



Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal



**Aline de Queiroz Rodrigues**

**IMPACTO DO ESTRESSE OXIDATIVO NOS PARÂMETROS REPRODUTIVOS  
FEMININOS: UMA ANÁLISE DE BIOMARCADORES SISTÊMICOS E  
FOLICULARES PARA O DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIAS  
TERAPÊUTICAS**

**Tese de Doutorado**

**Brasília-DF**

**2025**

**Aline de Queiroz Rodrigues**

**IMPACTO DO ESTRESSE OXIDATIVO NOS PARÂMETROS REPRODUTIVOS  
FEMININOS: UMA ANÁLISE DE BIOMARCADORES SISTÊMICOS E  
FOLICULARES PARA O DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIAS  
TERAPÊUTICAS**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Paulini**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor(a) em Biologia Animal.

**Brasília-DF**

**2025**

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à minha querida família, cuja presença constante de amor e apoio foi imprescindível ao longo de toda a minha jornada acadêmica. Aos meus pais, expresso minha mais profunda gratidão pelos valores, ensinamentos e alicerces que moldaram minha formação pessoal e profissional. Estendo esta dedicação, com o mesmo carinho, a todos os membros da família LEFRAH, cuja força e suporte foram igualmente fundamentais para a realização deste projeto.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus, pelo dom da vida, pela concretização dos meus sonhos e por me conceder a saúde, a força e a sabedoria necessárias para conduzir e concluir este projeto de pesquisa. Sua orientação foi a luz que me guiou em cada passo desta jornada, fortalecendo-me nos momentos de dificuldade e inspirando-me a perseverar.

Ao meu filho, Raphael, dedico meu reconhecimento e todo o meu amor, pois ele é minha maior fonte de motivação. Sua pureza, sua força e a alegria que ilumina os meus dias me inspiram continuamente a buscar novas conquistas, superar desafios e acreditar no futuro com esperança.

Aos meus pais, expresso minha mais sincera e eterna gratidão pelo apoio irrestrito ao longo de toda a minha trajetória. O amor incondicional, a dedicação incansável e o esforço que investiram em minha formação foram os pilares que sustentaram cada etapa deste trabalho. Seus ensinamentos e valores, aliados ao sacrifício de tantos momentos, foram transformados em conquistas e vitórias que só foram possíveis graças à força e ao exemplo que sempre me proporcionaram. Este trabalho é tão meu quanto de vocês.

À minha orientadora, Prof. Fernanda Paulini, manifesto meu mais sincero e profundo agradecimento por toda a confiança, incentivo e dedicação ao meu projeto de pesquisa. Sua expertise, aliada à paciência e ao compromisso com minha formação, foi fundamental para superar os desafios e dúvidas ao longo do caminho. A orientação precisa e a visão crítica, sempre acompanhadas de encorajamento e apoio, contribuíram não apenas para a concretização deste trabalho, mas também para meu amadurecimento acadêmico e pessoal. Sou profundamente grata por seu tempo, sua generosidade em compartilhar conhecimentos e por acreditar em mim, mesmo nos momentos mais desafiadores. Este trabalho é, em grande parte, reflexo do impacto positivo de sua mentoria em minha trajetória.

Expresso minha imensa gratidão ao Guilherme Gomes Carvalho, cujo suporte, dedicação e atenção foram indispensáveis para o desenvolvimento e sucesso deste trabalho. Sua disponibilidade incansável, paciência e comprometimento em todas as etapas da pesquisa foram essenciais para superar os desafios encontrados ao longo do caminho. A qualidade de sua colaboração e a generosidade em compartilhar seus conhecimentos tiveram um impacto direto nos resultados obtidos, tornando este trabalho ainda mais sólido e significativo. Sou profundamente grata por sua contribuição inestimável.

Aos colegas do Laboratório de Endocrinofisiologia, Reprodução Animal e Humana (LEFRAH), expresso minha sincera gratidão pelo espírito colaborativo que tornou possível a

superação conjunta dos desafios ao longo desta jornada. A convivência, o apoio mútuo e a troca de conhecimentos foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Um agradecimento especial à Tathyana Benetis Piaui, cuja presença constante, dedicação e apoio em todas as etapas do processo foram indispensáveis para o sucesso deste projeto. Sua parceria e amizade fizeram toda a diferença ao longo deste caminho.

À Prof. Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza e ao Prof. Paulo Eduardo Narcizo de Souza, da Universidade de Brasília (UnB), expresso minha profunda gratidão pela colaboração essencial nas análises de Ressonância Paramagnética Eletrônica. Sua expertise e disponibilidade foram fundamentais para o desenvolvimento desta etapa crucial da pesquisa.

Ao Daniel Carneiro Moreira, manifesto meu mais profundo reconhecimento pela assistência e pelo comprometimento excepcionais durante as análises bioquímicas, que representaram uma etapa fundamental deste estudo. Sua dedicação, paciência e rigor científico foram indispensáveis para a obtenção de resultados precisos e confiáveis, contribuindo significativamente para a qualidade e o sucesso deste trabalho. Agradeço por sua prontidão em compartilhar conhecimentos e por seu profissionalismo.

À equipe do Centro de Assistência em Reprodução – Genesis, em Brasília-DF, manifesto minha profunda gratidão pelo suporte inestimável na captação de pacientes e pela assistência impecável na coleta de amostras. O compromisso e a excelência demonstrados por todos foram fundamentais para a realização deste trabalho. Em especial, agradeço à Dra. Hitomi Miura Nakagava, à Dra. Maria Eduarda Bonavides Amaral e à Iris Cabral pela dedicação, profissionalismo e apoio contínuo, que foram essenciais para superar os desafios e concretizar este projeto. Sua contribuição foi indispensável para o sucesso desta pesquisa, e sou sinceramente grata por isso.

Ao Hospital Materno Infantil de Brasília (HMIB), expresso meus mais sinceros agradecimentos pela valiosa parceria na captação de pacientes, que foi essencial para o andamento deste trabalho. Em especial, agradeço à Dra. Natalia Tierno e sua dedicada equipe pela atenção, profissionalismo e colaboração excepcionais ao longo de todo o processo. Sua disposição e comprometimento foram determinantes para o sucesso deste projeto, e sou profundamente grata por todo o apoio recebido.

À Universidade de Brasília e aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, agradeço o ensino de excelência, que contribuiu imensamente para a minha formação acadêmica e pessoal.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de doutorado, e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF), pelo suporte financeiro ao laboratório, manifesto meu reconhecimento pela contribuição que viabilizou este trabalho.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste projeto, minha eterna gratidão!

“Se o dinheiro for a sua esperança de independência, você jamais a terá. A única segurança verdadeira consiste numa reserva de sabedoria, de experiência e de competência.”

**Henry Ford**

## RESUMO

O estresse oxidativo é reconhecido como um fator determinante na fertilidade feminina, por comprometer a qualidade ovocitária e os desfechos reprodutivos. Este estudo investigou a relação entre marcadores redox sistêmicos e foliculares e parâmetros reprodutivos em mulheres submetidas à reprodução assistida, com foco na interação entre variáveis demográficas, bioquímicas e clínicas. Foram avaliadas 49 pacientes com idade média de  $36,0 \pm 3,5$  anos. Os biomarcadores analisados incluíram glutationa reduzida (GSH), glutationa oxidada (GSSG), glutationa total (tGSH), razão GSSG/GSH, espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN), com coleta de sangue periférico e fluido folicular. As análises revelaram correlações altamente significativas entre os níveis de glutationa nos dois compartimentos, indicando forte interdependência entre os sistemas redox sistêmico e local. Observou-se que níveis elevados de GSSG no fluido folicular correlacionaram-se com maior número de ovócitos recuperados, sugerindo aumento da atividade metabólica ovariana sob estímulo hormonal. Por outro lado, níveis elevados de GSH e tGSH no sangue associaram-se negativamente ao número de ovócitos maduros, apontando para maior consumo sistêmico de antioxidantes. A idade impactou negativamente os níveis de GSH, GSSG e tGSH, tanto no sangue quanto no fluido folicular, revelando uma perda progressiva da capacidade antioxidante com o envelhecimento. Além disso, a contagem de folículos antrais (CFA) foi confirmada como marcador importante da reserva ovariana, correlacionando-se positivamente com o número de ovócitos recuperados e maduros. Concluindo, essas descobertas reforçam que o equilíbrio redox é essencial para a competência ovocitária e o sucesso reprodutivo, sobretudo em mulheres em idade reprodutiva avançada — grupo majoritário nas clínicas de fertilização. A glutationa demonstrou-se um marcador sensível e promissor para monitoramento clínico da fertilidade, com potencial para aplicação em protocolos personalizados. Estratégias clínicas como suplementação antioxidante e monitoramento de biomarcadores podem ajudar a mitigar os efeitos do estresse oxidativo. Embora a uniformidade etária da amostra tenha fortalecido as análises, o tamanho limitado da coorte ressalta a necessidade de estudos com populações maiores e controles férteis, com vistas à validação de valores de referência e à implementação de intervenções redox personalizadas.

