

**Amanda Begatti Victorino**

**NÍVEIS DE ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS E PRODUTOS DA  
PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM LÍQUIDO FOLICULAR DE  
MULHERES SUBMETIDAS À ESTIMULAÇÃO OVARIANA  
CONTROLADA**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

SÃO PAULO

2009

Amanda Begatti Victorino

**NÍVEIS DE ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS E PRODUTOS DA**  
**PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM LÍQUIDO FOLICULAR DE**  
**MULHERES SUBMETIDAS À ESTIMULAÇÃO OVARIANA**  
**CONTROLADA**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo -  
Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de  
Doutor em Ciências.

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Ricardo Pimenta Bertolla

Co-orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Edson Guimarães Lo Turco

SÃO PAULO

2009

Victorino, Amanda B.

**Níveis de antioxidantes enzimáticos e produtos da peroxidação lipídica em líquido folicular de mulheres submetidas à estimulação ovariana controlada** / Amanda Begatti Victorino -- São Paulo, 2009.

xvii, 62 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Urologia.

Título em inglês: Antioxidants enzymes and lipid peroxidation levels in follicular fluid of women submitted to controlled ovarian stimulation.

1. Estresse oxidativo.
2. Líquido folicular
3. Antioxidantes.
4. Radicais Livres
5. Fertilização *in vitro*.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**  
**ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE CIRURGIA**  
**DISCIPLINA DE UROLOGIA**

**Chefe do Departamento:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lydia Masako Ferreira

**Coordenador do Curso de Pós-graduação:** Prof<sup>o</sup>. Dr. Agnaldo Pereira  
Cedenho

**Chefe da Disciplina:** Prof<sup>o</sup>. Dr. Agnaldo Pereira Cedenho

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Luiz e Lívia, que sempre me incentivaram em busca do conhecimento.*

*Ao meu filho Lucas e meu marido Bruno pelo amor e apoio incondicional.*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Prof<sup>o</sup>. Dr. Ricardo Pimenta Bertolla**, meus mais sinceros agradecimentos pelos ensinamentos, incentivo, paciência e pela contribuição para a realização desta tese.

Ao **Prof<sup>o</sup> Dr. Agnaldo Pereira Cedenho**, minha profunda gratidão pelo incentivo ao desenvolvimento da minha formação científica e pela confiança.

Ao meu co-orientador **Edson Guimarães Lo Turco**, pela amizade, incentivo, paciência e contribuição na realização deste trabalho.

Ao **Prof<sup>o</sup> Marcílio Nichi** do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pela colaboração, atenção e paciência inestimável para a realização desta tese.

À **pós-graduanda Thiesa Butterby Soler Barbosa** pela colaboração durante a análise das amostras, mesmo que durante as férias.

Aos meus companheiros de trabalho na Embriologia **Edson Guimarães Lo Turco, Juliana Stevanato e Maria Cristina M. Negrão** pela paciência, colaboração, atenção e amizade essenciais para a finalização deste trabalho.

À **Deborah Montagnini Spaine**, pela oportunidade de ingresso na carreira científica, pelo incentivo e amizade demonstrados durante a realização deste trabalho e da minha carreira profissional e científica.

As minhas grandes amigas de hoje e sempre **Adriana, Camile, Juliana, Paula e Thiesa** pela amizade e por fazerem parte da minha vida.

A todos os **profissionais da Disciplina de Urologia e do Setor de Reprodução Humana** que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao meu filho, **Lucas** e ao meu marido, **Bruno**, pelo incentivo, paciência e amor durante o desenvolvimento desse trabalho. Sem vocês nada disso faria sentido.

Aos **meus pais** por tudo que fizeram por mim e por me ensinarem a ser quem eu sou.

Às minhas irmãs, **Alessandra e Angélica**, por sempre me incentivarem a continuar por mais difíceis que sejam os caminhos.

À **família Monteiro** pelo apoio e companheirismo de sempre.

À **família Risson** pela amizade e companheirismo de toda uma vida.

A todas as **pacientes** que fizeram parte desse estudo.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**  
pelo apoio financeiro ao projeto.



*“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.” (Albert Einstein)*

# SUMÁRIO

Dedicatória.....	v
Agradecimentos.....	vi
Lista de figuras.....	xi
Lista de tabelas.....	xii
Lista de abreviaturas e símbolos.....	xiii
Resumo.....	xv
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>6</b>
<b>3. MÉTODO.....</b>	<b>7</b>
3.0. Desenho do Estudo.....	7
3.1. Protocolo de Estímulo Ovariano.....	7
3.2. Coleta dos Líquidos foliculares.....	8
3.3. Realização da técnica de ICSI.....	8
3.4. Análise da morfologia embrionária.....	9
3.5. Constituição dos Grupos.....	10
3.6. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.....	10
3.7. Atividade da catalase.....	11
3.8. Atividade da glutathione peroxidase.....	11
3.9. Análise Estatística.....	13
<b>4.RESULTADOS.....</b>	<b>14</b>
4.1. Grupo A: gravidez X não gravidez.....	14
4.2. Grupo B: tipo de estímulo hormonal.....	16
4.3. Grupo C: presença de pelo menos um fator feminino de infertilidade.....	17
4.4. Análise de regressão logística.....	17
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>20</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>28</b>
<b>7. ANEXOS.....</b>	<b>29</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>36</b>
<b>Abstract</b>	
<b>Apêndice</b>	
<b>Bibliografia consultada</b>	

## Lista de Figuras

- Figura 1.** Formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), modificado de Chabot et al 1998..... 3
- Figura 2.** Ação das enzimas antioxidantes..... 5
- Figura 3.** Curva ROC (*Receiver Operating Characteristics*) para o modelo logístico de predição de gestação utilizando as variáveis fator de infertilidade feminino, classificação embrionária no terceiro dia de gestação e atividade da enzima glutathione peroxidase.....7

## Lista de Tabelas

- Tabela 1.** Idade da mulher, número de oócitos, porcentagem de oócitos, taxa de fertilização, de embriões transferidos, atividade das enzimas e TBARs em casais que atingiram (grupo A1, n=55) ou não (grupo A2, n=67) a gravidez.....15
- Tabela 2.** Atividade das enzimas catalase e glutathiona peroxidase e TBARs em pacientes que receberam apenas FSH (grupo B1, n=86) e as que receberam FSH e FH para a estimulação ovariana (grupo B2, n=59)..... 16
- Tabela 3.** Atividade das enzimas catalase e glutathiona peroxidase e TBARs em pacientes que apresentaram (grupo C1, n=34) e não apresentaram fator de infertilidade feminino (grupo C2, n=112).....17
- Tabela 4.** Valores do fator feminino, classificação embrionária no terceiro dia de cultivo e atividade da glutathiona incluídas em um modelo logístico maximizando a porcentagem de acerto na predição da taxa de gravidez. Os valores de  $\text{Exp}(B)$  são as razões de chance (*odds-ratio*) para engravidar.30

## Lista de abreviaturas e símbolos

ATP: Adenosina tri-fosfato

$\beta$ -hCG: Subunidade beta da gonadotrofina coriônica humana

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CO<sub>2</sub>: gás carbônico

°C: graus Celsius

d2: 48 horas de cultivo

d3: 72 horas de cultivo

DNA: ácido desoxiribonucléico (do inglês *deoxyribonucleic acid*)

é: elétron

ECM: *embryo cleavage medium*

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

EROs: espécies reativas de oxigênio

FIV: fertilização *in vitro*

FSH: hormônio folículo estimulante

FSHr: hormônio folículo estimulante recombinante

FT: fator tubário

g: Grama

GnRH: Hormônio liberador de gonadotrofina

GPx: glutathione peroxidase

GRD: glutathione reductase

GSH: glutathione reduzida

GSSG: glutathione oxidada

H<sup>•</sup>: radical de hidrogênio

H<sub>2</sub>O: molécula de oxigênio

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio

hCG: gonadotrofina coriônica humana

hMG: gonadotrofina menopausal humana

HTF: *human tubal fluid*

ICSI: injeção intracitoplasmática de espermatozóide

LH: hormônio luteinizante

MDA: malondialdeído

MII: metáfase dois da meiose  
MI: metáfase um da meiose  
 $\mu\text{L}$ : microlitros  
 $\mu\text{m}$ : micrometros  
mg: miligramas  
mL: mililitros  
mm: milímetro  
mM: Mili Molar  
NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida  
 $\text{NO}^-$ : ânion óxido nítrico  
nm: nanômetros %: porcentagem  
 $\text{O}_2^-$ : ânion superóxido  
 $\text{O}_2$ : molécula de oxigênio  
 $\text{ONOO}^-$ : peroxinitrito  
 $\text{OH}^-$ : radical hidroxila  
p:v: peso:volume  
pH: potencial de hidrogênio  
PI: prófase um da meiose  
SOD: superóxido dismutase  
SOP: síndrome do ovário policístico  
SSS: Suplemento substituto do soro  
TBA: ácido tiobarbitúrico  
TCA: ácido tricloroacético  
TBARS: espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico  
TBHP: hidroperóxido de tert-butil  
UI: Unidade internacional  
UI/mL: unidades internacionais por mililitros  
UNIFESP: Universidade Federal de São Paulo  
v:v: volume:volum

## Resumo

**Objetivo:** Verificar a relação entre as concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, a atividade das enzimas glutatona peroxidase e catalase com a ocorrência de gravidez, com o estímulo hormonal administrado e com a presença ou não de um fator de infertilidade feminino. **Método:** Foi realizado um estudo prospectivo caso controle com o líquido folicular de 146 pacientes que foram submetidas ao programa de Reprodução Assistida da UNIFESP. Como critérios de inclusão foram considerados apenas as pacientes que realizaram o protocolo de fertilização *in vitro* (FIV) através de injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI). Os grupos experimentais foram subdivididos de acordo com a presença ou não de gestação, com hormônio administrado durante o estímulo (FSH ou FSH e hMG) e com a presença ou não de pelo menos um fator de infertilidade feminina. As alíquotas dos líquidos foliculares foram coletadas após a retirada dos oócitos e analisadas por espectrofotômetro para mensurar as concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) – um marcador de peroxidação lipídica, e das enzimas catalase e glutatona peroxidase presentes em cada amostra. Um modelo de regressão logística foi construído utilizando número de embriões de alta qualidade no terceiro dia de cultivo transferidos, presença de pelo menos um fator de infertilidade feminino e a atividade da glutatona peroxidase, maximizando a preditibilidade da ocorrência de gravidez. **Resultados:** No grupo de mulheres não grávidas foi observada uma maior atividade da enzima glutatona peroxidase ( $p=0,04$ ). Nos outros grupos não foi observada diferença estatística entre nenhum dos parâmetros avaliados. Na regressão logística, o melhor modelo preditivo para gravidez incluiu os valores de fator de infertilidade, classificação embrionária no terceiro dia de cultivo e a atividade de glutatona peroxidase (73,68%,  $p=0.00001$ ). O valor de *odds-ratio* para a atividade de glutatona peroxidase foi 0,98, indicando que valores crescentes de atividade glutatona levaram à diminuição da chance de ocorrência de gravidez. **Conclusão:** Nas condições deste estudo, (i) mulheres com  $\beta$ -hCG negativo possuem uma maior atividade da glutatona peroxidase, (ii) diferentes estímulos ovarianos não provocam alteração nas concentrações de TBARS e na atividade das enzimas antioxidantes e (iii) a presença de pelo menos um fator de infertilidade feminino não altera a concentração de TBARS e a atividade das enzimas antioxidantes.

**Palavras-chave:** Estresse Oxidativo, Líquido Folicular, Antioxidantes, Radicais livres, Fertilização *in vitro*.

## 1. INTRODUÇÃO

As tecnologias de reprodução assistida são bem estabelecidas e aceitas mundialmente e hoje estão voltadas para um melhor entendimento da fisiopatologia, tanto da infertilidade feminina quanto da masculina, objetivando melhorar as taxas de sucesso dos tratamentos. De acordo com Duckitt (2003), cerca de 15% dos casais em idade reprodutiva irão precisar de tratamento médico específico para alcançar a gestação, sendo o fator feminino diagnosticado responsável em 40% desses casos <sup>(1)</sup>. Dentre as principais causas de infertilidade feminina destacam-se a síndrome do ovário policístico (SOP), a endometriose e o fator tubário (FT) <sup>(2)</sup>.

