

INFLUENCE OF OVARIAN STIMULATION FOR IVF/ ICSI ON THE ANTIOXIDANT DEFENCE SYSTEM AND RELATIONSHIP TO OUTCOME

Simone Palini ^a, Serena Benedetti ^b, Maria Chiara Tagliamonte ^b, Silvia De Stefani ^a, Mariangela Primiterra ^a, Valeria Polli ^a, Patrizia Rocchi,^a , Simona Catalani ^b, Serafina Battistelli ^b, Franco Canestrari ^b, Carlo Bulletti ^a.

^a Physiopathology of Reproduction Unit, 'Cervesi' Hospital, Cattolica, Rimini, Italy;

^b Department of Biomolecular Sciences, Section of Clinical Biochemistry and Cellular Biology, University of Urbino 'Carlo Bo', Italy

Reproductive BioMedicine Online (2014) 29, 65– 71

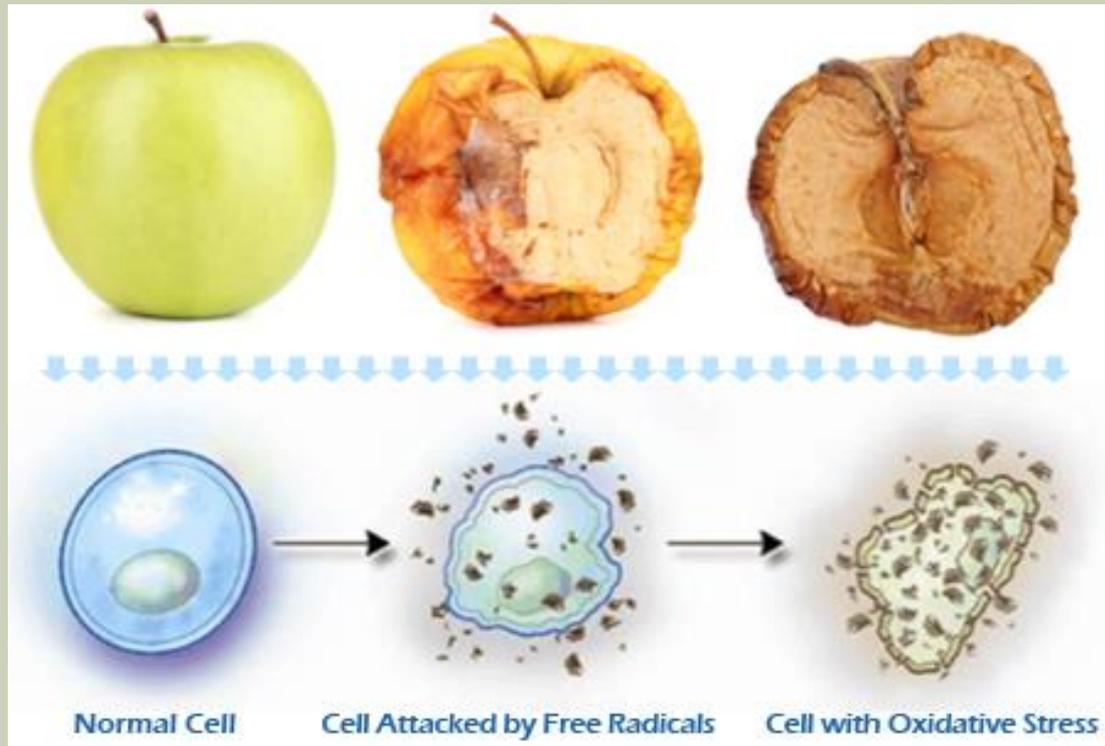
Dra Gabriela Halpern
nutricionista

INTRODUÇÃO – ESTRESSE OXIDATIVO

A produção excessiva de radicais livres ou a redução das defesas antioxidantes caracteriza o chamado Estresse Oxidativo



INTRODUÇÃO – ESTRESSE OXIDATIVO



INTRODUÇÃO

- Evidências EROs ↓ qualidade e função SPTZ (modifica membrana lipídica e DNA);
- ♀: papel importante na maturação oócito, formação corpo lúteo e luteólise.
 - potencial oócito é negativamente influenciado pelo estresse oxidativo dentro do folículo?
 - Desequilíbrio entre EROs e defesa antioxidante no FF pode ser responsável por desenvolvimento anormal oócito?
 - Pode levar a danos do DNA, citoesqueleto e membrana celular, que resultaria numa pior qualidade?