**Palavras-chave:** Estresse oxidativo, fluido folicular, infertilidade, reprodução assistida, biomarcadores redox, glutationa.

## ABSTRACT

Oxidative stress is widely recognized as a key determinant of female fertility due to its detrimental effects on oocyte quality and reproductive outcomes. This study investigated the relationship between systemic and follicular redox biomarkers and reproductive parameters in women undergoing assisted reproductive technologies (ART), with a particular focus on the interplay among demographic, biochemical, and clinical variables. A total of 49 patients were evaluated, with a mean age of  $36.0 \pm 3.5$  years. The biomarkers analyzed included reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG), total glutathione (tGSH), the GSSG/GSH ratio, reactive oxygen species (ROS), and reactive nitrogen species (RNS), assessed in peripheral blood and follicular fluid samples. The analyses revealed highly significant correlations between glutathione levels in both compartments, indicating a strong interdependence between systemic and local redox systems. Elevated levels of GSSG in the follicular fluid were positively correlated with the number of retrieved oocytes, suggesting increased ovarian metabolic activity in response to hormonal stimulation. Conversely, higher plasma levels of GSH and tGSH were negatively correlated with the number of mature oocytes, indicating enhanced systemic antioxidant consumption under high metabolic demand. Age was inversely associated with GSH, GSSG, and tGSH levels in both blood and follicular fluid, reflecting a progressive decline in antioxidant capacity with advancing age. Additionally, the antral follicle count (AFC) was confirmed as an important marker of ovarian reserve, showing positive correlations with the number of retrieved and mature oocytes. In conclusion, these findings underscore the essential role of redox balance in oocyte competence and reproductive success, particularly in women of advanced reproductive age—a predominant population in fertility clinics. Glutathione emerged as a sensitive and promising biomarker for clinical fertility monitoring, with potential application in personalized treatment protocols. Clinical strategies such as antioxidant supplementation and redox biomarker monitoring may help mitigate oxidative stress and optimize ART outcomes. While the age homogeneity of the cohort enhanced the robustness of the analyses, the limited sample size highlights the need for future studies involving larger populations and fertile controls to validate reference values and support the implementation of personalized redox-based interventions.

**Keywords:** Oxidative stress, follicular fluid, infertility, assisted reproduction, redox biomarkers, glutathione.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Representação esquemática do ovário de mamíferos, destacando as regiões cortical e medular, bem como as diferentes etapas do desenvolvimento folicular. ----- 24

**Figura 2.** Representação das fases do desenvolvimento folicular, incluindo os estágios pré-antral, sob controle parácrino independente de gonadotrofinas, e antral, dependente de controle endócrino mediado por FSH e estradiol. A tabela descreve o diâmetro do folículo e do ovócito, além do tempo de desenvolvimento estimado para cada estágio em humanos. AMH = Hormônio Antimulleriano; FSH = Hormônio Folículo Estimulante. ----- 26

**Figura 3.** Esquema representando os processos de ovogênese e foliculogênese. A imagem detalha o desenvolvimento das células germinativas, desde as ovogônias até a formação do zigoto, passando pela divisão meiótica e pelas fases de maturação do ovócito. Paralelamente, ilustra as etapas de desenvolvimento folicular, desde os folículos primordiais até a ovulação e formação do corpo lúteo, evidenciando a integração entre ambos os processos durante o ciclo reprodutivo feminino. ----- 29

**Figura 4.** Metabolismo mitocondrial e cadeia transportadora de elétrons. (A) Representação esquemática do metabolismo mitocondrial destacando o ciclo de Krebs, as principais vias metabólicas envolvidas na síntese de nucleotídeos, lipídios e utilização de glutamina, bem como a produção de ATP e lactato a partir de glicose. (B) Ilustração detalhada da cadeia transportadora de elétrons (CTE), com a transferência de elétrons através dos complexos I a IV, acoplada ao bombeamento de prótons no espaço intermembrana e a geração de ATP pela ATP sintase. Inibidores como rotenona, malonato, antimicina A, oligomicina e CCCP estão indicados, demonstrando seus efeitos nos diferentes pontos da CTE. Acetil-CoA – Acetil-coenzima A; ATP - Adenosina Trifosfato; ADP - Adenosina Difosfato; NAD<sup>+</sup> - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (forma oxidada); NADH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (forma reduzida); FAD - Flavina Adenina Dinucleotídeo (forma oxidada); FADH2 - Flavina Adenina Dinucleotídeo (forma reduzida); CoQ - Coenzima Q (Ubiquinona); Cit c - Citocromo c; CCCP - Carbonil Cianeto p-Trifluorometoxifenilhidrazona. ----- 33

**Figura 5.** Fatores e impactos do estresse oxidativo na reprodução feminina. A imagem destaca os fatores de estilo de vida que contribuem para a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), como obesidade, desnutrição e exposição ambiental, e seus efeitos adversos na saúde

reprodutiva. As ERO, incluindo  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$  e  $ONOO^-$ , estão associadas a condições reprodutivas, como síndrome do ovário policístico, endometriose, pré-eclâmpsia e infertilidade. Além disso, estão relacionadas a complicações gestacionais, como restrição de crescimento intrauterin, trabalho de parto prematuro e aborto espontâneo, culminando na redução da fertilidade feminina. ----- 35

**Figura 6.** Mecanismos de produção e controle de espécies reativas de oxigênio na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. Os elétrons gerados a partir de NADH e  $FADH_2$  no ciclo de Krebs são transferidos para a cadeia transportadora de elétrons (CTE), composta pelos complexos I a IV, localizados na membrana interna mitocondrial. Durante esse processo, o bombeamento de prótons ( $H^+$ ) cria um gradiente eletroquímico que alimenta a ATP sintase (complexo V), resultando na produção de ATP. Contudo, uma pequena fração dos elétrons pode escapar, gerando ânions superóxido ( $O_2^-$ ), que são convertidos em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) pela superóxido dismutase (SOD). O  $H_2O_2$  é então neutralizado em água por enzimas antioxidantes, como a catalase (CAT) e a glutationa peroxidase (GPx), auxiliada pela glutationa redutase (GR). O excesso de ERO pode gerar radicais altamente reativos, como o radical hidroxila ( $\cdot OH$ ) e o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), promovendo danos oxidativos a proteínas, lipídios e mtDNA, comprometendo a função mitocondrial. ----- 36

**Figura 7.** Efeitos do estresse oxidativo na fertilidade feminina e na saúde reprodutiva. O estresse oxidativo influencia negativamente diversas partes do sistema reprodutor feminino, incluindo a tuba uterina (disfunção ciliar, risco aumentado de gravidez ectópica), o ovário (reserva ovariana reduzida, envelhecimento acelerado), o útero (falha de implantação, pré-eclâmpsia, aborto espontâneo) e os ovócitos (fragmentação de DNA, aneuploidia e redução na taxa de fertilização). Esses efeitos destacam a complexidade e a amplitude do impacto do desequilíbrio redox na saúde reprodutiva feminina. ----- 40

**Figura 8.** Esquema da montagem das amostras de sangue para análise de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE). A seringa de 1 mL é preenchida com 100  $\mu L$  da amostra de sangue tratada com carboximetoxi-hidroxiamina (CMH), na proporção de 1:1. A amostra de sangue é colocada ao centro, entre dois blocos de gelo contendo 200  $\mu L$  de água miliQ, formando um buffer de 500  $\mu L$  no total. ----- 65