A síndrome do ovário policístico é uma doença que atinge cerca de 5 a 10% das mulheres em idade reprodutiva e caracteriza-se por uma combinação de fatores que envolvem hirsutismo, amenorréia, obesidade, resistência periférica à insulina e infertilidade <sup>(3;4)</sup>. Como apresenta diversos sinais e sintomas, seu diagnóstico é controverso em diferentes países, sendo basicamente utilizados como parâmetros diagnósticos a desregulação dos hormônios hipofisários, como o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH), e a hiperinsulinemia devido à resistência à insulina. A maioria das mulheres com SOP pode apresentar anovulação, níveis séricos elevados de LH e testosterona além de 8 a 10 folículos ovarianos com 10 mm de diâmetro visualizados pelo ultra-som pré-ovulatório <sup>(3;5;6)</sup>.

Outra causa comum de infertilidade feminina é a disfunção tubária, que corresponde a 30% dos casos de infertilidade. As infecções tubárias podem ser conseqüências de doenças sexualmente transmissíveis, principalmente causadas pela *Neisseria gonorrhoeae* ou *Chlamydia trachomatis*. Além disto, também podem ser causada por infecções intestinais, apendicite, e pela endometriose <sup>(7)</sup>.

A endometriose, definida pela presença e crescimento de tecido endometrial fora da cavidade uterina, acomete de 5 a 15% das mulheres em idade reprodutiva. <sup>(8;9)</sup>. Mulheres com endometriose podem apresentar alteração na foliculogênese, o que contribui para uma deficiência ovulatória e conseqüentemente uma baixa qualidade oocitária, baixas taxas de fertilização, desenvolvimento embrionário e taxas de gestação <sup>(10;11)</sup>.

Existem muitas hipóteses para explicar a etiologia das doenças do trato reprodutivo feminino, porém ainda não estão completamente elucidados os



mecanismos pelos quais essas doenças podem exercer efeitos deletérios sobre a fertilidade feminina. Apesar disto, um fator comum às três doenças supracitadas, sugerido como uma possível via efetora à infertilidade nestas mulheres, é o estresse oxidativo <sup>(11)</sup>.

O estresse oxidativo ocorre quando as espécies reativas de oxigênio (EROs) existentes no metabolismo normal são produzidas em maior quantidade do que o mecanismo de defesa antioxidante possa neutralizá-las, ou seja, ocorre um desbalanço entre a produção de espécies reativas de oxigênio e a capacidade antioxidante do tecido, gerando uma tensão oxidativa <sup>(12)</sup>.

Espécies reativas de oxigênio são átomos, moléculas ou íons que contém oxigênio e possuem um ou mais elétrons livres em sua órbita externa. Essas partículas, formadas por elétrons livres ou não pareados, apresentam grande instabilidade elétrica e, por isto, são extremamente reativas, uma vez que precisam doar ou captar um elétron de outro composto para atingir sua estabilidade. A partir disso, ocorrem reações em cadeia de lesão celular e, por essa característica, recebem o nome de substâncias oxidantes <sup>(13;14)</sup>.

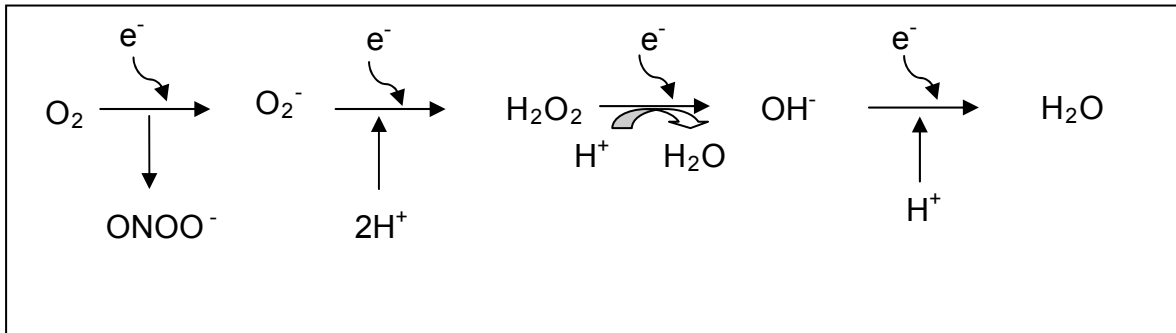
O oxigênio tem a sua atividade fundamental no metabolismo celular aeróbico. Desta forma, a formação das EROs pelo organismo em condições normais é inevitável, pois são necessários no processo de respiração celular que ocorre nas mitocôndrias das células (energia) <sup>(9;15)</sup>.

Apesar de comumente relacionadas a uma série de doenças, as EROs também participam como componentes fundamentais ou moduladores em uma série de funções reprodutivas fisiológicas, tais como maturação oocitária, esteroidogênese ovariana, função do corpo lúteo e luteólise <sup>(16-18)</sup>. O impacto de níveis excessivos de EROs no potencial reprodutivo masculino já está bem estudado, porém os seus possíveis efeitos no sistema reprodutor feminino ainda são pouco compreendidos <sup>(19)</sup>.

Dentre as principais espécies reativas de oxigênios estão o radical hidroxila (OH), o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o ânion óxido nítrico ( $NO^-$ ). O ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio são formados primeiramente, porém a ERO mais reativa e prejudicial é o radical hidroxila que pode ser formado através do  $H_2O_2$  e do ânion superóxido <sup>(20)</sup>.

O ânion superóxido é inicialmente formado por ser aceptor final dos elétrons na cadeia fosforilativa. Em seguida, sofre dismutação (enzimática ou não) e forma o peróxido de hidrogênio que, na presença de elementos de transição (como o Ferro ou o

Cobre), é rapidamente convertido em radical hidroxila. Além de altamente reativo e com grande capacidade de penetrar membranas biológicas, o radical hidroxila possui meia-vida extremamente curta, o que o torna de difícil neutralização por sistemas enzimáticos de proteção antioxidante. (Figura 1) <sup>(20)</sup>.



**Figura 1:** Formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), modificado de Chabot et al 1998.

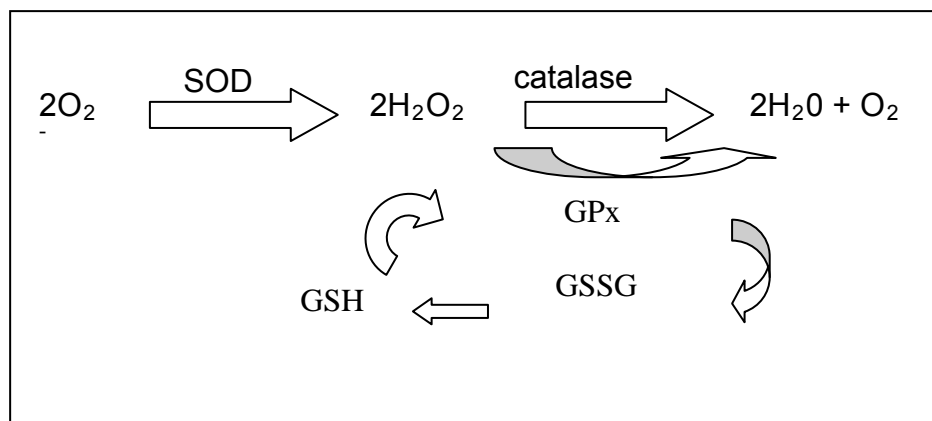
Os organismos, em geral, possuem sistemas naturais, enzimáticos ou não, de eliminação das espécies reativas de oxigênio, eliminando-as ou impedindo sua transformação em produtos mais tóxicos para as células. O efeito prejudicial das EROs ocorre quando elas estão em quantidade excessiva no organismo, ultrapassando a capacidade do organismo de neutralizá-los com os seus sistemas naturais <sup>(21)</sup>.

Diversos antioxidantes enzimáticos protegem os oócitos e embriões dos danos causados pelas espécies reativas de oxigênio, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase e a glutatona peroxidase (GPX) <sup>(22)</sup>. As superóxido dismutases foram as primeiras enzimas metabolizantes de EROs descritas. Elas agem na reação de transformação de duas moléculas de  $O_2^-$  em uma de oxigênio e uma de  $H_2O_2$ . Por isso, também são responsáveis pela formação de um substrato na formação de EROs, o peróxido de hidrogênio <sup>(23)</sup>.

A catalase, por sua vez é uma das enzimas que apresenta maior eficiência dentre as conhecidas, pois nenhuma concentração de peróxido de hidrogênio consegue saturá-la, ou seja, nenhuma quantidade de  $H_2O_2$  consegue fazer com que sua atividade diminua ou se encerre. Ela age catalisando a reação de transformação do peróxido de hidrogênio em duas moléculas de água e uma de oxigênio <sup>(21)</sup>.

Já a glutatona peroxidase apresenta uma ação antioxidante direta e indireta, ou seja, age indiretamente quando decompõe os hidro ou lipoperóxidos e diretamente quando decompõe o peróxido de hidrogênio, assim como a catalase. Isso sugere que a GPX exerce um papel central na defesa antioxidante celular. Nesta reação, a glutatona

reduzida (GSH) é utilizada como substrato para metabolizar o peróxido de hidrogênio, resultando em água e glutathiona oxidada (GSSG), que por sua vez pode ser reduzida novamente para GSH pela enzima glutathiona redutase (GRD). As ações das enzimas antioxidantes estão descritas na figura 2 <sup>(19)</sup>.



**Figura 2:** Ação das enzimas antioxidantes

O estresse oxidativo apresenta grande papel na infertilidade conjugal e seu efeito é demonstrado por múltiplos mecanismos. Em relação à infertilidade feminina pode induzir degeneração oocitária e apoptose, uma vez que altera o fuso meiótico, causa peroxidação lipídica <sup>(24)</sup>, além da perda de seletividade das membranas plasmática e nuclear, inativação de enzimas citoplasmáticas e danos ao DNA, induzindo à morte celular <sup>(25)</sup>.

Altos níveis de estresse oxidativo podem interferir no processo de fertilização *in vitro*, diminuindo a probabilidade de fertilização, induzindo a fragmentação embrionária e impedindo o desenvolvimento *in vitro* até o estágio de blastocistos <sup>(24)</sup>. Em oócitos bovinos, quantidades moderadas de espécies reativas de oxigênio são essenciais para aumentar o potencial de maturação *in vitro* dos oócitos <sup>(13)</sup>. Por outro lado, a presença de baixos níveis de EROs no líquido folicular humano poderia ser um potencial marcador para prever o sucesso de gestação em pacientes submetidas aos procedimentos de fertilização *in vitro* (FIV) <sup>(26)</sup>.

O impacto do estresse oxidativo presente no líquido folicular sobre a maturação oocitária, taxa de fertilização, desenvolvimento embrionário e gravidez ainda não é claro. Durante a foliculogênese, um compartimento relativamente isolado é formado contendo um microambiente específico para a maturação e função das células da granulosa e dos gametas. Esse microambiente assemelha-se em sua composição ao plasma sanguíneo, contendo anticoagulantes, proteínas, enzimas e fatores regulatórios

necessários para um adequado desenvolvimento oocitário <sup>(27)</sup>. Portanto, o líquido folicular é considerado um espelho dos processos metabólicos e hormonais que envolvem o oócito durante todo seu desenvolvimento até a ovulação <sup>(28)</sup>.