OBJETIVOS

- Monitorar, em três momentos, o estado de antioxidantes no plasma de mulheres submetidas a um protocolo longo de estimulação ovariana;
- Avaliar a composição de antioxidantes no fluido folicular do dia da punção.

MATERIAL E MÉTODO

- 25 mulheres (33 ± 4 anos) FIV/ ICSI
- Unidade de Fisiopatologia da Reprodução (Cervesi Hospital, Cattolica, RN, Itália)
- Etiologia da Infertilidade
 - Fator masculino (n=7)
 - Fator feminino (fator tubário n=7; endometriose n=2)
 - ISCA (n=7)
- Sem suplementação com multivitamínicos, sem histórico de doenças cardiovasculares, metabólicas ou hipertensivas.

MATERIAL E MÉTODO – PROTOCOLO DE ESTIMULAÇÃO OVARIANA

■ Protocolo longo:

- 3,75mg de acetato de leuprolida (intramuscular) com início na fase lutea do ciclo anterior;
- Após bloqueio hipofisário, início do FSH recombinante (225-450UI/dia – de acordo com idade, reserva ovariana e ciclos prévios);
- Após aumento concentração estradiol e presença de dois ou mais folículos entre 16-18mm de diâmetro, administrou-se 10000UI/ ml de HCG (injeção subcutânea, 36h antes da punção dos oócitos).
- FIV ou ICSI dependendo do caso;
- Transferência do embrião entre os dias 2 e 5 após a punção;
- Gravidez identificada pela dosagem do HCG sérico e confirmada por US, com visualização de saco gestacional com batimento cardíaco.

COLETA DE AMOSTRA

- Amostras de sangue em jejum:
 - T0 - (basal) antes da injeção do agonista
 - T1 - depois da supressão hipofisária e imediatamente antes da administração FSH;
 - T2 - antes da anestesia para captação do oócito.
- T2 - foram coletadas, em média, 3 amostras de fluido folicular
- Dos 73 fluidos aspirados:
 - 54 oócitos maduros - metafase II
 - 7 oócitos imaturos - metafase I
 - 12 folículos sem oócitos
- Sangue e FF processados por centrifugação (1500g for 10' a 4°C) e o plasma e aliquota do FF foram armazenados a -80°C até a análise.

ANÁLISE BIOQUÍMICA

- Foram dosados no plasma e FF :
 - vitamina C (ácido ascórbico),
 - vitamina E (α -tocoferol),
 - vitamina A (retinol) e
 - carotenoides (luteína, licopeno e β caroteno).
- Vitamina C: avaliada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) a 265nm.
 - Amostras diluídas em metanol frio, vortex e centrifugadas a 10000g (10' a 4°C).
 - Os sobrenadantes foram injectados numa coluna Alltima C18 e eluído a 0,5 ml / min com uma fase móvel constituída por 5% de metanol em 25 mmol/L NaH_2PO_4 (fosfato monossódico) (pH 4.8)

ANÁLISE BIOQUÍMICA

- Vitaminas A, E e carotenóides:
- medidos por HPLC após desproteíntização com etanol e extração com hexano. Depois da centrifugação com 10000g (10' a 4°C), a camada orgânica foi removida e evaporada; o resíduo foi dissolvido na fase eluente e injetado no sistema HPLC.
 - A fase eluente foi acetonitrilo / tetra-hidrofurano / metanol (68:22:7, v/v) ajustado a 100 v/ v com 1% de acetato de amônio; o fluxo foi 1.5ml/min.
 - Detectores de UV e de fluorescência foram programados de acordo com a absorção, excitação e emissão de comprimentos de onda de cada molécula.
 - A concentração de proteína no FF foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