**Figura 9.** Delineamento experimental. (1) Mulheres diagnosticadas com infertilidade, com índice de massa corporal (IMC) entre 18 e 30 kg/m<sup>2</sup> e sem doenças crônicas de alto risco, foram incluídas. Pacientes com doenças infecciosas, tabagismo, síndrome dos ovários policísticos, endometriose moderada/grave ou histórico de perda gestacional recorrente foram excluídas do estudo. (2) A estimulação ovariana foi conduzida de acordo com protocolos padrão, com ajustes de medicação baseados nas características individuais de cada paciente. O desenvolvimento folicular foi monitorado por ultrassonografia endovaginal, e a aspiração folicular foi realizada após o "trigger", induzido com rhCG, uhCG ou agonista de GnRH, quando os folículos atingiram o diâmetro adequado ( $\geq 18$  mm). Após a coleta folicular, os gametas foram cultivados em meios específicos para fertilização in vitro (FIV) ou injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), sendo mantidos em incubadoras a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. (3) Durante a aspiração folicular, foram coletados 4 mL de fluido folicular de folículos dominantes. Amostras com contaminação visível por sangue foram descartadas. Simultaneamente, 4 mL de sangue venoso foram coletados utilizando tubos a vácuo contendo heparina ou EDTA. As amostras de fluido folicular e sangue foram submetidas à centrifugação a 10.000xg por 10 minutos a 4°C para separar o plasma e remover resíduos celulares. Os sobrenadantes obtidos foram armazenados em aliquotas de 500 µL a -80°C até a realização das análises. (4) As análises realizadas abrangeram diferentes metodologias. Para a quantificação de espécies reativas de nitrogênio (ERN), as amostras foram tratadas com acetonitrila (2:1) para precipitação proteica, seguidas de centrifugação a 10.000xg por 10 minutos a 4°C. O reagente de Griess foi então adicionado, e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm. Para a avaliação da atividade antioxidante, as amostras foram tratadas com ácido tricloroacético (TCA) a 10% (p/v) e submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para determinar os níveis de glutationa reduzida (GSH), glutationa oxidada (GSSG) e a relação GSSG/GSH. Por fim, a análise por Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) foi realizada após a adição de CMH (1:1) às amostras, que foram incubadas a 37°C por 30 minutos. As amostras de fluidos foliculares e plasma sanguíneo foram então analisadas para quantificar as ERO presentes. GnRH = Hormônio liberador de gonadotrofina; rhCG = Gonadotrofina coriônica humana recombinante; uhCG = Gonadotrofina coriônica humana urinária; TCA = Ácido tricloroacético; GSH = Glutationa reduzida; GSSG = Glutationa oxidada; RPE = Ressonância Paramagnética Eletrônica; TRA = Tecnologias de Reprodução Assistida; FIV = Fertilização in vitro; ICSI = Injeção intracitoplasmática de espermatozoides. ----- 66

**Figura 10.** Distribuição da idade das pacientes avaliadas no estudo, representada por pontos individuais. A linha vermelha central indica a média e as linhas horizontais superiores e inferiores representam os desvios padrão, evidenciando a homogeneidade do grupo em relação à idade. ----- 68

**Figura 11.** Distribuição percentual das principais causas de infertilidade feminina identificadas no estudo. As causas mais frequentes foram fatores tubários e idade avançada, seguidos por baixa reserva ovariana, infertilidade sem causa aparente, endometriose leve/moderada e síndrome dos ovários policísticos. ----- 71

**Figura 12.** Relação entre a idade das pacientes e os principais parâmetros reprodutivos avaliados. (A) Contagem de folículos antrais (CFA), mostrando uma redução significativa com o aumento da idade. (B) Número de ovócitos recuperados durante a punção ovariana, evidenciando um declínio relacionado à idade. (C) Número de ovócitos maduros, demonstrando impacto negativo do envelhecimento. (D) Número de blastocistos formados, que também diminui significativamente com o aumento da idade.  $r$  = coeficiente de correlação de Spearman. São consideradas diferenças significativas com  $p < 0,05$ . ----- 73

**Figura 13.** Correlações existentes entre os parâmetros reprodutivos avaliados. (A) Relação positiva entre a contagem de folículos antrais (CFA) e o número de ovócitos recuperados; (B) Relação positiva entre a CFA e o número de ovócitos maduros; (C) Relação positiva entre o número de ovócitos recuperados e o número de ovócitos maduros; (D-E) Relações positivas entre o número de ovócitos recuperados e ovócitos maduros, com a quantidade de blastocistos formados.  $r$  = coeficiente de correlação de Spearman. São consideradas diferenças significativas com  $p < 0,05$ . ----- 75

**Figura 14.** Correlações entre os marcadores de estresse oxidativo no sangue e no fluido folicular. (A) Correlação positiva significativa entre as concentrações de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) no fluido folicular e a razão GSSG/GSH no sangue, indicando que o aumento do estresse oxidativo sistêmico pode influenciar diretamente o microambiente folicular. (B) Correlação positiva significativa entre os níveis de Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN) no plasma sanguíneo e no fluido folicular, sugerindo uma conexão entre os estados oxidativos nos dois compartimentos. GSSG = forma oxidada da glutationa; tGSH = glutationa total;  $r$  = coeficiente de correlação de Spearman. São consideradas diferenças significativas com  $p < 0,05$ . ----- 78

**Figura 15.** Correlações entre diferentes marcadores de glutationa no sangue e no fluido folicular, avaliando a capacidade antioxidante sistêmica e local. (A) Correlação positiva significativa entre os níveis de glutationa oxidada (GSSG) e glutationa reduzida (GSH) no sangue, indicando um equilíbrio funcional do sistema redox. (B) Correlação positiva entre a glutationa total (tGSH) e a GSH no sangue, reforçando o papel da GSH como principal componente da capacidade antioxidante total. (C) Correlação positiva significativa entre a razão GSSG/GSH e os níveis de GSSG no sangue, sugerindo que o aumento da carga oxidativa altera o equilíbrio redox. (D) Correlação positiva significativa entre tGSH e GSSG no sangue, evidenciando uma resposta adaptativa do sistema antioxidante frente ao estresse oxidativo. (E) Correlação positiva significativa entre GSH e GSSG no fluido folicular, indicando que o microambiente folicular reflete o estado redox sistêmico e tenta preservar o equilíbrio antioxidante local.  $r$  = coeficiente de correlação de Spearman. São consideradas diferenças significativas com  $p < 0,05$ . ----- 80

**Figura 16.** Relação entre a idade das pacientes e os marcadores de glutationa no sangue e no fluido folicular. (A) Correlação negativa significativa entre os níveis de glutationa oxidada (GSSG) no sangue e a idade das pacientes, sugerindo uma redução na capacidade de reciclagem de GSH em GSSG com o aumento da idade. (B) Correlação negativa significativa entre a razão GSSG/GSH no sangue e a idade, indicando uma diminuição na eficiência do equilíbrio redox sistêmico em mulheres mais velhas. (C) Correlação negativa significativa entre os níveis de GSSG no fluido folicular e a idade, refletindo a redução da capacidade antioxidante local no microambiente folicular com o avanço da idade.  $r$  = coeficiente de correlação de Spearman. São consideradas diferenças significativas com  $p < 0,05$ . ----- 83

**Figura 17.** Relações entre os níveis de marcadores de glutationa no sangue e no fluido folicular e o número de ovócitos recuperados. (A) Correlação negativa significativa entre os níveis de glutationa reduzida (GSH) no sangue e o número de ovócitos recuperados, sugerindo que o aumento na recuperação de ovócitos está associado a um consumo maior de antioxidantes sistêmicos. (B) Correlação negativa significativa entre os níveis de glutationa total (tGSH) no sangue e o número de ovócitos recuperados, indicando o impacto da estimulação ovariana sobre a capacidade antioxidante sistêmica. (C) Correlação positiva significativa entre os níveis de glutationa oxidada (GSSG) no fluido folicular e o número de ovócitos recuperados, refletindo uma intensificação da atividade metabólica local e da geração de espécies reativas de oxigênio

(ERO) no ambiente folicular com o aumento da quantidade de ovócitos obtidos.  $r$  = coeficiente de correlação de Spearman. São consideradas diferenças significativas com  $p < 0,05$ . ----- 85

**Figura 18.** Relações entre os níveis de glutatona reduzida (GSH) e glutatona total (tGSH) no sangue e o número de ovócitos maduros. (A) Correlação negativa significativa entre os níveis de GSH no sangue e o número de ovócitos maduros, sugerindo maior consumo de antioxidantes sistêmicos durante o processo de maturação ovocitária. (B) Correlação negativa significativa entre os níveis de tGSH no sangue e o número de ovócitos maduros, indicando uma redução na capacidade antioxidante global associada à maior demanda metabólica.  $r$  = coeficiente de correlação de Spearman. São consideradas diferenças significativas com  $p < 0,05$ . ----- 86

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Parâmetros clínicos avaliados no estudo, incluindo idade, índice de massa corporal (IMC), índice de massa corporal (IMC), duração da infertilidade, número de ovócitos recuperados, ovócitos maduros e blastocistos, com valores mínimos, máximos, médias e desvios padrão ( $\pm$  DP). ----- 69

Tabela 2. Distribuição das finalidades dos tratamentos realizados e os desfechos de gravidez clínica entre as pacientes avaliadas no estudo. As finalidades incluem injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), preservação da fertilidade e fertilização in vitro (FIV). Os desfechos são apresentados em termos de gravidez clínica positiva e negativa, com os resultados expressos em números absolutos e percentuais, evidenciando as escolhas terapêuticas predominantes e suas respectivas taxas de sucesso. ----- 72

