no soro e fluido folicular, nos Grupos Endometriose e Controle.

		Grupo Endometriose			Grupo Controle		
		Mediana	P75	P25	Mediana	P25	P75
MDA (nmol/mL)	Soro	1,8	1,6	3,4	1,6 <sup>a</sup>	1,5	5,9
	Fluido folicular	*1,6	1,1	2,3	*1,1 <sup>b</sup>	0,7	1,5
Vitamina E ( $\mu$ mol/L)	Soro	21,1 <sup>a</sup>	18,1	24,6	21,8 <sup>c</sup>	17,6	24,7
	Fluido folicular	*6,9 <sup>d</sup>	4,7	8,6	♦5,6 <sup>d</sup>	3,1	7,2

<sup>a,b/c,d</sup> Diferentes sobrescritos dentro da mesma coluna indicam diferença significante ( $p < 0,05$ ).

\*/\*: Ausência de diferença significativa.

quando comparado ao Grupo Controle, tanto no dia da amostra basal (D1), como no dia da administração da hCG (D2), sem diferença significativa em D3 (Tabela 2). Não houve diferença significativa entre os valores séricos de MDA e vitamina E em D1, D2 e D3, dentro de cada um dos dois grupos avaliados (Tabelas 1 e 2).

No dia da captação oocitária (D3) não se observou diferença significativa ( $p=0,08$ ) entre os valores de MDA no soro (1,82 nmol/mL) e no fluido folicular (1,64 nmol/mL), no grupo de pacientes com endometriose. Contudo, nas pacientes do Grupo Controle, os valores de MDA foram significativamente mais elevados no soro (1,63 nmol/mL) do que no fluido folicular (1,07 nmol/mL). Em ambos os grupos, os valores de vitamina E foram significativamente maiores ( $p<0,001$ ) no soro do que no fluido folicular em D3 (Tabela 3). Não se observou diferença significativa entre os valores de MDA e de vitamina E no fluido folicular entre o Grupo Endometriose e o Controle (Tabela 3).

## Discussão

O presente estudo foi o primeiro na literatura que avaliou o potencial de peroxidação lipídica e os níveis séricos de vitamina E, previamente ao início do uso das gonadotrofinas e ao longo do processo de hiperestimulação ovariana controlada (HOC) em mulheres inférteis com endometriose submetidas a procedimentos de reprodução assistida de alta complexidade.

Os nossos resultados evidenciaram que o grupo de pacientes com endometriose apresentou menores níveis séricos de vitamina E quando comparado ao Controle, tanto previamente ao uso das gonadotrofinas exógenas, como durante a utilização das mesmas, até o dia da administração da hCG. Estes dados sugerem que, em mulheres inférteis com endometriose, possa haver maior consumo sérico de vitamina E, um potente antioxidante, refletindo possível aumento das reações oxidativas no soro associada a esta patologia.

Confirmando os nossos achados, outros autores<sup>14</sup> também demonstraram que os valores de vitamina E foram significativamente inferiores no fluido peritoneal de mulheres com endometriose, o que poderia explicar a oxidação mais rápida de lipoproteínas, encontrada em mulheres com esta afecção<sup>18</sup>. Alguns autores avaliaram a atividade das enzimas antioxidantes glutatona peroxidase e superóxido dismutase, além da capacidade antioxidante total do fluido peritoneal de mulheres inférteis com endometriose e com infertilidade sem causa aparente, também encontrando redução tanto da capacidade

antioxidante total, quanto da atividade das enzimas avaliadas nas portadoras de endometriose<sup>19</sup>.