- Média \pm dp
- \neq antioxidantes nos plasma (T0xT1xT2)- ANOVA e teste-t (corrigido pelo critério de Bonferroni)
- \neq antioxidante folicular entre causa de infertilidade – ANOVA com Turkey (pós teste para múltiplas comparações)
- \neq gestante x não gestante – teste t não pareado
- Foi considerado $P < 0.05$
- Distribuição normal pelo teste Kolmogorov-Smirnov
- Correlação por análise de regressão linear
- WinSTAT

RESULTADOS

- 2 pacientes tiveram síndrome da hiperestimulação ovariana;

Table 1 Characteristics and IVF/ICSI outcomes of women who became pregnant and those who did not.

Parameter	Total (n = 23)	Pregnant (n = 8)	Not pregnant (n = 15)	P-value
Infertility factor				
Male	30.4	50.0	20.0	—
Female	39.2	12.5	53.0	
Unknown	30.4	37.5	27.0	
Age (years)	33.3 ± 3.9	33.4 ± 3.4	33.3 ± 4.1	NS
Total oocytes retrieved per patient	10.3 ± 4.5	14.0 ± 2.7	8.3 ± 3.9	0.002
Mature oocytes retrieved per patient	8.8 ± 3.8	11.9 ± 2.0	7.2 ± 3.3	0.002
Oocytes fertilized per patient	6.6 ± 3.00	7.6 ± 3.0	6.0 ± 2.7	NS
Embryos transferred per patient	2.2 ± 0.6	2.1 ± 0.6	2.2 ± 0.5	NS

Values are % or mean ± SD. P-values comparing pregnant versus nonpregnant women calculated using t-test for unpaired data.



ANTIOXIDANTES PLASMA - T0, T1 E T2

Table 2 Plasma antioxidant profile at baseline, after pituitary suppression and on day of oocyte retrieval.

<i>Antioxidant (μmol/l)</i>	<i>T0 (n = 23)</i>	<i>T1 (n = 23)</i>	<i>T2 (n = 23)</i>	<i>P-value</i>
Ascorbic acid	43.49 ± 4.57	41.94 ± 5.84	36.03 ± 5.98 ^a	0.043
α-Tocopherol	17.58 ± 1.22	18.17 ± 0.63	15.42 ± 0.5 ^a	0.0003
Retinol	1.41 ± 0.1	1.38 ± 0.05	1.36 ± 0.04	NS
Lutein	0.29 ± 0.05	0.27 ± 0.02	0.24 ± 0.02	NS
Lycopene	0.69 ± 0.07	0.54 ± 0.03	0.46 ± 0.04 ^a	0.018
β-Carotene	0.57 ± 0.08	0.48 ± 0.04	0.44 ± 0.04 ^a	0.0004

P-values calculated using ANOVA for repeated measures.

NS = not statistically significant; T0 = baseline; T1 = after pituitary suppression; T2 = day of oocyte retrieval.

^aP-value < 0.05 versus T1; t-test for paired data used for post-ANOVA multiple comparisons, corrected according to Bonferroni's criterion.

ANTIOXIDANTES FLUIDO FOLICULAR

- Concentração de antioxidantes no FF (oócitos metafase II) de acordo com etiologia da infertilidade

Antioxidant (nmol/g protein)	Total (n = 54)	Male (n = 17)	Female (n = 22)	Unexplained (n = 15)	P-value
Ascorbic acid	1313 ± 349	1727 ± 297	1406 ± 279 ^a	1078 ± 115 ^a	0.0001
α-Tocopherol	99.1 ± 24.9	116.8 ± 15.0	92.3 ± 26.8 ^a	88.1 ± 21.0 ^a	0.0007
Retinol	30.3 ± 8.1	32.9 ± 5.2	28.4 ± 9.7	29.9 ± 8.2	NS
Lutein	2.72 ± 0.93	2.72 ± 0.60	2.73 ± 0.93	2.68 ± 1.21	NS
Lycopene	2.04 ± 0.82	2.15 ± 0.70	1.98 ± 0.93	1.99 ± 0.80	NS
β-Carotene	1.16 ± 0.69	1.55 ± 0.86	1.06 ± 0.66 ^a	0.88 ± 0.26 ^a	0.017

P-values calculated using one-way ANOVA.