## SIGLAS E ABREVIAÇÕES

Acetyl-CoA – Acetyl-coenzima A	ESHRE - Sociedade Europeia de
ADP - Adenosina Difosfato	Reprodução Humana e Embriologia
AMH - Hormônio anti-mülleriano	FAD - Flavina Adenina Dinucleotídeo
ATP - Adenosina trifosfato	(forma oxidada)
Beta-hCG - Gonadotrofina coriônica humana	FADH <sub>2</sub> - Flavina Adenina Dinucleotídeo (forma reduzida)
BMP4 - Proteínas morfogenéticas ósseas 4	FF - Fluido folicular
BMP7 - proteínas morfogenéticas ósseas 7	FGF7 - Fator de crescimento de fibroblastos
CAT - catalase	7
CCCP - Carbonil Cianeto p- Trifluorometoxifenilhidrazona	FIV - Fertilização in vitro
CEP - Comitê de Ética em Pesquisa	FSH - Hormônio Folículo Estimulante
CFA - Contagem de folículos antrais	FSH-r - Hormônio folículo estimulante recombinante
Cit c - Citocromo c	GDF9 - Fator de diferenciação do crescimento 9
CMH - Carboximetoxi-hidroxiamina	GnRH - Hormônio liberador de gonadotrofina
CONEP - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa	GPx - glutationa peroxidase
CoQ - Coenzima Q (Ubiquinona)	GR - glutationa redutase
CTE - Cadea transportadora de elétrons	GSH - Glutationa reduzida
DTNB - Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico	GSSG - Glutationa dissulfeto
EDTA- ácido etilenodiaminotetracético	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - peróxido de hidrogênio
ERN - Espécies reativas de nitrogênio	HIV - Vírus da imunodeficiência humana
ERO - Espécies reativas de oxigênio	

HMIB - Hospital Materno Infantil de Brasília	OH <sup>•</sup> - Radical hidroxila
HO <sub>2</sub> <sup>•</sup> - Radical hidroperoxila	OMS - Organização Mundial da Saúde
HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência	ONOO <sup>-</sup> - Peróxinitrito
HTLV - Vírus-T linfotrópico humano do tipo 1	Prxs - peroxirredoxinas
ICSI - Injeção intracitoplasmática de espermatozoides	rhCG - Gonadotrofina coriônica humana recombinante
IMC - índice de massa corporal	RO <sup>•</sup> - Radical alcoxila
KITL - KIT ligand	ROO <sup>•</sup> - Radical peroxila
LH - Hormônio luteinizante	RPE - Ressonância paramagnética eletrônica
LIF - Fator inibidor da leucemia	SDF-1 - Fator derivado do estroma
MDA - Malondialdeído	SOD - Superóxido dismutase
mtDNA - DNA mitocondrial	SULF - Sulfanilamida
NAD - Nicotinamida Adenina Dinucleótido	TCA - ácido tricloroacético
NAD <sup>+</sup> - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (forma oxidada)	TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido
NADH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (forma reduzida)	TGF $\beta$ - Fator de crescimento transformador beta
NED - N-(1-naftil) etilenodiamina	tGSH - Glutationa total
NO - óxido nítrico	THC - Tetrahidrocanabinol
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> - Nitritos	TNB - 2-nitro-5-thiobenzoato
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> - Nitratos	TRA - Tecnologias de reprodução Assistida
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> - Ânion superóxido	uhCG - Gonadotrofina coriônica humana extraída da urina
	VCL <sub>3</sub> - Cloreto de vanádio

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	21
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	23
<b>2.1. Aspectos gerais da foliculogênese em mamíferos .....</b>	23
<b>2.2. Aspectos gerais da reprodução humana .....</b>	28
<b>2.3. Estresse oxidativo: conceitos e relevância para a reprodução humana .....</b>	30
<i>2.3.1. Entendendo os radicais livres e o metabolismo energético .....</i>	31
<i>2.3.2. Os mecanismos de defesa antioxidantes .....</i>	35
<b>2.4. O papel do estresse oxidativo no sistema reprodutor feminino .....</b>	37
<i>2.4.1. As principais fontes produtoras de ERO no sistema reprodutor feminino .....</i>	37
<i>2.4.2. As funções fisiológicas das ERO no sistema reprodutor feminino .....</i>	38
<i>2.4.3. Mecanismos de danos causados pelo estresse oxidativo no sistema reprodutor feminino .....</i>	39
<b>2.5. Fatores relacionados ao estresse oxidativo que afetam a fertilidade feminina .....</b>	43
<i>2.5.1. Idade .....</i>	43
<i>2.5.2. Peso corporal .....</i>	45
<i>2.5.3. Estilo de vida .....</i>	47
<i>2.5.4. Uso de tecnologias de reprodução assistida (TRA) como alternativa para infertilidade. ....</i>	49
<b>2.6. Os biomarcadores do estresse oxidativo e suas influências na reprodução assistida. ....</b>	51
<i>2.6.1. Glutatona (GSH) .....</i>	51
<i>2.6.2. Nitrito (<math>NO_2^-</math>) e Nitrato (<math>NO_3^-</math>) .....</i>	54
<b>3. JUSTIFICATIVA .....</b>	55
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	57
<b>4.1. Objetivo geral .....</b>	57

<b>4.2. Objetivos específicos .....</b>	57
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	58
<b>5.1. Seleção da população .....</b>	58
<b>5.2. Protocolo de investigação básica e estimulação ovariana .....</b>	58
<i>5.2.1. Protocolo de aspiração folicular utilizado no Centro de Assistência em Reprodução Humana – Genesis .....</i>	58
<i>5.2.2. Protocolo de aspiração folicular no Hospital Materno Infantil de Brasília (HMIB) .....</i>	60
<b>5.3. Obtenção do fluido folicular e plasma sanguíneo .....</b>	61
<b>5.4. Análises bioquímicas .....</b>	62
<i>5.4.1. Atividade antioxidante .....</i>	62
<i>5.4.2. Espécies reativas de nitrogênio (ERN) .....</i>	63
<b>5.5. Espécies reativas de oxigênio (ERO) .....</b>	64
<b>5.6. Análise estatística .....</b>	67
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	68
<b>6.1. Características clínicas e perfil demográfico das pacientes .....</b>	68
<b>6.2. Parâmetros oxidativos: biomarcadores e impactos reprodutivos .....</b>	77
<i>6.2.1. Marcadores de estresse oxidativo: ERO e ERN .....</i>	77
<i>6.2.2. Atividade antioxidante .....</i>	80
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	87
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	88

## 1. INTRODUÇÃO

A fertilidade é uma questão de preocupação para a saúde pública global, devido à sua estreita ligação com a saúde reprodutiva e o bem-estar geral de homens e mulheres. A Organização Mundial da Saúde (OMS) define a infertilidade como uma doença e estima que 1 em cada 6 pessoas no mundo enfrenta problemas de concepção (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2023). As Tecnologias de Reprodução Assistida (TRA), como a fertilização *in vitro* (FIV) e a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), representam alternativas eficazes, mas seus altos custos criam uma barreira econômica ao acesso e destacam, particularmente, as disparidades sociais pela falta de políticas públicas para subsidiar os tratamentos (NJAGI; ARSENIEVIC & GROOT, 2020; BRAUTSCH et al., 2023).

Nos últimos anos, os avanços científicos nas TRA têm sido notáveis, com uma intensificação na busca por biomarcadores capazes de avaliar a qualidade ovocitária e prever o sucesso na gravidez (NADIA et al., 2019; PIZARRO et al., 2020). Procedimentos como a FIV e ICSI têm se mostrado alternativas eficazes para casais inférteis, permitindo a seleção criteriosa de gametas e a escolha de embriões com maior potencial para transferência (ALTERI et al., 2024). Contudo, a qualidade dos ovócitos permanece como um fator limitante para o sucesso do tratamento, uma vez que células com características inadequadas estão diretamente associadas à formação de embriões menos viáveis, comprometendo os desfechos reprodutivos (NADIA et al., 2019; PIZARRO et al., 2020).