Os efeitos patológicos das EROs são demonstrados através de vários mecanismos, sendo o principal deles a peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica gera uma variedade complexa de subprodutos, muito dos quais reagem com o DNA, causando fragmentação, inibem a síntese de algumas proteínas e desestruturam as mitocôndrias causando depleção de ATP. Um dos produtos finais da peroxidação lipídica é o malondialdeído (MDA), considerado como marcador do estresse oxidativo, uma vez que é de fácil mensuração através de uma reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA). Por este motivo, a mensuração dos níveis de MDA é realizada através da avaliação do nível das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) <sup>(29;30)</sup>.

Todavia, existe pouca compreensão de como as EROs afetam uma variedade de funções fisiológicas inerentes ao sistema reprodutor feminino como maturação oocitária, esteroidogênese ovariana, ovulação, implantação, formação de blastocistos, luteólise e manutenção da fase lútea durante a gravidez <sup>(17;31-34)</sup>.

Nos últimos anos, tem ocorrido um aumento no interesse de se investigar o papel das EROs na determinação de alterações ao sistema reprodutor feminino, pois elas podem ser uma ligação principal na investigação da infertilidade como também podem ser a explicação da fisiopatologia de algumas doenças como, por exemplo, a endometriose <sup>(2)</sup>. Diante disso, estudos que visem elucidar essa relação tomam grande ênfase no âmbito científico.

## 2. OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram:

- Comparar os níveis foliculares de glutathione peroxidase, catalase, e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em mulheres que atingiram ou não a gravidez;
- Verificar se o estímulo hormonal com FSHr ou com FSHr e hMG altera os níveis foliculares de glutathione peroxidase, catalase, e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico;
- Comparar os níveis foliculares de glutathione peroxidase, catalase, e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em mulheres com ou sem fatores femininos de infertilidade;
- Verificar se a mensuração dos níveis foliculares de glutathione peroxidase, catalase, e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico contribuem para a predição do resultado de gravidez em ciclos de fertilização *in vitro*, e verificar qual a participação destes níveis na chance de ocorrência de gravidez.

### 3. MÉTODO

Este estudo foi realizado com o apoio do programa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (CEP-UNIFESP) (nº. do processo 1631/08) e todas as pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (anexo1).

#### 3.0. Desenho do estudo

Foi realizado um estudo prospectivo caso-controle incluindo 146 mulheres submetidas ao programa de Reprodução Assistida. Como rotina do ambulatório do Setor de Reprodução Humana da Universidade Federal de São Paulo estas pacientes foram avaliadas clínica e laboratorialmente e, dependendo da causa da infertilidade do casal, direcionadas ao tratamento com antagonista do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) para otimizar a resposta ovariana, proporcionando uma maior recuperação de gametas.

Para serem incluídas no estudo, foram selecionadas apenas as pacientes que utilizaram a técnica da injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI) para a fertilização *in vitro* de embriões.

#### 3.1. Protocolo de Estímulo Ovariano

As pacientes do Programa de Fertilização *in vitro* da Universidade Federal de São Paulo foram submetidas a um de dois protocolos de estímulo ovariano controlado de acordo com a orientação médica. Para um dos estímulos foi administrado, a partir do 2º dia do ciclo menstrual, hormônio folículo estimulante recombinante (FSHr, Gonal F<sup>®</sup>, Merk Serono, Darmstadt, Germany) na dose de 225 UI e para o segundo além do FSH recombinante as pacientes receberam uma dose adicional de 75 UI de gonadotrofina menopausal humana (hMG, Merional<sup>®</sup>, Meizler, Suíça ou Menopur<sup>®</sup>, Ferring, EUA) altamente purificado.

Foram realizadas ultra-sonografias seriadas a partir do 5º dia do ciclo para verificação do crescimento folicular e endometrial. Ao observar ao menos um folículo com diâmetro maior ou igual a 14mm, foi introduzido o antagonista de GnRH

(Cetrotide<sup>®</sup>, Merk Serono, Darmstadt, Germany) na dose de 0,25mg diárias, via subcutânea. Após o surgimento de pelo menos um folículo com diâmetro maior ou igual a 17mm foi administrado gonadotrofina coriônica humana (hCG, Ovidrel<sup>®</sup> Merk Serono, Darmstadt, Germany) na dose de 6500 UI. Após 35 horas da administração do hCG, foi realizada a cirurgia para punção dos folículos ovarianos e aspiração do conteúdo folicular, por via vaginal, dirigida por ultra-sonografia.

### **3.2. Coleta dos líquidos foliculares**

Após a punção ovariana, em sala cirúrgica, os tubos contendo os líquidos foliculares foram levados até o Laboratório de fertilização *in vitro*, anexo à sala cirúrgica. Cada tubo foi cuidadosamente analisado em busca dos oócitos com o auxílio de um estereomicroscópio (Nikon<sup>®</sup> SMZ-U) Após os oócitos terem sido recuperados, foi realizado um *pool* de amostras de líquidos foliculares e estes congelados a -20° C para posterior análise.

### **3.3. Realização da técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI)**

A ICSI foi realizada, por um mesmo embriologista, após três horas da coleta dos oócitos. Esses foram desnudados, química e mecanicamente, para a retirada das células da granulosa (complexo *cumulus*-corona). A denudação química foi realizada através da adição de hialuronidase (0,08% p:v em HTF com Hepes [Irvine Scientific<sup>®</sup>, Santa Ana, EUA]) e a mecânica através da utilização de duas pipetas de denudação com calibres de 170µm e 130µm cada uma (Cook<sup>®</sup> Urological Inc., Indiana-EUA). Os oócitos foram classificados de acordo com o grau de maturidade em MII (oócitos em metáfase dois da meiose), MI (oócitos em metáfase um da meiose), PI (oócitos em prófase um da meiose) e degenerados (oócitos que apresentavam alterações morfológicas graves).

No máximo cinco oócitos classificados como maduros foram selecionados para realização da técnica sendo o excedente descartado. Após o procedimento as células foram colocadas em meio de cultura próprio para o desenvolvimento embrionário *Early Cleavage Medium* - ECM [Irvine Scientific<sup>®</sup>, Santa Ana, EUA] suplementado com 10% v:v de Suplemento Substituto do Soro (SSS [Irvine Scientific<sup>®</sup>, Santa Ana, EUA, 100mg/mL]) e cultivados durante três dias em incubadora (Forma Scientific<sup>®</sup> – modelo

3110) com ambiente controlado de 6% de CO<sub>2</sub> (gás carbônico) em ar, a uma temperatura de 37°C com 90% de umidade.

### 3.4. Análise da morfologia embrionária

Os embriões foram avaliados e classificados como bons ou ruins no terceiro dia de cultivo, através dos critérios utilizados de rotina pelo Laboratório de fertilização *in vitro* da UNIFESP (Quadro 1), com a utilização de um microscópio de campo claro invertido em objetiva com aumento de 40x e ocular de 10x (Nikon® eclipse T2000-U) acoplado a uma placa aquecedora a 37°C (Tokai Hit® modelo-MARTS-SMUZT). Para a análise de regressão logística, as pacientes foram agrupadas, segundo a classificação embrionária, de 0 a 4, de acordo com o número de embriões bons recebidos no dia da transferência, sendo 0 nenhum embrião bom transferido e 4 quatro embriões bons transferidos.

**Quadro 1:** Características morfológicas de embrião bom e ruim com 72 horas de cultivo (d3).

Embrião d3 (72 horas)	Características morfológicas	
<b>Bom</b> <b>(7 - 9 blastômeros)</b>	<u>Grau IV</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Até 10% de fragmentação;</li> <li>• Blastômeros com coloração clara e sem granulação;</li> <li>• Blastômeros com tamanhos simétricos.</li> </ul>
	<u>Grau III</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Até 10 a 20 % de fragmentação;</li> <li>• Blastômeros com coloração clara e pouca granulação;</li> <li>• Blastômeros com tamanhos levemente assimétricos.</li> </ul>
<b>Ruim*</b>	<u>Grau II</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Até 20 a 50 % de fragmentação;</li> <li>• Blastômeros com coloração escura e granulação;</li> <li>• Blastômeros com tamanhos assimétricos.</li> </ul>
	<u>Grau I</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mais de 50 % de fragmentação;</li> <li>• Blastômeros com coloração escura e granulação;</li> <li>• Blastômeros com tamanhos levemente assimétricos.</li> </ul>



\*Independente do número de blastômeros grau I e II são considerados ruins. O embrião foi classificado como bom apenas quando recebia avaliação de bom em ambos os critérios de avaliação.

### 3.5. Constituição dos grupos

O interesse do estudo era de comparar os níveis foliculares de estresse oxidativo de acordo com (i) a ocorrência de  $\beta$ -hCG positivo ( $>25$  UI/mL) ou negativo; (ii) o estímulo hormonal (apenas FSHr ou FSHr e hMG); e (iii) a presença ou ausência de pelo menos um fator de infertilidade feminino (endometriose, fator tubário e/ou SOP). Assim, após a coleta dos dados e a mensuração dos níveis foliculares de cada substância, as pacientes foram agrupadas da seguinte maneira:

- Estudo A
  - Grupo A1: mulheres que atingiram a gravidez (n=55);
  - Grupo A2: mulheres que não atingiram a gravidez (n=67);
- Estudo B:
  - Grupo B1: mulheres que receberam apenas FSHr (n=86);
  - Grupo B2: mulheres que receberam FSHr e hMG (n=59);
- Estudo C:
  - Grupo C1: mulheres com pelo menos um fator de infertilidade (n=34);
  - Grupo C2: mulheres sem fator de infertilidade (n=112).

### 3.6. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrio – TBARS

A concentração de TBARS foi determinada usando o método descrito por Ohkawa et al. (1979), que se baseia na determinação de malondialdeído (MDA) devido à sua reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA)<sup>(35)</sup>. Aldeídos sempre são produzidos em processos de peroxidação lipídica, sendo o malondialdeído o mais abundante. Cada molécula de MDA, em altas temperaturas e pH ácido, reage com duas moléculas de TBA, gerando uma coloração rósea que pode ser detectada em espectrofotômetro.

Inicialmente, foram removidas as proteínas, que poderiam gerar um sinal inespecífico para MDA. Para tanto, 500 $\mu$ L de líquido folicular foram adicionados a 1000 $\mu$ L de uma solução de ácido tricloroacético (TCA, Sigma® T5500) 10% (p:v, em água) e centrifugados (centrífuga Eppendorf® 5804R) a 16.100g por 15 minutos a 15°C. Após a centrifugação, 500 $\mu$ L do sobrenadante e 500 $\mu$ L de ácido tiobarbitúrico

(Sigma® T 5500) 1% (v:v, em 0,05M de hidróxido de sódio (Sigma S 8045)) (TBA, 1%) foram colocados em tubos tampados e deixados por 10 minutos em água em ebulição (90-100°C). Logo em seguida, os tubos foram resfriados em gelo para parar a reação química.

As moléculas de TBARS foram quantificadas através da utilização de um espectrofotômetro (Ultrospec 3300pro, GE Healthcare, Amersham Place, UK) em um comprimento de onda de 532nm. Os resultados foram comparados com uma curva padrão previamente preparada com uma solução padrão de malondialdeído (Sigma® 10,838-3).

A concentração de TBARS foi determinada usando um coeficiente de extinção molar de MDA de  $1,56 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ . O índice de peroxidação lipídica está descrito em nanogramas de TBARS/mL de líquido folicular.

### 3.7. Atividade da Catalase

A atividade da enzima catalase foi determinada indiretamente através do consumo de peróxido de hidrogênio, avaliado através da leitura espectrofotométrica (Ultrospec 3300pro, GE Healthcare, Amersham Place, UK) no comprimento de onda de 230nm e a temperatura de 30°C, durante 5 minutos<sup>(36)</sup>.

Em uma cubeta de 2 mL, foram adicionados 20µL de água milli-Q, 5µL de líquido folicular, 25µL de tampão TE (50mM de trisaminometano e 25mM de EDTA, pH=8,0, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e 450µL de peróxido de hidrogênio 900µM. Em seguida, a cubeta foi colocada no espectrofotômetro e a leitura foi realizada em 300 segundos.