NS = not statistically significant.

^aP < 0.05 versus male infertility (Tukey test used for post-ANOVA multiple comparisons).

RESULTADOS

- Correlação positiva entre concentração de antioxidantes no plasma e FF (T2)

<i>Antioxidant</i>	R	P-value
Ascorbic acid	0.883	<0.0001
α -Tocopherol	0.319	0.019
Retinol	0.588	<0.0001
Lutein	0.823	<0.0001
Lycopene	0.329	0.019
β -Carotene	0.826	<0.0001

- Distribuição de antioxidantes no plasma e FF (punção)

<i>Antioxidant</i>	<i>Plasma</i> (n = 23)	<i>Follicular fluid</i> (n = 54)	P-value
Ascorbic acid	62.0 \pm 14.5 \rightarrow	91.6 \pm 2.7	<0.001
α -Tocopherol	32.6 \pm 13.0	6.3 \pm 2.2	<0.001
Retinol	2.87 \pm 1.09	1.78 \pm 0.57	<0.001
Lutein	0.60 \pm 0.26	0.22 \pm 0.06	<0.001
Lycopene	1.17 \pm 0.45	0.13 \pm 0.06	<0.001
β -Carotene	0.83 \pm 0.40 \downarrow	0.07 \pm 0.05	<0.001

P-values calculated using t-test for unpaired data.

RESULTADOS

- Antioxidantes (plasma e FF) dia da punção em mulheres que engravidaram x não engravidaram.

<i>Antioxidant</i>	<i>Plasma ($\mu\text{mol/l}$)</i>		<i>Follicular fluid (nmol/g protein)</i>	
	<i>Pregnant (n = 8)</i>	<i>Not pregnant (n = 15)</i>	<i>Pregnant (n = 8)</i>	<i>Not pregnant (n = 15)</i>
<i>Ascorbic acid</i>	45.23 \pm 6.71	38.41 \pm 5.64	1307 \pm 382	1112 \pm 188
<i>α-Tocopherol</i>	20.05 \pm 2.76	16.98 \pm 2.96 ^a	109.68 \pm 21.41	92.98 \pm 22.30 ^a
<i>Retinol</i>	1.37 \pm 0.16	1.43 \pm 0.22	27.06 \pm 5.02	32.56 \pm 7.73 ^a
<i>Lutein</i>	0.28 \pm 0.13	0.24 \pm 0.10	2.52 \pm 0.73	2.79 \pm 1.01
<i>Lycopene</i>	0.50 \pm 0.15	0.56 \pm 0.17	1.85 \pm 0.72	2.04 \pm 0.76
<i>β-Carotene</i>	0.66 \pm 0.18	0.39 \pm 0.13 ^a	1.47 \pm 0.96	1.00 \pm 0.52 ^a

^a $P < 0.05$ versus pregnant (t-test for unpaired data).

DISCUSSÃO

- Estimulação ovariana ↑ EROs;
- Redução nos níveis de ácido ascórbico, α -tocoferol, licopeno e β -caroteno em T2
 - \neq fase lútea x folicular
 - Uso de gonadotrofinas
- < capacidade antioxidante ♀ inférteis
- Oxidação sistêmica pode influenciar oxidação folicular (correlação + capacidade antioxidante plasma x FF)
- ↓ antioxidantes lipossolúveis (FF x plasma) e ↑ vit C FF
 - HDL presente FF (VLDL e LDL não...)
 - Importância vit C nos folículos (deficiência: atrofia ovário e atresia folicular)

DISCUSSÃO

- > vit E - > número de oócitos (e maduros) - engravidaram
- α -tocoferol e β -caroteno - > ♀ engravidaram
- Capacidade folicular antioxidante – correlação positiva com taxa de gestação
- Suplementação multivitamínicos e minerais modula estresse oxidativo e concentração de antioxidantes (plasma e FF) pode melhorar taxa de gravidez.