Estudos indicam que o comprometimento na qualidade ovocitária está relacionado a falhas no desenvolvimento e maturação dos ovócitos, sendo que a taxa de gravidez clínica por aspiração e transferência de embrião é de 26,3% e 33,5%, respectivamente (ALTERI et al., 2024). Nesse contexto, a competência do ovócito, definida como sua capacidade de completar a meiose, ser fertilizado e gerar um embrião viável, é um elemento indispensável para o sucesso reprodutivo. Esse processo é altamente complexo e resulta de uma interação dinâmica e coordenada entre o ovócito e o microambiente folicular (EPPIG, O'BRIEN & WIGGLESWORTH, 1996; DA BROI et al., 2018; MALO et al., 2024). Portanto, a saúde do ambiente intrafolícular, sustentada pelas células do *cumulus* e do fluido folicular, é essencial para a maturação do ovócito, pois fornece suporte metabólico e antioxidante (KARABULUT et al., 2020; PIZARRO et al., 2020; SCHÜTZ & BATALHA, 2024).

Diante disso, o fluido folicular produzido pelas células da granulosa durante os estágios mais avançados de desenvolvimento, contém uma variedade de componentes, como hormônios esteroides, metabólitos, proteínas, polissacarídeos, espécies reativas de oxigênio (ERO) e

antioxidantes, que desempenham um papel crucial no suporte ao crescimento e à maturação dos ovócitos e das células foliculares, além de protegê-los de danos e estresse oxidativo (DA BROI et al., 2018; ZHANG et al., 2020; BARROSO-VILLA et al., 2023). Alterações na composição do fluido folicular, mediadas por vias de sinalização hormonal, parácrina e autócrina, ou por condições sistêmicas, podem influenciar negativamente a qualidade dos ovócitos, comprometendo o sucesso da fertilização e o desenvolvimento embrionário (DA BROI et al., 2018; ZHANG et al., 2020; BARROSO-VILLA et al., 2023).

Dentre os componentes presentes no fluido folicular, as ERO desempenham um papel significativo. Quando ocorre um desequilíbrio entre a produção dessas moléculas e a capacidade de sua eliminação por mecanismos antioxidantes, instaura-se o estresse oxidativo, que é uma das principais causas de comprometimento da qualidade ovocitária (KARABULUT et al., 2020). Estudos mostram que falhas nos sistemas de defesa antioxidant alteram o estado redox celular, impactando várias funções reprodutivas femininas, como a maturação e a qualidade dos ovócitos, a formação do corpo lúteo, a esteroidogênese ovariana, o processo de fertilização, o desenvolvimento embrionário e o sucesso da gravidez (OLSZAK-WASIK et al., 2019; KARABULUT et al., 2020).

Ainda que o estresse oxidativo seja amplamente reconhecido por seu papel na fisiopatologia da infertilidade, as causas, efeitos e mecanismos moleculares subjacentes ainda não estão completamente compreendidos (OLSZAK-WASIK et al., 2019; KARABULUT et al., 2020). Estudos relatam que o aumento dos níveis de ERO, a peroxidação lipídica elevada e a redução da capacidade antioxidant no fluido folicular estão associadas à baixa qualidade embrionária e a menores taxas de fertilização, embora ainda não haja consenso sobre essa correlação (MAUCHART et al., 2023). O que se sabe é que esse desequilíbrio entre produção de ERO e sua eliminação causa danos a componentes celulares como lipídios, ácidos nucleicos, carboidratos e proteínas (AITKEN et al., 2022; MAUCHART et al., 2023).

Embora estudos *in vivo* e *in vitro* indiquem que vários fatores fisiológicos e técnicos também influenciam a qualidade embrionária e o sucesso da gravidez (OLSZAK-WASIK et al., 2019) na prática clínica muitas etapas no diagnóstico e tratamento da infertilidade são baseadas em biomarcadores inespecíficos, podendo resultar em desfechos indesejáveis (NADIA et al., 2019; OLSZAK-WASIK et al., 2019). Assim, compreender como as células do *cumulus* e o fluido folicular influenciam na aquisição da competência ovocitária e podem proteger o ovócito contra condições sistêmicas e pélvicas prejudiciais é essencial para melhorar as decisões clínicas no manejo da infertilidade (DA BROI et al., 2018).

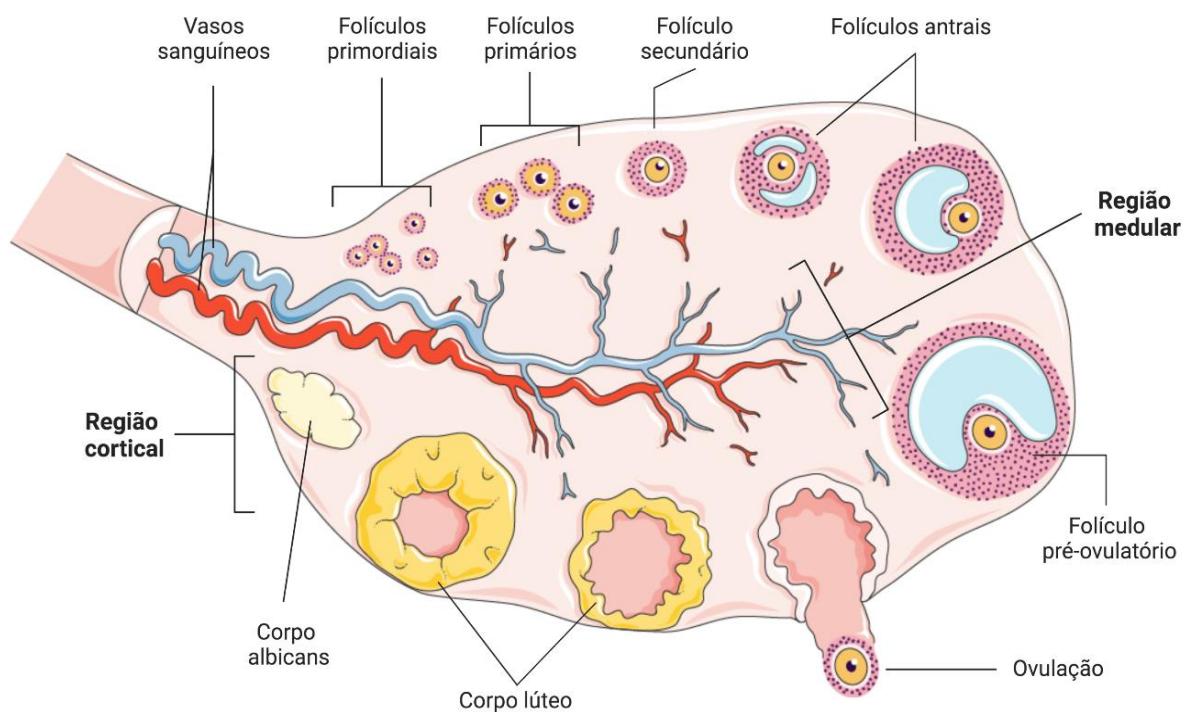
Portanto, a identificação e a validação clínica de novos biomarcadores que pudessem prever a competência do ovócito para se tornar um embrião viável e com grande potencial de implantação é uma possibilidade inovadora para incrementar a taxa de sucesso das TRA, possibilitando o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes para diversos perfis de pacientes (ALTERI et al., 2024). Diante do exposto, o objetivo desta pesquisa é investigar as correlações entre o estresse oxidativo folicular e sistêmico de mulheres submetidas a tratamentos de infertilidade, além de seus impactos na qualidade ovocitária, no desenvolvimento embrionário e nas taxas de gravidez.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. Aspectos gerais da foliculogênese em mamíferos

O ovário é o principal órgão do sistema reprodutor feminino, desempenhando funções endócrinas e exócrinas essenciais para a reprodução (LI et al., 2021; SUGIURA et al., 2023). Sua função endócrina consiste na produção e liberação de esteroides sexuais, regulados pelas gonadotrofinas hipofisárias, os quais desempenham papéis cruciais tanto na fisiologia sistêmica quanto na coordenação dos eventos que culminam na ovulação e luteogênese. Por outro lado, a função exócrina do ovário é responsável pela produção e liberação dos gametas femininos, os ovócitos (DEVESA & CAICEDO, 2019; LI et al., 2021; SUGIURA et al., 2023).

O ovário de mamíferos é composto por duas regiões distintas: a cortical e a medular. Em todas as espécies, com exceção dos equinos, a região cortical está localizada externamente ao parênquima (BAHR, 2018). A região cortical abriga os folículos ovarianos em diferentes estágios de desenvolvimento, além dos corpos lúteos (BAHR, 2018). Já a região medular, situada na porção interna do ovário, é composta por vasos sanguíneos, células musculares, nervos e tecido conjuntivo, desempenhando funções primordiais de nutrição e sustentação do órgão (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013; BAHR, 2018). A Figura 1 ilustra a região cortical e medular do ovário de mamíferos, bem como as estruturas associadas ao ciclo reprodutivo, como o corpo lúteo, o corpo *albicans* e a liberação do ovócito durante a ovulação.