Os cálculos consideram o valor de  $0,071 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  como coeficiente de extinção molar do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). A atividade da catalase foi calculada baseada na fórmula (o resultado expresso em UI/mL):

Atividade da catalase = (absorbância inicial – absorbância final) / 0,071 x diluição,

Os cálculos das concentrações dos reagentes estão expresso no anexo 2.

### 3.8. Atividade da glutathiona peroxidase

A atividade da enzima GPX foi determinada indiretamente através da mensuração do consumo do NADPH (Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida) utilizando um protocolo de Beutler modificado por Bittencourt<sup>(36;37)</sup>.

A reação entre o hidroperóxido e a glutathiona reduzida (GSH) é catalisada pela GPX junto com a enzima glutathiona redutase (GRD). Essa reação causa a conversão da glutathiona dissulfídica (GSSH) em GSH com o consumo de NADPH, este último mensurado por um espectrofotômetro (Ultrospec 3300pro, GE Healthcare, Amersham Place, UK).

Em uma cubeta de 2 mL foram adicionados 20µL de azida sódica 0,25mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), 20µL de GRD 0,25UI (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), 100µL de GSH 0,12mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), 660µL de tampão fosfato de sódio / EDTA (143mM de fosfato de sódio e 63mM de EDTA, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), 100µL de líquido folicular e 1000µL de NADPH 0,012mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). A azida sódica é utilizada para bloquear a ação da catalase. Em seguida, a cubeta foi agitada e levada ao espectrofotômetro durante 300 segundos para estabilizar a reação. Passado esse tempo foi adicionado 100µL de hidroperóxido de tert-butil 12mM (TBHP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e deixado por mais 300 segundos.

O consumo de NADPH foi mensurado no comprimento de onda de 340nm durante 10 min a 37°C (medidos a cada 5 segundos). Os cálculos consideram o valor de 0,0062 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> como coeficiente de extinção molar do NADPH.

A atividade da glutathiona peroxidase foi calculada baseada na fórmula (sendo o resultado expresso em UI/mL):

$$\text{Atividade da GPX} = (\text{absorbância final} - \text{inicial}) / 0,0062 \times \text{diluição}$$

Os cálculos das concentrações de cada reagentes estão representados no anexo 3.

### 3.9. Análise estatística

Inicialmente foi verificado se os dados apresentavam homogeneidade das variâncias. Para testes de comparação de médias, variáveis heterocedásticas foram transformadas, e foi utilizado um teste T de Student para amostras não-pareadas, utilizando como fator de agrupamento o evento a ser estudado (ocorrência ou não de gravidez, estímulo hormonal e presença ou ausência de fator feminino).

Para verificar o impacto das enzimas antioxidantes e do nível de peroxidação lipídica na taxa de gravidez, foi realizada uma regressão logística. Foram adicionadas, no programa de análise estatística, todas as variáveis que pudessem participar no modelo como variáveis independentes (excluindo aquelas correlacionadas com outras). A variável resposta no modelo foi  $\beta$ -hCG, sendo a alteração na chance de ocorrência de  $\beta$ -hCG=1 (gravidez) calculada.

Após o cálculo de um modelo contendo todas as variáveis independentes relevantes, os valores preditivo positivo, preditivo negativo e preditivo total foram calculados (porcentagem de acerto quando o resultado real [observado] foi positivo, negativo, e total), e em seguida o modelo era calculado novamente, excluindo a variável independente menos significativa. Estes passos foram seguidos até ser montado um modelo que maximizasse o acerto na predição de ocorrência ou não de gravidez.

Em seguida, foi desenhada uma curva ROC (Receiver Operating Characteristics) comparando os valores previstos com os valores observados. Caso a área sob a curva apresentasse um valor significativamente maior do que 50% ( $p < 0,05$ ), o modelo foi considerado importante como fator de predição.

Para o estudo, foi adotado um alfa de 5%.

## 4. RESULTADOS

Neste estudo, os 146 líquidos foliculares das pacientes foram agrupados de diferentes maneiras com o objetivo de verificar o impacto da concentração das enzimas antioxidantes catalase e glutathione peroxidase e do TBARs na taxa de gestação, estímulo hormonal (FSHr ou FSHr e hMG) e presença de pelo menos um fator feminino de infertilidade.

### 4.1 Estudo A: gravidez x não gravidez

No total, 55 mulheres atingiram a gravidez (grupo A1) e 67 não atingiram (grupo A2). Estes dois grupos foram avaliados quanto à idade da mulher, número de oócitos, porcentagem de oócitos em metáfase II, em metáfase I, em prófase I, degenerados e porcentagem de oócitos sem alteração, além da taxa de fertilização e atividade das enzimas catalase e glutathione peroxidase e concentração de TBARs. Os resultados estão apresentados na tabela 1. No grupo que não atingiu a gravidez, foi observada uma maior atividade da enzima antioxidante glutathione peroxidase ( $p=0,04$ ).

**Tabela 1:** Idade da mulher, número de oócitos, porcentagem de oócitos, taxa de fertilização, atividade das enzimas e TBARS em casais que atingiram (grupo A1, n=70) ou não (grupo A2, n=100) a gravidez.

	<b>Grupo A1</b>	<b>Grupo A2</b>	<b>p</b>
<b>Idade mulher (anos)</b>			
Média; DP	33,09; 4,37	33,33; 4,90	
IC 95%	[32,06;34,13]	[32,36; 34,13]	0,74
Mín-máx	19 - 41	21 - 44	
<b>Número de oócitos</b>			
Média; DP	9,91; 6,08	8,81; 5,82	
IC 95%	[8,47; 11,35]	[7,66; 9,96]	0,23
Mín-máx	1 - 29	1 - 31	
<b>Porcentagem de oócitos em MII</b>			
Média; DP	0,74; 0,17	0,76; 0,20	
IC 95%	[0,69; 0,78]	[0,72; 0,80]	0,51
Mín-máx	0,4 - 1	0,125 - 1	
<b>Porcentagem de oócitos em MI</b>			
Média; DP	0,07; 0,09	0,09; 0,15	
IC 95%	[0,05; 0,09]	[0,06; 0,12]	0,30
Mín-máx	0 - 0,0375	0, 0,875	
<b>Porcentagem de oócitos em PI</b>			
Média; DP	0,13; 0,14	0,09; 0,13	
IC 95%	[0,09; 0,16]	[0,06; 0,12]	0,09
Mín-máx	0 - 0,5	0 - 0,7	
<b>Taxa de fertilização</b>			
Média; DP	0,77; 0,24	0,66; 0,26	
IC 95%	[0,71; 0,82]	[0,66; 0,76]	0,16
Mín-máx	0 - 1	0 - 1	
<b>Atividade da glutatona peroxidase (UI/mL)</b>			
Média; DP	105,34; 38,43	119,90; 49,88	
IC 95%	[96,17; 114,50]	[110,05; 129,74]	0,04*
Mín-máx	35,91 - 217,58	18,26 - 316,13	
<b>Atividade da catalase (UI/mL)</b>			
Média; DP	6,85; 6,7	6,26; 6,01	
IC 95%	[5,26; 8,44]	[5,08; 7,45]	0,55
Mín-máx	0 - 25	0 - 30	
<b>TBARS (UI/mL)</b>			
Média; DP	67,19; 87,61	82,32; 150,52	
IC 95%	[46,45; 87,93]	[ 52,06; 112,03]	0,44
Mín-máx	0 - 669	0 - 1302	

DP: desvio padrão

IC 95%: intervalo de confiança de 95%

III: oócitos em metáfase II da meiose

MI: oócitos em metáfase I da meiose

PI: oócitos em prófase I da meiose

Min-máx: mínimo e máximo

\*p<0,05

#### 4.2. Estudo B: tipo de estímulo hormonal

No total, 86 mulheres foram estimuladas apenas com FSHr (grupo B1) e 60 mulheres foram estimuladas com FSHr e hMG (grupo B2). Nestes dois grupos foram comparadas a atividade das enzimas catalase e glutatona peroxidase e concentração de TBARS. Os resultados estão apresentados na tabela 2. Não foi observada diferença entre os grupos.

**Tabela 2:** Atividade das enzimas catalase e glutatona peroxidase e TBARS em pacientes que receberam apenas FSHr (grupo B1, n=86) e as que receberam FSHr e hMG para a estimulação ovariana (grupo B2, n=60).

	<b>Grupo B1</b>	<b>Grupo B2</b>	<b>p</b>
<b>Atividade da glutatona peroxidase (UI/mL)</b>			
Média; DP	115,45; 47,72	112,18; 42,87	
IC 95%	[105,15; 125,74]	[101,01; 123,35]	0,45
Mín-máx	18,26 – 316,14	36,53 – 240,26	
<b>Atividade da catalase (UI/mL)</b>			
Média; DP	6,84; 7,84	7,52; 6,31	
IC 95%	[5,16; 8,52]	[5,88; 9,17]	0,58
Mín-máx	0 – 48,85	0 – 22,82	
<b>TBARS (UI/mL)</b>			
Média; DP	69,76; 90,72	90,87; 186,85	
IC 95%	[50,31; 89,21]	[41,74; 140,0]	0,73
Mín-máx	0 – 754,20	0 – 1302	

DP: desvio padrão

IC 95%: intervalo de confiança de 95%

Min-máx: mínimo e máximo

### 4.3. Grupo C: presença de pelo menos um fator feminino de infertilidade

No total, 34 mulheres apresentaram pelo menos um fator feminino de infertilidade (endometriose, SOP, fator tubário [grupo C1]) e 112 mulheres não apresentaram nenhum fator de infertilidade (grupo C2). Estes dois subgrupos foram avaliados quanto à atividade das enzimas catalase e glutatona peroxidase e concentração de TBARS. Os resultados estão apresentados na tabela 3. Não foi observada diferença entre os grupos.

**Tabela 3:** Atividade das enzimas catalase e glutatona peroxidase e TBARS em pacientes que apresentaram (grupo C1, n=34) e não apresentaram fator de infertilidade feminino (grupo C2, n=112).

	Grupo C1	Grupo C2	p
<b>Atividade da glutatona peroxidase (UI/mL)</b>			
Média; DP	112,84; 40,03	114,91; 47,42	
IC 95%	[98,87; 126,81]	[105,99; 123,83]	0,828
Mín-máx	18,26 – 200,54	36,53 – 316,14	
<b>Atividade da catalase (UI/mL)</b>			
Média; DP	6,13; 7,21	7,41; 7,23	
IC 95%	[3,61; 8,64]	[6,03; 8,76]	0,619
Mín-máx	0 – 30,92	0 – 48,85	
<b>TBARS (UI/mL)</b>			
Média; DP	129,34; 268,19	62,78; 51,35	
IC 95%	[34,24; 224,44]	[53,16; 72,39]	0,975
Mín-máx	0 – 1302,0	0 – 286,50	

DP: desvio padrão

IC 95%: intervalo de confiança de 95%

Min-máx: mínimo e máximo

### 4.4. Análise de regressão logística

Para verificar o efeito dos fatores que participaram nos resultados de gravidez, um modelo logístico foi escolhido com o objetivo de maximizar a porcentagem de acerto. Para tanto, inicialmente foram incluídas todas as variáveis a serem estudadas e que não apresentassem alta correlação entre si. De maneira regressiva, foram removidas as variáveis menos significativas até atingir um máximo de acerto na predição. Um modelo logístico foi formado onde os valores do fator feminino de infertilidade, da classificação embrionária no terceiro dia e da atividade da glutatona peroxidase auxiliaram na predição da gravidez, sendo representados na tabela 4.



**Tabela 4.** Valores do fator feminino, classificação embrionária no terceiro dia de cultivo e atividade da glutatona incluídas em um modelo logístico maximizando a porcentagem de acerto na predição da taxa de gravidez. Os valores de Exp(B) são as razões de chance (*odds-ratio*) para engravidar.