CONCLUSÕES

- Há redução concentração plasmática de antioxidantes após administração de gonadotrofina;
- Maior concentração de vitamina E associada com maior número total e maior número de oócitos maduros captados
 - Mulheres que engravidaram apresentaram maior concentração de vit E;
- Foi encontrada correlação entre concentração de antioxidante no plasma e fluido folicular
 - Mulheres que engravidaram apresentaram maior concentração de vit E no FF

IMPACTO DA ORIENTAÇÃO NUTRICIONAL EM RESULTADOS DE CICLOS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA

Tabela 1. Características gerais referentes aos ciclos de ICSI nos grupos Consulta e Controle de uma Clínica de RHA, São Paulo, 2012.

Variável	Grupo consulta (GC) (n= 32)	Grupo controle (GCT) (n=28)	Valor de P
Idade feminina (anos)	33.2 ± 0.8	33.9 ± 1.2	0.6237
Idade masculina (anos)	38.5 ± 3.2	36.0 ± 1.1	0.4338
Dose de FSH administrada (UI)	1817 ± 118	2088 ± 160	0.1778
Nº de oócitos recuperados	12.7 ± 1.8	10.5 ± 1.4	0.3443
Taxa de oócitos em MII (%)	81.1	80.6	0.7841
Taxa de fertilização normal (%)	81.0	67.1	0.0225
Taxa de gestação (%)	46.9	28.6	0.0396



Tabela 2. Chances de gravidez em relação à orientação nutricional*

Orientação nutricional	OR	P
Pacientes que passaram em consulta	2,27	0,0408
Intervalo < 60 dias da transferência dos embriões	4,8	0,0360

P<0,05

*a partir de informações de pacientes de uma Clínica de RHA, São Paulo, 2012.



Tabela 3. Perfil alimentar de pacientes atendidos em uma Clínica de RHA, São Paulo, 2012.

Alimento	Avaliação inicial n (%)			Avaliação final n (%)		
	≤ 4X/SEM	4-6X/SEM	≥ 7X/SEM	Mantiveram ingestão	Aumentaram consumo	Reduziram consumo
Pão integral	18 (58)	6 (19)	7 (23)	10 (38,5)	16 (61,5)	-
Cereais integrais	24 (77,4)	6 (19,4)	1 (3,2)	10 (37)	17 (63)	-
Frutas	2 (6,5)	15 (48,4)	14 (45,2)	8 (29,6)	19 (70,4)	-
Verduras/ legumes	2 (6,5)	18 (58,1)	11 (35,5)	16 (59,3)	11 (40,7)	-
Carnes	1 (3,2)	11 (35,5)	19 (61,3)	17 (63)	4 (14,8)	6 (22,2)
Leite/ derivados	1 (3,2)	7 (22,6)	23 (74,2)	21 (77,8)	4 (3,7)	2 (7,4)
Grãos	2 (6,4)	16 (51,6)	13 (41,9)	14 (51,8)	13 (48,1)	-
Oleaginosas	22 (71)	7(22,6)	2 (6,4)	9 (34,6)	17 (65,4)	-
Frios	5 (16,1)	23 (74,2)	3 (9,7)	9 (36)	5 (20)	11 (44)

Tabela 4. Aumento no consumo de alimentos em relação à chance de gravidez

Alimentos	OR	P
Pão integral	2,69	0,0297
Frutas	1,90	0,0478
Verduras e legumes	2,29	0,0345

P<0,05

*a partir de informações de pacientes de uma Clínica de RHA, São Paulo, 2012.