**Figura 1.** Representação esquemática do ovário de mamíferos, destacando as regiões cortical e medular, bem como as diferentes etapas do desenvolvimento folicular.

Fonte: Rodrigues & Paulini, 2023.

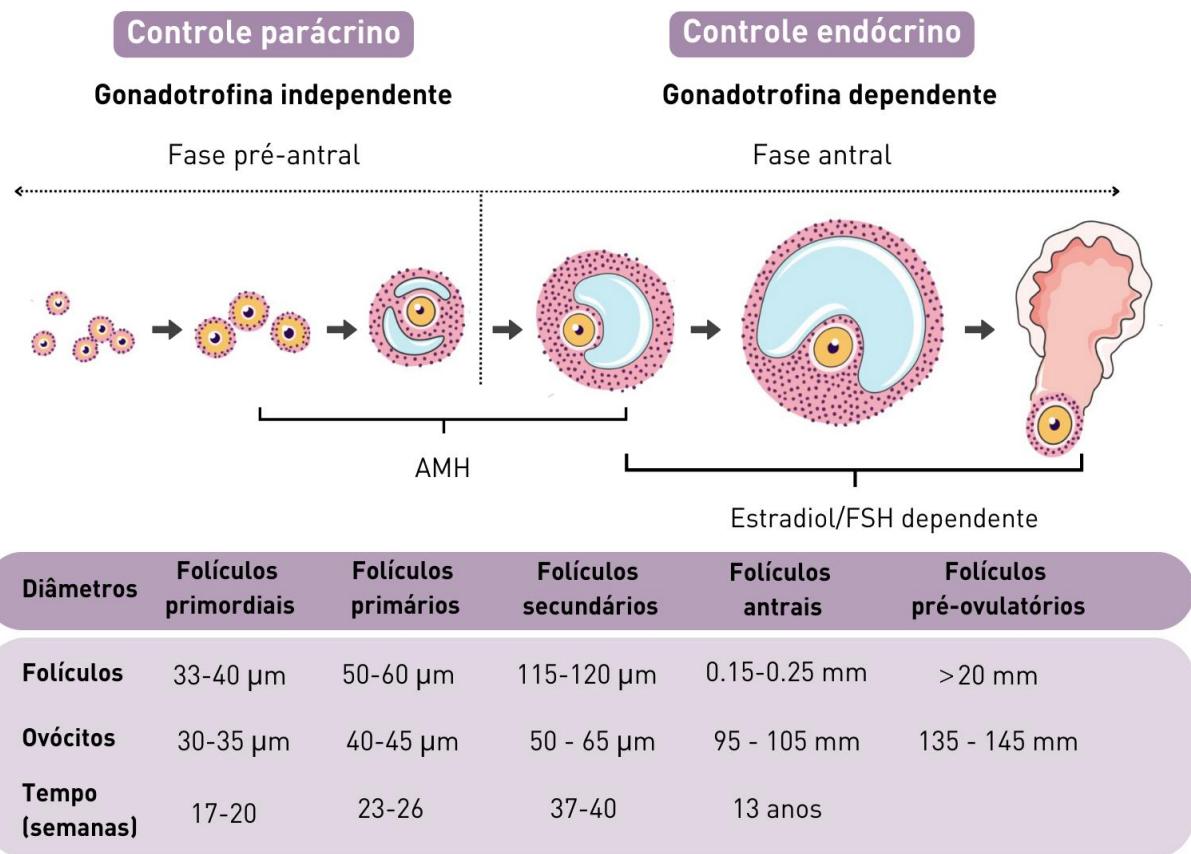
O desenvolvimento dos ovócitos é fundamentado em um conceito amplamente aceito na biologia reprodutiva há décadas: em mamíferos, acredita-se que a produção de ovócitos cesse antes do nascimento. Dessa forma, as fêmeas nascem com um número finito e não renovável de células germinativas, as quais permanecem estacionadas na meiose I e são envolvidas por células somáticas, formando estruturas denominadas folículos ovarianos (PEARL & FAIRCHILD, 1921). Assim, no momento do nascimento, o ovário já contém a reserva completa de folículos necessária para a vida reprodutiva, composta por milhares de folículos em diferentes estágios de desenvolvimento, os quais são independentes da estimulação por gonadotrofinas (BAHR, 2018; LI et al., 2021; SCHÜTZ & BATALHA, 2024).

Os folículos primordiais representam as principais estruturas funcionais dos ovários, sendo formados durante o desenvolvimento fetal. Eles são constituídos por uma única camada de células da granulosa que envolvem o ovócito (DEVESA & CAICEDO, 2019; SUGIURA et al., 2023). Contudo, mais de 99% desses folículos sofrem atresia antes mesmo de alcançar a ovulação, com a maior parte sendo eliminada antes da puberdade (BAHR, 2018). Em mamíferos no geral, após o início da puberdade, em cada ciclo estral/menstrual, apenas um pequeno grupo de folículos primordiais inicia o desenvolvimento. Desses, apenas um, o folículo

dominante, culmina na liberação do ovócito, enquanto os demais folículos, que não resultam na liberação do ovócito, sofrem atresia ao longo do processo. A atresia folicular é atribuída a fatores como baixas concentrações de hormônios hipofisários, níveis reduzidos de esteroides sexuais e suprimento sanguíneo insuficiente para os folículos em desenvolvimento (DEVESA & CAICEDO, 2019; SUGIURA et al., 2023; SCHÜTZ & BATALHA, 2024).

Nas últimas décadas, pesquisadores têm se dedicado a entender os mecanismos que regulam o crescimento e o desenvolvimento do ovócito e das células que o rodeiam. A revisão de Longobardi et al. (2024) traz uma visão clara sobre os fatores que influenciam esse processo, mostrando que ele é regulado por uma interação delicada entre sinais que estimulam e inibem a ativação folicular. Esses sinais vêm de diferentes fontes: os próprios folículos, as células da granulosa que os cercam, o tecido ao redor e até mesmo de fatores sistêmicos do organismo. Diversos fatores participam da ativação folicular, incluindo proteínas da superfamília do fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ), como as proteínas morfogenéticas ósseas 4 e 7 (BMP4 e BMP7) e o fator de diferenciação do crescimento 9 (GDF9). Além desses, outros elementos também contribuem para esse processo, como o KIT ligante (KITL), o fator inibidor da leucemia (LIF), o fator de crescimento de fibroblastos 7 (FGF7), andrógenos, insulina e interleucina-16. Já os fatores que inibem a ativação incluem o fator derivado do estroma (SDF-1) e seu receptor CXCR4, o regulador do ciclo celular p21, o hormônio anti-mulleriano (AMH), activina e inibina. Esses fatores são cruciais para a ativação dos folículos primordiais e participam de todas as etapas do desenvolvimento folicular (LI et al., 2021; SUGIURA et al., 2023; LONGOBARDI et al., 2024).

Desta forma, a foliculogênese é o processo que abrange a formação, o crescimento e a maturação dos folículos ovarianos, desde a constituição do folículo primordial até o estágio de folículo antral, culminando com a ovulação de um ovócito maduro (BAHR, 2018; SCHÜTZ & BATALHA, 2024). Esse processo é frequentemente dividido em duas fases distintas: a fase pré-antral, que compreende a ativação inicial dos folículos e seu crescimento nos estágios primordiais, primários e secundários; e a fase antral, que abrange o início e a conclusão do crescimento dos folículos terciários ou antrais (LI et al., 2021). A Figura 2 ilustra o desenvolvimento folicular dividido em fases pré-antral e antral, com características distintas quanto ao controle regulatório, às mudanças morfológicas e o tamanho do folículo e do ovócito, além de indicar os tempos de desenvolvimento necessários para cada estágio.



**Figura 2.** Representação das fases do desenvolvimento folicular, incluindo os estágios pré-antral, sob controle parácrino independente de gonadotrofinas, e antral, dependente de controle endócrino mediado por FSH e estradiol. A tabela descreve o diâmetro do folículo e do ovócito, além do tempo de desenvolvimento estimado para cada estágio em humanos. AMH = Hormônio Antimulleriano; FSH = Hormônio Folículo Estimulante.

Fonte: Adaptado de Malo et al., 2024.

Os estágios iniciais do desenvolvimento folicular são independentes da ação direta de gonadotrofinas, sendo regulados principalmente pela secreção parácrina de fatores de crescimento e citocinas (SUGIURA et al., 2023; MALO et al., 2024; SCHÜTZ & BATALHA, 2024). Durante essa fase, ocorre a ativação dos folículos primordiais e sua progressão para folículos primários, secundários e antrais iniciais. Os folículos antrais iniciais, embora responsivos às gonadotrofinas, ainda não dependem completamente desses hormônios para o desenvolvimento. No estágio final, os folículos antrais tornam-se dependentes de gonadotrofinas para continuar o crescimento, passando pelos processos de recrutamento, seleção, maturação e ovulação (LA MARCA et al., 2023; MALO et al., 2024).