	<b>Sig</b>	<b>Exp(B)</b>	<b>IC 95%</b>
<b>Fator feminino (0 – ausente, 1 – presente)</b>	0,002*	0,27	[0,11; 0,64]
<b>Classificação D3</b>	0,00027*		
<b>Classificação D3 (1)</b>	0,285	1,69	[0,64; 4,44]
<b>Classificação D3 (2)</b>	0,132	2,27	[0,77; 6,61]
<b>Classificação D3 (3)</b>	0,0003*	7,34	[2,44; 22,09]
<b>Classificação D3 (4)</b>	0,0001*	7,11	[2,54; 19,87]
<b>Atividade da glutatona UI/mL</b>	0,001*	0,98	[0,98; 0,99]

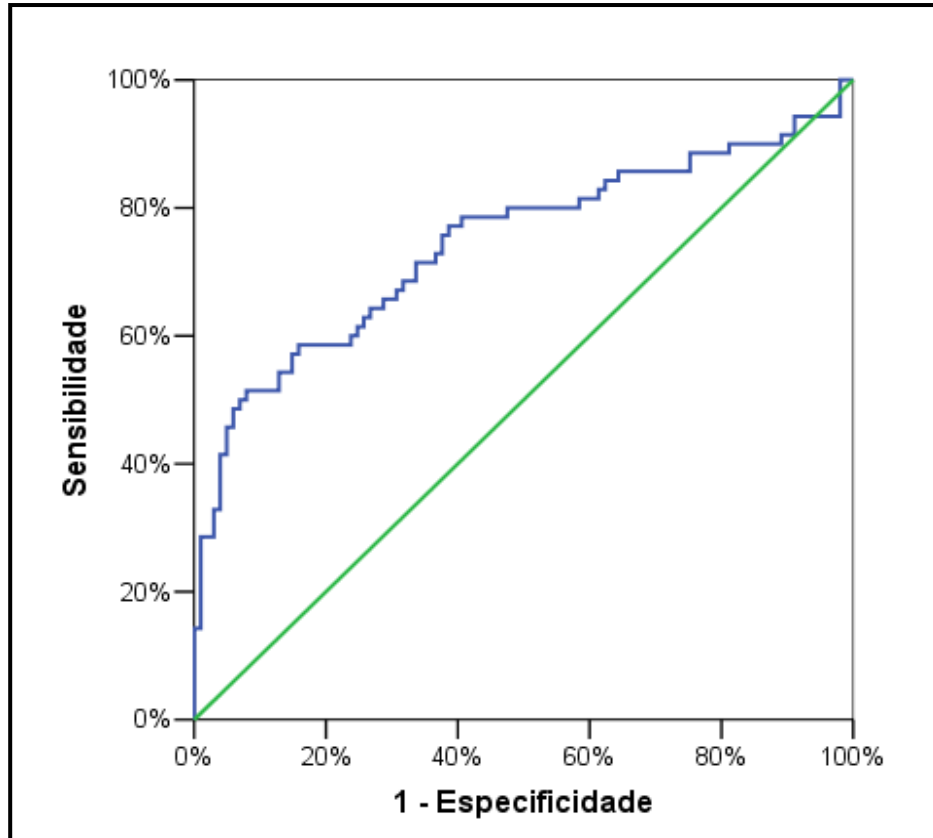
p – probabilidade de erro ao afirmar que o valor de Exp(b) é diferente de 1,0.  
Exp(b) – *Odds-ratio* para ocorrência de gravidez. Valores acima de 1 indicam que valores crescentes nas variáveis independentes aumentam a chance de ocorrência de gravidez, enquanto valores abaixo de 1 indicam diminuição na chance de ocorrência de gravidez. Para as variáveis categóricas, o valor 0 é o de referência, e o Exp(b) indica a alteração na chance de ocorrência de gravidez ao alterar de 0 para o evento.

\* -  $p < 0,05$

**Quadro 2.** Valores observados e preditos pelo modelo logístico de gravidez e porcentagem de acerto do modelo apresentado na tabela 4.

<b>Observado</b> (gravidez)	<b>Modelo (previsão)</b>		
	<b>Gravidez</b>		<b>Porcentagem de Acerto</b>
	<b>Não</b>	<b>Sim</b>	
<b>Não</b>	86	15	85,15%
<b>Sim</b>	30	40	57,14%
<b>Porcentagem total</b>			73,68%

**Figura 3.** Curva ROC (*Receiver Operating Characteristics*) para o modelo logístico de predição de gestação utilizando as variáveis fator de infertilidade feminino, classificação embrionária no terceiro dia de gestação e atividade da enzima glutatona peroxidase.



Área sob a curva= 0,744

$p < 0,00001$

Sensibilidade= 71,4% e especificidade= 66,3%

## 4. DISCUSSÃO

As técnicas de reprodução assistida envolvem a manipulação direta tanto dos gametas femininos e masculinos quanto dos embriões com o objetivo de atingir uma gestação de um único feto saudável. Uma grande variedade de fatores está relacionada com o sucesso dessas técnicas, portanto, é importante determinar em quais pontos pode-se intervir <sup>(38;39)</sup>.

Desde o início do processo de desenvolvimento dos sistemas reprodutivos ocorrem mudanças dinâmicas no metabolismo e na geração de subprodutos em uma escala extraordinária <sup>(40)</sup> e dentre tais subprodutos encontram-se as espécies reativas de oxigênio, formadas fisiologicamente durante o processo de consumo de oxigênio <sup>(20)</sup>. A possibilidade de que o estresse oxidativo esteja envolvido com alterações no sistema reprodutor humano foi proposta há mais de sessenta anos por MacLeod (1943) e ainda é foco de muitas pesquisas no âmbito científico. Por isso, sugere-se a realização da análise dos efeitos do estresse oxidativo através da mensuração dos subprodutos da peroxidação lipídica e da atividade de enzimas antioxidantes presentes em amostras de Líquidos foliculares humanos.

Como o líquido folicular é um microambiente específico para a maturação oocitária, ele pode exercer grande influência sobre os parâmetros avaliados durante os procedimentos de reprodução assistida <sup>(2)</sup>; entretanto os efeitos de diferentes níveis de EROs, bem como os das enzimas antioxidantes no ambiente folicular e suas ações ainda não estão bem estabelecidos.

De acordo com alguns autores as espécies reativas de oxigênio podem exercer um importante papel na fertilidade, agindo nos espermatozóides, na maturação dos oócitos *in vivo*, na fertilização *in vitro* e no desenvolvimento *in vitro* dos embriões, apresentando papel fisiológico em alguns níveis, porém causando efeitos deletérios em níveis alterados <sup>(26;41-45)</sup>.

Tosic *et al.*(1947) e Riley *et al.*(1991), demonstraram que o peróxido de hidrogênio provoca uma diminuição na motilidade dos espermatozóides bovinos enquanto que Mammoto *et al.*(1996) observaram uma diminuição da penetração dos espermatozóides nos oócitos bovinos e um bloqueio da fusão dos espermatozóides aos oócitos de camundongos <sup>(46-48)</sup>. Entretanto, Aitken *et al.* (1989), demonstraram que concentrações moderadas das espécies reativas de oxigênio parecem estar envolvidas

com o processo normal da fusão espermatozóide com o oócito, tanto em camundongos quanto em humanos, como também com a capacidade embrionária de atingir o estadió de blastocisto sugerindo que as espécies reativas de oxigênio fazem parte da fisiologia tanto da maturação oocitária quanto do desenvolvimento embrionário <sup>(49)</sup>.

Outro estudo, porém, sugeriu que baixas concentrações de EROs, nos líquidos foliculares de pacientes submetidas aos tratamentos de fertilização *in vitro*, podem ser um provável marcador de gestação <sup>(50)</sup>, enquanto que outros autores demonstraram que concentrações excessivas das EROs estão relacionadas à perda de qualidade no desenvolvimento embrionário e aos mecanismos fisiopatológicos de abortos espontâneos <sup>(51;52)</sup>.

A geração de EROs é controlada por uma série de processos enzimáticos e não enzimáticos e esse controle pode ser determinante para o sucesso da fertilização e posterior implantação. Os mecanismos de defesa enzimáticos removem o  $O_2^-$  e seus subprodutos, como  $H_2O_2$  e o  $OH^-$ , através de reações catalisadas pelas enzimas SOD, GPX e catalase. Entretanto a relação oxidação – antioxidante no líquido folicular não tem recebido muita atenção <sup>(53)</sup>.

Alguns estudos demonstraram que as atividades do SOD, da catalase e da GPX asseguram uma ação eficiente contra as espécies reativas de oxigênio, impedindo assim que elas difundam rapidamente através das membranas oocitárias durante o início da atividade meiótica. Sabe-se que as membranas celulares germinativas são particularmente vulneráveis ao ataque das EROs uma vez que são ricas em ácidos graxos poliinsaturados <sup>(54;55)</sup>.

Carbone et al. (2003) demonstraram um aumento relativo na atividade da SOD em comparação à catalase, como também da relação catalase/GPX, em mulheres com idade mais avançada, sugerindo que elas apresentam um maior estresse oxidativo o que justificaria suas menores taxas de gestação <sup>(56)</sup>. Já Lapointe e Bilodeau (2003), demonstraram a importância da remoção do peróxido de hidrogênio, seja através da catalase ou da GPX, uma vez que ele tem grande influência negativa sobre eventos cruciais durante a fusão dos gametas <sup>(57)</sup>.

Outros autores verificaram que a catalase apresenta uma maior eficiência e atividade quando em altas concentrações de  $H_2O_2$  enquanto a GPX apresenta melhor atividade quando em baixas concentrações do mesmo, o que sugere que a catalase é útil para o combate, enquanto a GPX tem um papel mais importante na prevenção ao estresse oxidativo <sup>(57;58)</sup>.

Entretanto, o presente estudo observou maior atividade da glutathione peroxidase nas pacientes que não atingiram a gestação e nenhuma diferença na atividade da catalase e na concentração de TBARS entre as pacientes grávidas e não grávidas. Além disso, no nosso modelo logístico pudemos verificar um valor de *odds-ratio* de 0,98 em relação à atividade da GPX, o que indica que valores crescentes de atividade de GPX estão associados com a diminuição da chance de ocorrência de gravidez.

Dois hipóteses que podem explicar os resultados observados em relação a GPX são (i) a de que, a principal via de degradação do peróxido de hidrogênio no líquido folicular é a da glutathione peroxidase, (ii) ou ainda que a GPX não esteja participando do processo de proteção antioxidante. Esses dados corroboram com Guérin et al. (2001), os quais sugeriram que a GPX apresenta um papel central na proteção antioxidante celular através da ação direta na remoção dos hidroperóxidos de lipídeos e indireta através da quebra do  $H_2O_2$  <sup>(19)</sup>.

Já em relação à catalase, três possíveis explicações para os resultados encontrados são (i) como é uma enzima que não é saturada, a concentração existente pode ser suficiente para combater as espécies reativas de oxigênio, independente de sua concentração ou, (ii) não é a via principal de degradação do peróxido de hidrogênio e por isso, os níveis existentes não se alteram frente a diferentes situações, (iii) ou ainda que não esteja ocorrendo estresse oxidativo nos líquidos foliculares analisados.

Outras prováveis hipóteses que podem explicar os resultados encontrados em relação às substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico são (i) os níveis de peroxidação lipídica são muito baixos que acabaram por ser indetectáveis pela técnica utilizada, (ii) os líquidos foliculares analisados não apresentam estresse oxidativo, (iii) ou ainda que o  $OH^-$  tem ação preferencial pelo DNA, não provocando peroxidação lipídica e por isso não sendo detectável pela técnica utilizada. Tremellen K (2008) sugeriu que as EROs podem ter ação direta no DNA de espermatozoides humanos provocando alterações que podem ser passadas às próximas gerações <sup>(59)</sup>.

Outra relação bastante investigada atualmente é a influência das espécies reativas de oxigênio nas taxas de fertilização e desenvolvimento embrionário. Alguns autores observaram que a atividade reduzida da glutathione peroxidase poderia estar relacionada com falhas de fertilização em humanos, sugerindo que a atividade da GPX poderia ser utilizada como um fator preditivo do potencial de fertilização <sup>(60;61)</sup>.