Por outro lado, o potencial de peroxidação lipídica, que, inicialmente, apresentou-se semelhante em ambos os grupos estudados, tornou-se mais elevado, com o uso de gonadotrofinas, nas mulheres com endometriose. Este achado poderia ser explicado pelo fato de a administração de gonadotrofinas exógenas poder estimular o aumento de ferro no conteúdo folicular<sup>20</sup>. O ferro é reconhecidamente um potente pró-oxidante, catalisando a geração de radicais livres do oxigênio pela reação de Haber-Weiss. Não sabemos se o mesmo também ocorreria em nível sérico, o que, se confirmado, apoiaria os resultados encontrados no presente estudo. Kaya et al.<sup>21</sup> demonstraram que os altos níveis de estradiol secundários à HOC poderiam estar associados a aumento nas concentrações séricas de MDA. Apesar destes autores não terem estudado especificamente mulheres inférteis com endometriose, os seus dados sugerem possível associação entre a HOC e o aumento da peroxidação lipídica sérica, que, segundo os nossos achados, seria mais marcante nas portadoras de endometriose. Por outro lado, também postulamos que o aumento dos valores séricos de MDA nas pacientes com endometriose, após a HOC, poderia estar relacionado também à menor capacidade antioxidante no soro destas pacientes que, desde o início, apresentavam-se com menores níveis séricos de vitamina E, conforme anteriormente descrito.

Até o presente momento não dispomos de explicações que justifiquem o fato de, no dia da captação oocitária, os níveis séricos de MDA e vitamina E apresentarem-se semelhantes em ambos os grupos estudados. Convém ressaltarmos que, apesar de não termos encontrado diferença significativa, observamos, no grupo de pacientes com endometriose, tendência à redução nos níveis séricos de MDA e aumento nos níveis de vitamina E após a administração da hCG e interrupção das gonadotrofinas, sugerindo menor consumo do referido antioxidante em virtude da possível redução da peroxidação lipídica, o que precisaria ser melhor elucidado por meio de estudos com maiores casuísticas.

Quando comparamos os níveis séricos e foliculares de MDA, observamos que os níveis séricos foram significativamente mais elevados que os do fluido folicular nas pacientes sem endometriose, apoiando os achados de outros autores que sugeriram haver um eficiente sistema de defesa antioxidante no conteúdo folicular pré-ovulatório<sup>22</sup>. Contudo, nas pacientes com endometriose não encontramos diferença significativa

entre os níveis séricos e foliculares de MDA, o que poderia ser devido à menor capacidade antioxidante e/ou à maior atividade oxidativa em nível folicular, associadas a esta doença.

Como não encontramos diferença significativa entre os níveis foliculares de vitamina E entre os dois grupos avaliados e observamos tendência a maiores níveis de MDA no fluido folicular de pacientes com endometriose quando comparados aos controles, sugerimos possível desequilíbrio entre a produção e a remoção de ERO em nível folicular, em mulheres inférteis com endometriose, o que poderia, pelo menos em parte, explicar a pior qualidade oocitária relacionada a esta afecção, conforme preconizado por alguns autores<sup>23</sup>.

Contudo, convém ressaltarmos que não dispomos de estudos que tenham avaliado os níveis fisiológicos de ERO e de antioxidantes no fluido folicular de mulheres férteis ou inférteis em ciclos não estimulados com gonadotrofinas exógenas. Desta forma, não dispomos de dados acerca da potencial influência de níveis fisiológicos de ERO e antioxidantes no fluido folicular sobre a qualidade oocitária e, conseqüentemente, sobre a qualidade embrionária e o sucesso da gestação subsequente. Os dados disponíveis na literatura sobre o valor preditivo de diferentes níveis de marcadores do estresse oxidativo e capacidade antioxidante em nível folicular sobre a qualidade oocitária, fertilização, qualidade embrionária e taxas de gestação subseqüentes aos procedimentos de re-

produção assistida de alta complexidade são escassos, contraditórios e se restringem a avaliar estes marcadores no fluido folicular obtido quando da captação oocitária em ciclos estimulados com gonadotrofinas exógenas em pacientes com diferentes etiologias de infertilidade<sup>6,21,24</sup>. Assim, certamente, estudos com maiores casuísticas, metodologicamente bem delineados, serão cruciais para elucidarem o papel das ERO no fluido folicular na fisiologia reprodutiva e na etiopatogênese da infertilidade associada à endometriose e outras doenças.