Estudos sugerem que a ativação folicular é regulada por um equilíbrio dinâmico entre fatores inibidores e estimuladores, sendo o início do crescimento potencialmente dependente de alterações neste equilíbrio, dentro do microambiente do folículo (BAHR, 2018; LI et al.,

2021; SCHÜTZ & BATALHA, 2024). Um dos primeiros sinais da ativação folicular é a retomada do crescimento das células da granulosa e o desenvolvimento da zona pelúcida ao redor do ovócito em folículos primários ou secundários. Além disso, ocorre uma mudança no formato das células da granulosa, acompanhada por um aumento do volume citoplasmático e do núcleo do ovócito (BAHR, 2018). Em estágios mais avançados, a proliferação celular, diferenciação e o processo de atresia folicular resultam de uma interação complexa entre fatores locais e endócrinos (SCHÜTZ & BATALHA, 2024). Nesse contexto, torna-se evidente o papel fundamental das gonadotrofinas e dos fatores de crescimento no desenvolvimento e maturação dos folículos ovarianos.

De acordo com a revisão de Fortune, Rivera & Yang (2004), acreditava-se que a regulação da função ovariana fosse exclusivamente controlada por fatores endócrinos, especialmente pelos hormônios gonadotróficos. Esses hormônios promovem o crescimento e a diferenciação folicular e lútea, além de estimular a secreção de esteroides e inibinas, os quais desempenham funções essenciais em diversos órgãos-alvo relacionados à reprodução feminina. No entanto, os autores destacam que a descoberta de receptores específicos para a ação hormonal e a variação no tipo e número desses receptores nas células foliculares, ao longo do desenvolvimento folicular, ajudou a compreender como folículos em diferentes estágios podem responder de forma distinta a um mesmo estímulo gonadotrófico (FORTUNE, RIVERA & YANG, 2004; LI et al., 2021; SUGIURA et al., 2023).

Os hormônios gonadotróficos secretados pela hipófise, Hormônio Folículo Estimulante (FSH) e Hormônio Luteinizante (LH), desempenham papéis essenciais na foliculogênese e na produção e secreção dos hormônios ovarianos, estrógeno e progesterona, que regulam as transformações endometriais ao longo do ciclo estral (LA MARCA et al., 2023). O FSH atua principalmente nas células da granulosa, promovendo sua proliferação e diferenciação, além de estimular a síntese de esteroides e a expressão de receptores para o fator de crescimento epidermal e LH, sendo indispensável para o desenvolvimento dos folículos antrais (LA MARCA et al., 2023). Por sua vez, o LH atua nas células da teca, onde promove a esteroidogênese, convertendo colesterol em testosterona, que, sob a influência do FSH, é transformada em  $17\beta$ -estradiol pelas células da granulosa. Além disso, o LH é fundamental na fase final da maturação folicular, com seu pico de concentração diretamente associado à ovulação (LA MARCA et al., 2023).

À medida que o crescimento dos folículos antrais progride, aquele com maior resposta ao FSH se torna dominante, inibindo assim, o desenvolvimento concomitante dos folículos

ovarianos (LI et al., 2021). Ao mesmo tempo, as células da granulosa começam a expressar receptores LH, sob a influência do FSH. Nesse momento, as concentrações de inibina e estradiol aumentam, ocasionando uma diminuição na liberação de FSH pela glândula hipófise. Então, FSH e LH agem em sinergia para apoiar o desenvolvimento folicular e a ovulação (LI et al., 2021; LA MARCA et al., 2023). Como uma forma de feedback negativo, essa diminuição na disponibilidade de FSH induz os folículos subordinados a sofrer atresia e degeneração. Por fim, o aumento na secreção de estrógeno ocasiona o pico pré-ovulatório de LH, promovendo a ovulação do folículo dominante e a formação do corpo lúteo (LI et al., 2021; LA MARCA et al., 2023).

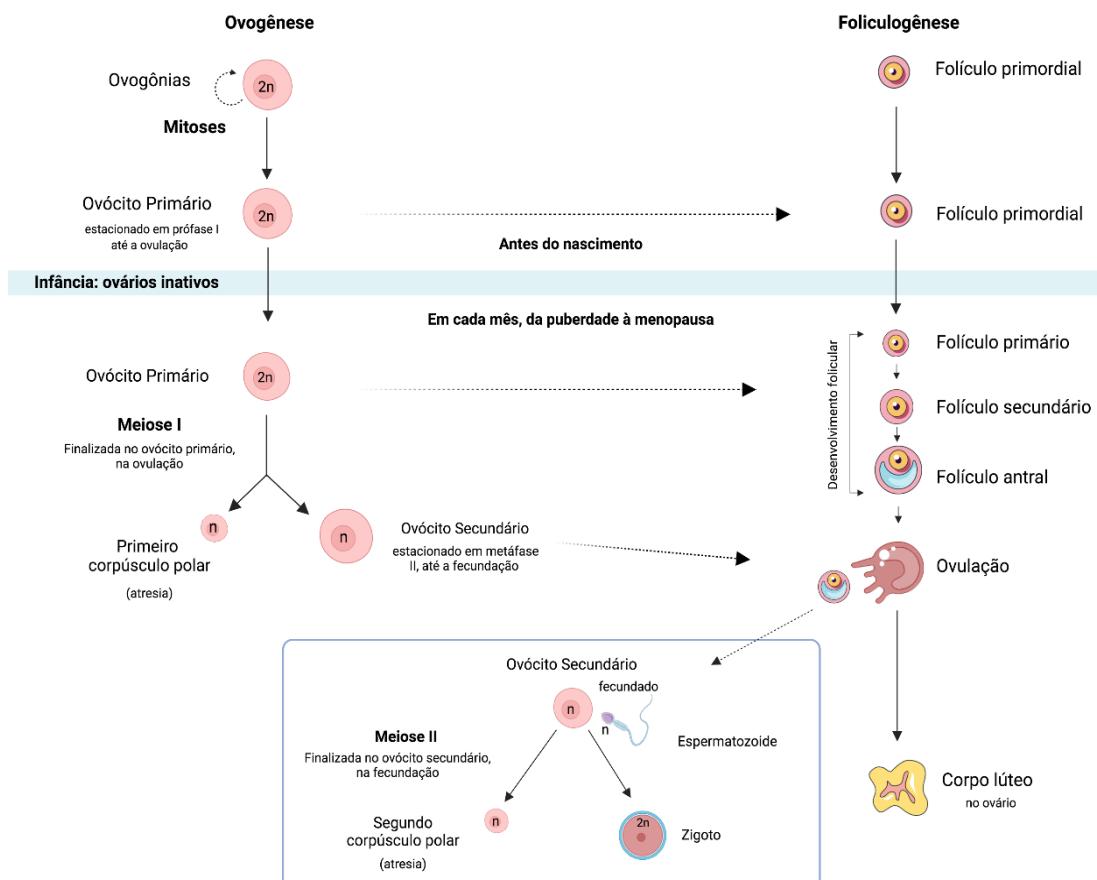
## 2.2. Aspectos gerais da reprodução humana

O desenvolvimento do ovário humano começa precocemente na gestação. Por volta do 26º dia, as células germinativas primordiais, originadas na parede posterior do saco vitelínico, iniciam sua migração para as cristas gonadais, estruturas que darão origem às gônadas. Ao chegar às gônadas em formação, essas células proliferam intensamente por mitose e, a partir do segundo mês de gestação, começam a ser denominadas ovogônias, células precursoras dos ovócitos (FORTUNE, 2003; MALO et al., 2024). Após sucessivos ciclos de divisão mitótica, as ovogônias entram em meiose, atingindo o estágio diplóteno e diferenciando-se em ovócitos primários. A partir do quarto mês de gestação, ocorre a formação dos folículos primordiais, quando os ovócitos são circundados por uma camada única de células da granulosa achatadas, originando estruturas com diâmetro entre 30 e 40  $\mu\text{m}$  (GOUGEON, 1996).