Em contrapartida, Jozwik et al. (1999) e Attaran et al. (2000) não observaram relação entre os níveis antioxidantes e de TBARS com a maturação oocitária, taxa de fertilização e qualidade embrionária, sendo o mesmo descrito por outros autores sugerindo que a presença de marcadores do estresse oxidativo no líquido folicular não reflete o potencial de fertilização oocitário <sup>(31;50;62)</sup>. Similar aos resultados encontrados nos trabalhos anteriores, o presente estudo também não observou uma correlação ( $r < 0,3$ ) entre a atividade das enzimas antioxidantes e as taxas de fertilização dos oócitos.

Sabatini et al. (1999) obtiveram resultados diferentes deste estudo, observando que baixos níveis de atividade da superóxido dismutase estavam presentes nos líquidos foliculares cujos oócitos atingiram fertilização *in vitro*, demonstrando que alguma quantidade de estresse oxidativo pode ser necessária para a ocorrência de fertilização <sup>(18)</sup>.

Isso pode ser explicado pelo fato de que as EROs causam efeitos deletérios às mitocôndrias, ao DNA e ao RNA, diminuindo o potencial de fusão oócito – espermatozóide, assim como diminuindo o potencial do oócito em descondensar o DNA espermático e formar os pronúcleos. Já o efeito deletério das EROS nos embriões pode estar relacionado à indução da peroxidação lipídica que prejudica a divisão celular, o transporte de metabólitos e a função mitocondrial, além de gerar inativação de algumas enzimas e fragmentação do DNA embrionário, provocando uma diminuição no desenvolvimento e um aumento da fragmentação embrionária <sup>(19;20;63;64)</sup>.

Essa contradição de resultados pode ser explicada pelo fato dos trabalhos utilizarem diferentes técnicas de detecção do estresse oxidativo, como por exemplo, a capacidade antioxidante total e mensuração da atividade direta de enzimas antioxidantes. No primeiro caso, a mensuração leva em consideração não apenas os antioxidantes enzimáticos como também os não-enzimáticos (albumina, ferritina,  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -caroteno, entre outros). Já no segundo caso foi avaliada a atividade das enzimas antioxidantes, superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, separadamente, mostrando a influência de cada uma nos parâmetros avaliados.

O sucesso ou a falha nas técnicas de reprodução assistida depende da determinação das causas subjacentes de infertilidade e adequação do melhor protocolo de estimulação ovariana. Todavia, para que a resposta seja adequada à estimulação, a reserva ovariana basal é o fator determinante <sup>(65)</sup>. Estudos que buscam entender a relação entre os diferentes protocolos de estimulação ovariana e suas conseqüências

no desenvolvimento do ambiente folicular têm contribuído para o melhor entendimento da fisiologia e das alterações causadas por esses protocolos <sup>(66-68)</sup>.

Embora esses trabalhos tenham contribuído para se compreender o microambiente folicular, nenhum relaciona a influência da estimulação ovariana na produção de espécies reativas de oxigênio. O presente estudo relacionou níveis de TBARS e a atividade das enzimas antioxidantes catalase e glutathione peroxidase com os diferentes protocolos de estimulação ovariana.

O LH estimula a produção de andrógenos nas células da teca, que induzem a produção de receptores de FSH, o que aumenta a atividade das aromatases e a produção de estrógenos e inibinas <sup>(69)</sup>. O estrógeno estimula a proliferação celular no interior do folículo <sup>(70)</sup> e conseqüentemente o aumento do metabolismo e das concentrações das EROs no ambiente intrafolicular; por outro lado o estradiol confere uma proteção contra a apoptose através da regulação da atividade mitogênica <sup>(71)</sup>.

Alguns autores relataram que o excesso dos níveis das EROs pode resultar na depleção de enzimas antioxidantes o que pode afetar a produção de estrógenos pelas células da granulosa, causando peroxidação lipídica, que pode alterar a produção de hormônios glicoprotéicos como a inibina A, a inibina B, a ativina A e o hormônio anti-Mülleriano – importantes marcadores investigados para predizer a resposta ovariana, refletindo assim no potencial de resposta aos diferentes estímulos ovarianos <sup>(72-74)</sup>.

Outros autores têm demonstrado, em ratas, que moderadas concentrações de EROs estão associadas com a proliferação das células da teca enquanto altas concentrações estão associadas com a supressão da produção dos hormônios produzidos por elas. A influência da concentração de antioxidantes também foi associada com a inibição das células da teca <sup>(75;76)</sup>, sugerindo que as espécies reativas de oxigênio podem estar envolvidas com a alteração de hormônios produzidos pelos ovários. Entretanto, neste estudo não foram evidenciadas relações entre as enzimas catalase e glutathione peroxidase bem como a concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nas mulheres que receberam apenas como estímulo ovariano FSHr ou FSHr associado ao hMG. É importante notar que como é um estudo prospectivo caso controle não existiram fatores, do ponto de vista do estudo, para indicar uma forma de tratamento ou outro. Ainda assim, as pacientes que receberam hMG receberam uma dose total de 300UI de FSH por dia, 75 UI a mais do que aquelas que receberam apenas FSHr, e isso deve ser levado em consideração quando analisados os resultados das pacientes agrupadas de acordo com o estímulo hormonal.

Outra provável influência das espécies reativas de oxigênio está relacionada com as diferentes causas de infertilidade, como a endometriose, o fator tubário e a SOP. Os eritrócitos, os macrófagos, o tecido apoptótico endometrial e os debris celulares transplantados na cavidade peritoneal pelo refluxo da menstruação nas pacientes com endometriose são os principais responsáveis pelo aumento do estresse oxidativo, que por sua vez induz uma inflamação local resultando em elevados níveis de citocinas e de outros fatores que promovem a endometriose, formando-se um ciclo (24;77). Entretanto, Arumugam e Dip (1995) não encontraram diferença entre os níveis de malondialdeído, produto do estresse oxidativo, em mulheres com endometriose em comparação com as mulheres sem a doença (78).

Diferente do que foi relatado, por Attaran et al. (2000), que observaram altos níveis de EROs em pacientes com endometriose, Szczepanska et al. (2003) observaram que mulheres com endometriose apresentavam baixos níveis de superóxido dismutase e glutathione peroxidase no fluido peritoneal e altos níveis de peroxidação lipídica quando comparadas com mulheres saudáveis. Em ambos os trabalhos sugere-se uma relação positiva entre os níveis de EROs e a presença da doença (50;79).

Outros autores, porém, estabeleceram uma relação entre o estresse oxidativo e pacientes com síndrome do ovário policístico e demonstraram um aumento significativo das EROs e uma relação direta entre a sua geração e os níveis androgênicos das pacientes com SOP, sugerindo que o estresse oxidativo apresenta um importante papel no desenvolvimento da resistência à insulina e do hiperandrogenismo, característico da doença (62). Outros trabalhos verificaram que pacientes com SOP apresentaram uma maior concentração de espécies reativas e de oxigênio e conseqüentemente maior peroxidação lipídica e pior qualidade oocitária (50;78;80;81).

Já Bedaiwy et al. (2002), observaram uma correlação negativa entre taxa de desenvolvimento embrionário até blastocisto com os níveis das EROs, sugerindo que elas estão envolvidas com os efeitos de embriotoxicidade presentes no microambiente folicular de pacientes com fator tubário (25). Esses dados corroboram com um estudo anterior realizado por Strandell et al. (2001), os quais demonstraram que a detecção de baixos níveis de estresse oxidativo poderia ser utilizada como possível marcador da função tubária (82).

O presente estudo avaliou a presença de pelo menos um dos fatores citados anteriormente e a ausência de fatores femininos de infertilidade, não sendo observada



diferença na atividade das enzimas antioxidantes e da concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) entre os grupos.

O delicado balanço existente entre as espécies reativas de oxigênio e os antioxidantes presentes no sistema reprodutor feminino é responsável pela manutenção da homeostasia no ambiente folicular. Em níveis fisiológicos as EROs desempenham importante papel na modulação de muitas funções fisiológicas no sistema reprodutor. Por outro lado, sua ação deletéria está relacionada ao fato de apresentarem grande capacidade de difusão, atravessando membranas celulares e alterando diversos tipos de moléculas (lipídios, proteínas e ácidos nucleicos), provocando desestruturação mitocondrial, depleção de ATP, falhas de fertilização, bloqueio no desenvolvimento embrionário e queda nas taxas de gestação <sup>(82-85)</sup>.

O presente trabalho criou modelos de regressão logística com o intuito de verificar a relação entre variáveis independentes (fator de infertilidade, classificação de embriões no terceiro dia de cultivo e atividade da glutathione peroxidase) e a chance de ocorrência de gestação, além de montar um modelo de predição de ocorrência de gravidez utilizando as enzimas antioxidantes e o TBARS. Nesse estudo, procurou-se verificar o efeito do estresse oxidativo no líquido folicular das pacientes submetidas ao programa de fertilização *in vitro*.

Foi escolhido o modelo que melhor previu resultados certos (gravidez ou ausência de gravidez) com o menor número possível de variáveis independentes, para manter o modelo mais simples.

De acordo com as análises observou-se uma porcentagem de acerto de 73,7% ao predizer a ocorrência de gravidez. Os valores levaram a uma área sob a curva de 0,744, estatisticamente acima de 0,5 ( $p < 0,0001$ ), demonstrando que o modelo contribui para explicar a ocorrência de gravidez. Em outras palavras, pode-se assumir que o fator feminino, as classificações embrionárias no terceiro dia de cultivo e a atividade da enzima glutathione peroxidase tem influência na chance de ocorrência de gravidez.

É importante ressaltar ainda, que o modelo logístico demonstrou que ao se transferir três ou quatro embriões considerados bons (entre 7 a 9 blastômeros e grau morfológico III e IV) aumenta em aproximadamente 7 vezes a chance de ocorrência de gestação quando comparado à transferência de nenhum embrião bom e que a presença de pelo menos um fator de infertilidade feminina diminui em aproximadamente 4 vezes a chance de ocorrência de gestação.

O delicado balanço entre as espécies reativas de oxigênio e a proteção

antioxidante é importante para a manutenção da homeostasia. Estudos prévios mostraram que as espécies reativas de oxigênio podem estar envolvidas com a modulação de muitas funções da fisiologia feminina, porém a determinação de sua interferência ainda não foi bem estabelecida. Com isso, torna-se necessário mais estudos que visem elucidar o real papel das EROs na fisiopatologia da infertilidade feminina.

## 6. CONCLUSÃO

Nas condições deste estudo, podemos concluir que:

- Pacientes que não atingiram a gestação apresentam maior atividade da GPX do que as pacientes que engravidaram;
- A adição de hMG ao estímulo hormonal não altera os níveis foliculares de glutathione peroxidase, catalase, e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico;
- A presença de pelo menos um fator de infertilidade feminina não altera as concentrações de glutathione peroxidase, catalase, e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico nos líquidos foliculares;
- A mensuração dos níveis foliculares de glutathione peroxidase contribui para a predição do resultado de gravidez em ciclos de fertilização *in vitro*.

## Anexo 1

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### TÍTULO DO PROJETO

NÍVEIS DE ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS E PRODUTOS DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM LÍQUIDO FOLICULAR DE MULHERES SUBMETIDAS À ESTIMULAÇÃO OVARIANA CONTROLADA

#### 1. INFORMAÇÕES INICIAIS

Para que um indivíduo possa participar de uma pesquisa envolvendo novos tratamentos médicos, aparelhos ou novos procedimentos, este deve dar o seu consentimento livre e esclarecido de tal participação. Este consentimento deve se basear no entendimento da natureza e risco do tratamento, aparelho ou procedimento. É responsabilidade do médico coordenador da pesquisa fornecer, ao indivíduo que tomará parte na pesquisa, as informações necessárias para este entendimento.