Os resultados do presente estudo evidenciaram que as pacientes inférteis com endometriose apresentaram níveis séricos de vitamina E inferiores aos encontrados no Grupo Controle, constituído por mulheres inférteis por causas tubárias ou masculinas, antes e ao longo da hiperestimulação ovariana controlada com gonadotrofinas. Estas mesmas pacientes apresentaram maior potencial de peroxidação lipídica, durante a HOC, do que o Grupo Controle. Em conjunto, estas evidências sugerem maior produção de ERO em mulheres inférteis com endometriose ao longo da HOC, suportando o maior consumo de vitamina E, que resultaria em menores níveis séricos desta vitamina, conforme observado no presente estudo. Maiores evidências serão necessárias para elucidarmos o real balanço entre oxidantes e antioxidantes em nível sérico e folicular, bem como o seu possível papel na etiopatogênese da infertilidade associada à endometriose.

## Referências

1. Diplock AT. Antioxidants and free radicals scavengers. In: Rice-Evans CA, Burdon RH, editor. Free radical damage and its control. Amsterdam: Elsevier; 1994. p. 113-5.
2. Santanam N, Ramachandran S, Parthasarathy S. Oxygen radicals, antioxidants, and lipid peroxidation. *Semin Reprod Endocrinol*. 1998;16(4):275-80.
3. Liu L, Trimarchi JR, Navarro P, Blasco MA, Keefe DL. Oxidative stress contributes to arsenic-induced telomere attrition, chromosome instability, and apoptosis. *J Biol Chem*. 2003;278(34):31998-2004.
4. 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.
5. 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.
6. 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(5):314-20.
7. Storey BT. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod*. 1997;3(3):203-13.
8. Murphy AA, Santanam N, Parthasarathy S. Endometriosis: a disease of oxidative stress? *Semin Reprod Endocrinol*. 1998;16(4):263-73.
9. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*. 1994;344(8924): 721-4.
10. Van Langendonck A, Casanas-Roux F, Donnez J. Oxidative stress and peritoneal endometriosis. *Fertil Steril*. 2002;77(5):861-70.
11. Barnhart K, Dunsmoor-Su R, Coutifaris C. Effect of endometriosis on *in vitro* fertilization. *Fertil Steril*. 2002;77(6):1148-55.
12. Kuivasaari P, Hippelainen M, Anttila M, Heinonen S. Effect of endometriosis on IVF/ICSI outcome: stage III/IV endometriosis worsens cumulative pregnancy and live-born rates. *Hum Reprod*. 2005;20(11):3130-5.
13. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Oxford University Press; 1989.
14. Murphy AA, Santanam N, Morales AJ, Parthasarathy S. Lysophosphatidyl choline, a chemotactic factor for monocytes/T-lymphocytes is elevated in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(6):2110-3.
15. Bornoden WR, Pariza MW. 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.

16. Levay PF, Huyser C, Fourie FL, Rossouw DJ. The detection of blood contamination in human follicular fluid. *J Assist Reprod Genet.* 1997;14(4):212-7.
17. 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.
18. Murphy AA, Palinski W, Rankin S, Morales AJ, Parthasarathy S. Evidence for oxidatively modified lipid-protein complexes in endometrium and endometriosis. *Fertil Steril.* 1998;69(6):1092-4.
19. Szczepanska M, Kozlik J, Skrzypczak J, Mikolajczyk M. Oxidative stress may be a piece in the endometriosis puzzle. *Fertil Steril.* 2003;79(6):1288-93.
20. Paszkowski T, McMaster D, Traub AI, Thompson W. Total iron levels in the preovulatory follicular fluid of *in vitro* fertilisation patients. *Med Sci Res.* 1996;24(3):187-8.
21. Kaya H, Sezik M, Ozkaya O, Dittrich R, Siebzehrubl E, Wildt L. Lipid peroxidation at various estradiol concentrations in human circulation during ovarian stimulation with exogenous gonadotropins. *Horm Metab Res.* 2004;36(10):693-5.
22. Jozwik M, Wolczynski S, Jozwik M, Szamatowicz M. Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans. *Mol Hum Reprod.* 1999;5(5):409-13.
23. Garrido N, Navarro J, Garcia-Velasco J, Remoh J, Pellice A, Simon C. The endometrium *versus* embryonic quality in endometriosis-related infertility. *Hum Reprod Update.* 2002;8(1):95-103.
24. Das S, Chattopadhyay R, Ghosh S, Ghosh S, Goswami SK, Chakravarty BN, et al. Reactive oxygen species level in follicular fluid—embryo quality marker in IVF? *Hum Reprod.* 2006;21(9):2403-7.