#### 2. INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Toda paciente que for submetida ao Programa de Fertilização *in vitro*, nesta Universidade ou em qualquer outro ambiente médico, será submetida ao estímulo ovariano controlado (injeções intramusculares) para produzirem mais folículos, e conseqüentemente, mais óvulos. Dentro do controle ovariano, a paciente será submetida a exames de ultrassonografia vaginal como parte da rotina do tratamento. Para a obtenção dos óvulos produzidos, ela deverá ser submetida à punção-aspiração dos folículos ovarianos, no centro cirúrgico.

Os líquidos foliculares de cada folículo, após sua aspiração, serão levados para o laboratório de Fertilização *in vitro*, situado no quinto andar do hospital São Paulo (centro cirúrgico). Neste laboratório, o líquido folicular de cada folículo será cuidadosamente examinado à procura dos óvulos produzidos. Após este exame, o líquido folicular será desprezado. É justamente neste líquido desprezado que será

realizado este projeto, dosando-se as concentrações de espécies reativas de oxigênio existentes neste líquido.

**Vale salientar, que este procedimento (injeções intramusculares de hormônios e punção-aspiração dos folículos ovarianos) acima descrito faz parte do tratamento das pacientes submetidas ao Programa de Fertilização *in vitro*, independente desta pesquisa, pois o líquido a ser avaliado é descartado de todo este processo, nada vai mudar em função deste estudo.**

### 3. OBJETIVO

O objetivo desta pesquisa é avaliar o líquido folicular de pacientes submetidas ao estímulo ovariano controlado em procedimentos de reprodução assistida e através da análise da quantidade de espécies reativa de oxigênio

### 4. RISCOS E DESCONFORTO

O líquido folicular, objeto deste projeto, é proveniente do processo rotineiro de punção-aspiração do líquido folicular do Programa de Fertilização *in vitro* estabelecido nesta Universidade há mais de dez anos.

É importante ressaltar que participando ou não desta pesquisa você será submetida ao uso de injeções musculares, exames de ultrassonografia transvaginal e punção-aspiração de folículos ovarianos, pois fazem parte do procedimento clínico, ou seja, independente da pesquisa.

Portanto, não há nenhum risco ou desconforto para você em decorrência desta pesquisa, uma vez que o líquido folicular aspirado após o exame no laboratório para a procura dos óvulos, será simplesmente desprezado como rotina. Para tanto preciso somente da sua autorização para avaliar o líquido folicular que será descartado, exclusivamente neste estudo.

### 5. BENEFÍCIOS

Não haverá benefícios imediatos para você em participar deste estudo.

## 6. CONFIDENCIALIDADE

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes e a confidencialidade de todos os registros será mantida; entretanto, o Hospital São Paulo e o Ministério da Saúde poderão examinar os seus registros se necessário.

## 7. DANOS RELACIONADOS A ESTA PESQUISA

Como se trata de um procedimento estritamente relacionado ao tratamento de Fertilização *in vitro*, esta pesquisa não oferece nenhum risco para a paciente que concordar em participar deste projeto.

## 8. DÚVIDAS SOBRE A PESQUISA

Se você tiver alguma dúvida sobre esta pesquisa, ou desenvolver qualquer problema relacionado à pesquisa, você deverá entrar em contato com o pesquisador principal.

Prof. Dr. Agnaldo Pereira Cedenho

Disciplina de Urologia – Departamento de Cirurgia

Rua Napoleão de Barros, 715, 3º andar.

Telefone: 5576-4062

Comitê de Ética

Rua Botucatu, 572 – 1º andar Cj. 14

Telefone: 5571-1062 / Fax: 5539-7162

e-mail: [cepunifesp@epm.br](mailto:cepunifesp@epm.br)

## 9. PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

Sua participação neste estudo é voluntária. A sua recusa em participar não prejudicará o seu tratamento futuro ou os benefícios oferecidos pelo Hospital São Paulo. Você é livre para deixar de participar deste estudo a qualquer momento, sem que haja qualquer penalidade ou prejuízo do tratamento médico.

Como o líquido folicular obtido durante a punção-aspiração ovariana é material

de descarte, após a obtenção dos óvulos, não há nada que justifique uma indenização em decorrência desta pesquisa, pois não haverá alteração na rotina do tratamento clínico pré-estabelecido no Programa de Fertilização *in vitro*.

#### 10. DESPESAS E COMPENSAÇÕES

Você não terá despesas pessoais participando desta pesquisa em qualquer fase deste estudo, pois os exames, procedimentos, consultas e hospitalização já fazem parte do seu tratamento, independente deste estudo.

Você não terá compensação financeira por sua participação, pois não há dano pessoal em decorrência deste estudo que avaliará o material que, como rotina, é considerado descarte.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “NÍVEIS DE ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS E PRODUTOS DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM LÍQUIDO FOLICULAR DE MULHERES SUBMETIDAS À ESTIMULAÇÃO OVARIANA CONTROLADA”. Eu discuti com o Dr. Agnaldo Pereira Cedenho sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

---

Assinatura do paciente/representante legal

Data / /

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

---

Assinatura do responsável pelo estudo

Data / /



## ANEXO 2

### Cálculo dos reagentes para reação da atividade da catalase

#### Tampão Tris 1M –HCl - EDTA 5mM, pH 8

- Tris Base (PM=121,1) – 1 M
  - 12,11 g -100 mL
  
- EDTA – (PM=372,24) - 5 mM
  - 0,18612 g – 100 mL

Para 100 mL: Pesar 12,11 g de Tris e 0,18612 g de EDTA. Transferir para um béquer. Acrescentar aproximadamente 80 mL de Água e ajustar o pH com HCl. Transferir para um balão e completar o volume. O pH da solução tris/EDTA fica sempre em torno de 10,5, necessitando de aproximadamente 3 mL de HCl para chegar ao pH esperado.

### Anexo 3

#### Cálculo das concentrações dos reagentes da reação da glutaciona peroxidase

- Azida sódica 0,25M (PM 65,01, armazenado em dessecador): para 50 amostras, 0,0162g em 1 mL de tampão.
- NADPH 0,2mM (armazenado no freezer): para 20 amostras, 0,004g em 20mL de tampão.
- GSH (Glutaciona Reduzida, armazenada na geladeira) 20mM: para 50 amostras, 0,0305g em 5mL de água Milli Q.
- GRD ( Glutaciona redutase, armazenada na geladeira) para 20 amostras:, 16,664 $\mu$ L em 383,332 $\mu$ L de tampão.
- t-Butil Hidroperóxido (tBPH) (armazenado na geladeira): para 90 amostras, 20 $\mu$ L em 8670 $\mu$ L de água Milliq.
- Tampão Fosfato de sódio 143mM, EDTA 6,3 mM, pH 7,5

1- Solução 1: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (143 mM)

Fazer 500mL (10,15014 g q.s.p. 500 mL de H<sub>2</sub>O Milliq)

2- Solução 2: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (143 mM)

Fazer 100 mL (1,973257 g q.s.p. 100 mL de H<sub>2</sub>O Milliq)

Misturar 400 mL da solução 1 e 100 mL da solução 2 e adicionar 1,172556 g de EDTA dissódico (6,3 mM). Acertar o pH com NaOH ou HCl para 7,5.

## 8. REFERÊNCIAS

1. Duckitt K. Infertility and subfertility. *Clin Evid* 2003 Jun;(9):2044-73.
2. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 2003 Apr;79(4):829-43.
3. Franks S. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 1995 Sep 28;333(13):853-61.
4. Franks S, Mason H, Willis D. Follicular dynamics in the polycystic ovary syndrome. *Mol Cell Endocrinol* 2000 May 25;163(1-2):49-52.
5. Chang RJ. A practical approach to the diagnosis of polycystic ovary syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 2004 Sep;191(3):713-7.
6. Zacur HA. Polycystic ovary syndrome, hyperandrogenism, and insulin resistance. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2001 Mar;28(1):21-33.
7. Lareau SM, Beigi RH. Pelvic inflammatory disease and tubo-ovarian abscess. *Infect Dis Clin North Am* 2008 Dec;22(4):693-708, vii.
8. Olive DL, Schwartz LB. Endometriosis. *N Engl J Med* 1993 Jun 17;328(24):1759-69.
9. Van LA, Casanas-Roux F, Donnez J. Oxidative stress and peritoneal endometriosis. *Fertil Steril* 2002 May;77(5):861-70.
10. Garrido N, Pellicer A, Remohi J, Simon C. Uterine and ovarian function in endometriosis. *Semin Reprod Med* 2003 May;21(2):183-92.

11. Pellicer A, Albert C, Garrido N, Navarro J, Remohi J, Simon C. The pathophysiology of endometriosis-associated infertility: follicular environment and embryo quality. *J Reprod Fertil Suppl* 2000;55:109-19.
12. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 2005;3:28.
13. Halliwell B. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic Res Commun* 1990;9(1):1-32.
14. Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* 2002 Nov;30(6):620-50.
15. de LE, Gagnon C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum Reprod* 1995 Oct;10 Suppl 1:15-21.
16. Behrman HR, Kodaman PH, Preston SL, Gao S. Oxidative stress and the ovary. *J Soc Gynecol Investig* 2001 Jan;8(1 Suppl Proceedings):S40-S42.
17. Ishikawa M. [Oxygen radicals-superoxide dismutase system and reproduction medicine]. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 1993 Aug;45(8):842-8.
18. Sabatini L, Wilson C, Lower A, Al-Shawaf T, Grudzinskas JG. Superoxide dismutase activity in human follicular fluid after controlled ovarian hyperstimulation in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1999 Dec;72(6):1027-34.
19. Guerin P, El MS, Menezo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update* 2001 Mar;7(2):175-89.

20. Halliwell B. Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Pathol* 1989 Dec;70(6):737-57.
21. 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 Aug;10(8):1375-403.
22. Li Y, Jaiswal AK. Regulation of human NAD(P)H:quinone oxidoreductase gene. Role of AP1 binding site contained within human antioxidant response element. *J Biol Chem* 1993 Oct 5;268(28):21454.
23. Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl* 1987 Sep;8(5):338-48.
24. Agarwal A, Gupta S, Sikka S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2006 Jun;18(3):325-32.
25. Bedaiwy MA, Falcone T, Sharma RK, Goldberg JM, Attaran M, Nelson DR, et al. Prediction of endometriosis with serum and peritoneal fluid markers: a prospective controlled trial. *Hum Reprod* 2002 Feb;17(2):426-31.
26. Blondin P, Coenen K, Sirard MA. The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. *J Androl* 1997 Jul;18(4):454-60.
27. Fortune JE. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod* 1994 Feb;50(2):225-32.
28. Angelucci S, Ciavardelli D, Di GF, Eleuterio E, Sulpizio M, Tiboni GM, et al. Proteome analysis of human follicular fluid. *Biochim Biophys Acta* 2006 Nov;1764(11):1775-85.

29. Ray SD, Lam TS, Rotollo JA, Phadke S, Patel C, Dontabhaktuni A, et al. Oxidative stress is the master operator of drug and chemically-induced programmed and unprogrammed cell death: Implications of natural antioxidants in vivo. *Biofactors* 2004;21(1-4):223-32.
30. Marnett LJ. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res* 1999 Mar 8;424(1-2):83-95.
31. Jozwik M, Wolczynski S, Jozwik M, Szamatowicz M. Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans. *Mol Hum Reprod* 1999 May;5(5):409-13.
32. Vega M, Johnson MC, Diaz HA, Urrutia LR, Troncoso JL, Devoto L. Regulation of human luteal steroidogenesis in vitro by nitric oxide. *Endocrine* 1998 Apr;8(2):185-91.
33. Suzuki T, Sugino N, Fukaya T, Sugiyama S, Uda T, Takaya R, et al. Superoxide dismutase in normal cycling human ovaries: immunohistochemical localization and characterization. *Fertil Steril* 1999 Oct;72(4):720-6.
34. Sugino N, Takiguchi S, Kashida S, Karube A, Nakamura Y, Kato H. Superoxide dismutase expression in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy. *Mol Hum Reprod* 2000 Jan;6(1):19-25.
35. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979 Jun;95(2):351-8.
36. Beutler E, Beutler B, Matsumoto J. Glutathione peroxidase activity of inorganic selenium and seleno-DL-cysteine. *Experientia* 1975 Jul 15;31(7):769-70.
37. de BP, Jr., Miyasaka CK, Curi R, Williams JF. Effects of the antiproliferative cyclopentenone prostaglandin A1 on glutathione metabolism in human cancer cells in culture. *Biochem Mol Biol Int* 1998 Sep;45(6):1255-64.

38. Braude P, Rowell P. Assisted conception. II--in vitro fertilisation and intracytoplasmic sperm injection. *BMJ* 2003 Oct 11;327(7419):852-5.
39. Isaksson R, Tiitinen A. Present concept of unexplained infertility. *Gynecol Endocrinol* 2004 May;18(5):278-90.
40. 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.
41. Aitken RJ. The Amoroso Lecture. The human spermatozoon--a cell in crisis? *J Reprod Fertil* 1999 Jan;115(1):1-7.
42. de LE, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod* 1997 Jan;2(1):48-54.
43. Griveau JF, Le LD. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Int J Androl* 1997 Apr;20(2):61-9.
44. Iwata H, Akamatsu S, Minami N, Yamada M. Effects of antioxidants on the development of bovine IVM/IVF embryos in various concentrations of glucose. *Theriogenology* 1998 Aug;50(3):365-75.
45. Riley JC, Behrman HR. Oxygen radicals and reactive oxygen species in reproduction. *Proc Soc Exp Biol Med* 1991 Dec;198(3):781-91.
46. Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA, Gagnon C. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol Reprod Dev* 2000 Mar;55(3):282-8.
47. Mammoto A, Masumoto N, Tahara M, Ikebuchi Y, Ohmichi M, Tasaka K, et al. Reactive oxygen species block sperm-egg fusion via oxidation of sperm sulfhydryl proteins in mice. *Biol Reprod* 1996 Nov;55(5):1063-8.

48. Totic J. Mechanism of hydrogen peroxide formation by spermatozoa and the role of amino-acids in sperm motility. *Nature* , -544. 1947.  
Ref Type: Generic
49. Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod* 1989 Jul;41(1):183-97.
50. 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 Sep;45(5):314-20.
51. Jauniaux E, Watson AL, Hempstock J, Bao YP, Skepper JN, Burton GJ. Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure. *Am J Pathol* 2000 Dec;157(6):2111-22.
52. Jauniaux E, Poston L, Burton GJ. Placental-related diseases of pregnancy: Involvement of oxidative stress and implications in human evolution. *Hum Reprod Update* 2006 Nov;12(6):747-55.
53. Basini G, Simona B, Santini SE, Grasselli F. Reactive oxygen species and anti-oxidant defences in swine follicular fluids. *Reprod Fertil Dev* 2008;20(2):269-74.
54. Zeron Y, Ocheretny A, Kedar O, Borochoy A, Sklan D, Arav A. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Reproduction* 2001 Mar;121(3):447-54.
55. Lenzi A, Gandini L, Lombardo F, Picardo M, Maresca V, Panfili E, et al. Polyunsaturated fatty acids of germ cell membranes, glutathione and glutathione-dependent enzyme-PHGPx: from basic to clinic. *Contraception* 2002 Apr;65(4):301-4.



56. Carbone MC, Tatone C, Delle MS, Marci R, Caserta D, Colonna R, et al. Antioxidant enzymatic defences in human follicular fluid: characterization and age-dependent changes. *Mol Hum Reprod* 2003 Nov;9(11):639-43.
57. Lapointe J, Bilodeau JF. Antioxidant defenses are modulated in the cow oviduct during the estrous cycle. *Biol Reprod* 2003 Apr;68(4):1157-64.
58. Ferrandi B, Lange CA, Carnevali A, Porcelli F. Spontaneous lipid peroxidation and sperm metabolism during incubation in media simulating the oviductal microenvironment. *Cell Mol Biol (Noisy -le-grand)* 1995 Mar;41(2):327-33.
59. Tremellen K. Oxidative stress and male infertility--a clinical perspective. *Hum Reprod Update* 2008 May;14(3):243-58.
60. Oyawoye O, Abdel GA, Garner A, Constantinovici N, Perrett C, Hardiman P. Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF: relationship to outcome. *Hum Reprod* 2003 Nov;18(11):2270-4.
61. Paszkowski T, Traub AI, Robinson SY, McMaster D. Selenium dependent glutathione peroxidase activity in human follicular fluid. *Clin Chim Acta* 1995 May 15;236(2):173-80.
62. Pasqualotto EB, Agarwal A, Sharma RK, Izzo VM, Pinotti JA, Joshi NJ, et al. Effect of oxidative stress in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive procedures. *Fertil Steril* 2004 Apr;81(4):973-6.
63. Nasr-Esfahani MH, Winston NJ, Johnson MH. Effects of glucose, glutamine, ethylenediaminetetraacetic acid and oxygen tension on the concentration of reactive oxygen species and on development of the mouse preimplantation embryo in vitro. *J Reprod Fertil* 1992 Sep;96(1):219-31.
64. Noda Y, Matsumoto H, Umaoka Y, Tatsumi K, Kishi J, Mori T. Involvement of superoxide radicals in the mouse two-cell block. *Mol Reprod Dev* 1991 Apr;28(4):356-60.

65. Pellicer A, Ballester MJ, Serrano MD, Mir A, Serra-Serra V, Remohi J, et al. Aetiological factors involved in the low response to gonadotrophins in infertile women with normal basal serum follicle stimulating hormone levels. *Hum Reprod* 1994 May;9(5):806-11.
66. Hayden C. GnRH analogues: applications in assisted reproductive techniques. *Eur J Endocrinol* 2008 Dec;159 Suppl 1:S17-S25.
67. Hillier SG. Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development. *Mol Cell Endocrinol* 2001 Jun 20;179(1-2):39-46.
68. Palermo R. Differential actions of FSH and LH during folliculogenesis. *Reprod Biomed Online* 2007 Sep;15(3):326-37.
69. Levy DP, Navarro JM, Schattman GL, Davis OK, Rosenwaks Z. The role of LH in ovarian stimulation: exogenous LH: let's design the future. *Hum Reprod* 2000 Nov;15(11):2258-65.
70. Couse JF, Lindzey J, Grandien K, Gustafsson JA, Korach KS. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. *Endocrinology* 1997 Nov;138(11):4613-21.
71. Matthews J, Wihlen B, Tujague M, Wan J, Strom A, Gustafsson JA. Estrogen receptor (ER) beta modulates ERalpha-mediated transcriptional activation by altering the recruitment of c-Fos and c-Jun to estrogen-responsive promoters. *Mol Endocrinol* 2006 Mar;20(3):534-43.
72. Groome NP, Illingworth PJ, O'Brien M, Pai R, Rodger FE, Mather JP, et al. Measurement of dimeric inhibin B throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1996 Apr;81(4):1401-5.

73. Muttukrishna S, Suharjono H, McGarrigle H, Sathanandan M. Inhibin B and anti-Mullerian hormone: markers of ovarian response in IVF/ICSI patients? *BJOG* 2004 Nov;111(11):1248-53.
74. Seifer DB, MacLaughlin DT, Christian BP, Feng B, Shelden RM. Early follicular serum mullerian-inhibiting substance levels are associated with ovarian response during assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril* 2002 Mar;77(3):468-71.
75. Duleba AJ, Foyouzi N, Karaca M, Pehlivan T, Kwintkiewicz J, Behrman HR. Proliferation of ovarian theca-interstitial cells is modulated by antioxidants and oxidative stress. *Hum Reprod* 2004 Jul;19(7):1519-24.
76. 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 Apr;89(4):912-21.
77. 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 Jun;83(6):2110-3.
78. Arumugam K, Dip YC. Endometriosis and infertility: the role of exogenous lipid peroxides in the peritoneal fluid. *Fertil Steril* 1995 Jan;63(1):198-9.
79. Szczepanska M, Kozlik J, Skrzypczak J, Mikołajczyk M. Oxidative stress may be a piece in the endometriosis puzzle. *Fertil Steril* 2003 Jun;79(6):1288-93.
80. Erdogan M, Karadeniz M, Berdeli A, Alper G, Caglayan O, Yilmaz C. The relationship of the interleukin-6 -174 G>C gene polymorphism with oxidative stress markers in Turkish polycystic ovary syndrome patients. *J Endocrinol Invest* 2008 Jul;31(7):624-9.

81. Gonzalez F, Rote NS, Minium J, Kirwan JP. Reactive oxygen species-induced oxidative stress in the development of insulin resistance and hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2006 Jan;91(1):336-40.
82. Strandell A, Lindhard A, Waldenstrom U, Thorburn J. Hydrosalpinx and IVF outcome: cumulative results after salpingectomy in a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2001 Nov;16(11):2403-10.
83. Houghton FD, Thompson JG, Kennedy CJ, Leese HJ. Oxygen consumption and energy metabolism of the early mouse embryo. *Mol Reprod Dev* 1996 Aug;44(4):476-85.
84. Magnusson C, Hillensjo T, Hamberger L, Nilsson L. Oxygen consumption by human oocytes and blastocysts grown in vitro. *Hum Reprod* 1986 Apr;1(3):183-4.
85. Thompson JG, Partridge RJ, Houghton FD, Cox CI, Leese HJ. Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos. *J Reprod Fertil* 1996 Mar;106(2):299-306.

## Abstract

**Objective:** to verify the relation between thiobarbituric acid reactive substances concentrations, glutathione peroxidase and catalase activities, and occurrence of pregnancy, hormonal stimulation protocol utilized, and presence or not of a female infertility factor. **Method:** a prospective case-control study was carried with follicular fluid from 146 patients submitted to the Assisted Reproduction program at the Sao Paulo Federal University. Only patients submitted to *in vitro* fertilization (FIV) through intracytoplasmic sperm injection (ICSI) were included. The experimental groups were subdivided according to presence or absence of pregnancy, hormonal stimulation protocol used (FSH or FSH and hMG) and presence or absence of at least one female infertility factor. An aliquot of follicular fluid was collected after retrieval of the oocyte for analysis of thiobarbituric acid reactive substances concentrations, and glutathione peroxidase and catalase activities. All these analyses were carried out using a spectrophotometer. Groups were compared using Student's T-test. A logistic regression model were calculated using embryo quality on day 3, presence or not of a female infertility factor, thiobarbituric acid reactive substances levels, and glutathione peroxidase (GPX) and catalase activities as independent variables, occurrence of pregnancy as a binary dependent variable. **Results:** Patients who did not achieve pregnancy presented higher glutathione peroxidase activity levels, when compared with patients who achieved pregnancy ( $p=0,04$ ). In the other groups, no differences were observed. Logistic regression produced a model which best predicted pregnancy including presence of female infertility factor, embryo quality on day 3 and GPX activity (73.7% total predictive value,  $p=0.00001$ ). Odds-ratio for GPX activity was 0.98, indicating that increasing values of GPX activity decreased the odds of occurrence of pregnancy. **Conclusion:** Based on our results, we may conclude that (i) higher GPX activity is associated to negative outcomes in ICSI cycles, (ii) different ovarian stimulation protocols does not alter concentrations of TBARS and activity of antioxidant enzymes, and (iii) the presence of at least one female infertility factor does not alter TBARS levels or antioxidant activity.

**Key words:** Oxidative Stress, Follicular Fluid, Antioxidants, Free Radical, *in vitro* fertilization.

## **Bibliografia Consultada**

Rother ET e Braga MER. Como elaborar sua tese: estrutura e referências. 2ª ed. São Paulo: Revista e ampliada; 2005.

Ferreira ABH, et al. Novo Aurélio – Dicionário da Língua Portuguesa séc. XXI. Rio de Janeiro: Nova Fronteira; 2000.