Ao nascimento, a reserva germinativa feminina é composta por aproximadamente 1 a 2 milhões de folículos primordiais, localizados no córtex ovariano e contendo ovócitos estacionados na prófase I (FORTUNE, 2003; GOUGEON, 2010). Durante a vida reprodutiva, os folículos primordiais são recrutados para a foliculogênese, permanecendo no córtex ovariano enquanto avançam pelos estágios de desenvolvimento, até atingirem o estágio de folículos antrais. Esse processo, biologicamente complexo e rigorosamente regulado, inicia-se com a ativação dos folículos primordiais (33–40  $\mu\text{m}$  de diâmetro), marcada pela transformação das células da granulosa de achatadas para cuboidais, resultando na formação dos folículos primários (50–60  $\mu\text{m}$  de diâmetro) (FORTUNE, 2003; GOUGEON, 2010; MALO et al., 2024). O crescimento subsequente dos folículos primários promove a proliferação acelerada das células da granulosa, formando uma camada granulosa multilaminar e originando os folículos secundários (115–120  $\mu\text{m}$  de diâmetro). Nesse estágio, a camada da teca se diferencia em teca

interna e externa, desempenhando papel crucial na produção de hormônios esteroides, em interação com as células da granulosa (GOUGEON, 2010; LI et al., 2021; SCHÜTZ & BATALHA, 2024).

Com o crescimento adicional, ocorre o desenvolvimento de uma cavidade antral preenchida por líquido folicular, um evento que marca a transição para o estágio de folículo antral. Esse líquido é secretado pelas células da granulosa e contém fatores bioativos essenciais para o desenvolvimento folicular (BAHR, 2018; SCHÜTZ & BATALHA, 2024). O processo prossegue com a seleção do folículo dominante, também chamado de folículo pré-ovulatório, que se destaca entre os folículos antrais e atinge cerca de 20 mm de diâmetro. Finalmente, a maturação culmina na ruptura do folículo, um evento mediado por alterações hormonais e enzimáticas, resultando na liberação do complexo *cumulus-oócito* durante a ovulação (GOUGEON, 1996; FORTUNE, 2003, 2010; MALO et al., 2024). A Figura 3 ilustra o processo de ovogênese, diretamente associado à foliculogênese, destacando as etapas de desenvolvimento das células germinativas desde a formação das ovogônias até a fertilização, e sua interação com o ciclo de maturação folicular



**Figura 3.** Esquema representando os processos de ovogênese e foliculogênese. A imagem detalha o desenvolvimento das células germinativas, desde as ovogônias até a formação do zigoto, passando pela divisão

meiótica e pelas fases de maturação do ovócito. Paralelamente, ilustra as etapas de desenvolvimento folicular, desde os folículos primordiais até a ovulação e formação do corpo lúteo, evidenciando a integração entre ambos os processos durante o ciclo reprodutivo feminino.

Fonte: Rodrigues & Paulini, 2023.

Com a chegada da puberdade, a reserva germinativa feminina sofre uma redução significativa, restando apenas cerca de 25% dos folículos primordiais presentes ao nascimento, o que equivale a aproximadamente 300.000 ovócitos (MALO et al., 2024). No entanto, a maioria desses ovócitos sofre atresia, não atinge a ovulação e, consequentemente, não contribui para a reprodução (EPIIG; O'BRIEN & WIGGLESWORTH, 1996). Nesse contexto, técnicas de resgate e cultivo de folículos *in vitro* até estágios de maturação, com ovócitos competentes, despontam como um avanço promissor na preservação e restauração da fertilidade feminina.

### **2.3. Estresse oxidativo: conceitos e relevância para a reprodução humana**

A reprodução humana, sendo um processo biológico complexo, depende de uma série de eventos celulares, hormonais e moleculares que garantem o sucesso da fertilização, implantação e desenvolvimento embrionário (MALO et al., 2024). Contudo, esse sistema delicado pode ser facilmente comprometido por fatores internos e externos que afetam o equilíbrio fisiológico. Nesse contexto, o estresse oxidativo emerge como um elemento central, pois o desequilíbrio entre a produção de radicais livres e os sistemas de defesa antioxidante tem implicações diretas na saúde reprodutiva (MAUCHART et al., 2023). Além do estresse oxidativo, fatores como nutrição, estado geral de saúde, idade e predisposições genéticas, desempenham papéis fundamentais tanto no funcionamento metabólico global quanto na qualidade dos ovócitos e embriões (ANGELIS et al., 2020; HERNÁNDEZ-RUIZ et al., 2022; XIE et al., 2022; ZHENG et al., 2023). Assim, compreender o impacto do estresse oxidativo no contexto da reprodução humana é essencial para elucidar as causas de problemas reprodutivos e desenvolver estratégias que possam mitigar seus efeitos (WARZYCH & LIPINSKA, 2020; AITKEN et al., 2022; SU et al., 2024).

### 2.3.1. Entendendo os radicais livres e o metabolismo energético

Os radicais livres são moléculas químicas definidas por apresentarem pelo menos um elétron desemparelhado em sua camada externa, característica que lhes confere alta reatividade (SIES, 1985; JOMOVA et al., 2024). Em sistemas biológicos, os radicais livres mais comuns, assim como outras moléculas reativas, derivam principalmente do oxigênio, sendo conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ERO), ou do nitrogênio, denominados espécies reativas de nitrogênio (ERN). Entre os exemplos mais conhecidos estão o radical hidroxila ( $\text{OH}^\bullet$ ), o ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), o óxido nítrico (NO), os nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), o radical peroxila ( $\text{ROO}^\bullet$ ), o radical alcoxila ( $\text{RO}^\bullet$ ) e o radical hidroperoxila ( $\text{HO}_2^\bullet$ ) (GARCÍA-ROCHE et al., 2018;AITKEN et al., 2022; JOMOVA et al., 2024).

A literatura científica estabelece que todo organismo vivo produz, de forma constante e contínua, ERO e ERN (SIES, 1985; AGARWAL et al., 2012; GARCÍA-ROCHE et al., 2018; KALTSAS et al., 2023; ONAOLAPO et al., 2023). Essas moléculas são geradas como subprodutos naturais de reações bioquímicas internas, especialmente durante a respiração aeróbica e o metabolismo mitocondrial, bem como por fatores ambientais externos (SIES, 1985; AITKEN et al., 2022; JOMOVA et al., 2024). Portanto, as ERO e as ERN apresentam um papel duplo no organismo, atuando como compostos tanto benéficos quanto tóxicos. Em concentrações reduzidas, essas espécies exercem efeitos positivos, participando de processos celulares fundamentais, como proliferação, diferenciação, migração, apoptose e necrose (CHAUDHARY et al., 2023; JOMOVA et al., 2024). Níveis baixos a intermediários dessas moléculas são indispensáveis para a manutenção da homeostase redox, além de contribuírem para a regulação de fatores-chave de transcrição e outras funções fisiológicas essenciais (CHAUDHARY et al., 2023; ONAOLAPO et al., 2023).

O estresse oxidativo ocorre quando a produção de ERO e outras espécies radicais excede a capacidade dos sistemas antioxidantes de neutralizá-las (SIES, 1985; KALTSAS et al., 2023; ONAOLAPO et al., 2023). Esse desequilíbrio pode resultar de uma produção exacerbada de ERO, ingestão insuficiente de antioxidantes ou aumento na demanda por mecanismos antioxidantes (CHAUDHARY et al., 2023). Quando o estado redox celular é comprometido, os efeitos tóxicos tornam-se evidentes, com a formação de peróxidos e radicais livres que danificam componentes celulares essenciais, como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (CHAUDHARY et al., 2023; KALTSAS et al., 2023).

Os principais locais de produção de ERO em células eucarióticas incluem as mitocôndrias, os peroxissomos e, em organismos fotossintéticos, os cloroplastos, onde as ERO

são geradas durante os processos de respiração e fotossíntese (CHAUDHARY et al., 2023; JOMOVA et al., 2024). Na mitocôndria, a fosforilação oxidativa desempenha um papel central na geração de energia celular, produzindo adenosina trifosfato (ATP) por meio de reações de transferência de elétrons na cadeia transportadora de elétrons (CTE). Esse processo, embora essencial para a manutenção das funções metabólicas, está diretamente relacionado à produção de ERO, que podem atuar tanto na sinalização celular fisiológica quanto em estados patológicos (GARCÍA-ROCHE et al., 2018; CHAUDHARY et al., 2023; JOMOVA et al., 2024).

As reações químicas essenciais, como o ciclo de Krebs, ocorrem na matriz mitocondrial e contribuem para a geração de elétrons que alimentam a CTE. Nesse ciclo, derivados da glicólise, como o piruvato, transferem elétrons para os carreadores NAD<sup>+</sup> e FAD que, quando reduzidos a NADH e FADH<sub>2</sub>, servem como substratos para a fosforilação oxidativa (ONAOLAPO et al., 2023). A CTE, localizada na membrana mitocondrial interna, é composta por quatro complexos enzimáticos que facilitam o transporte de elétrons, acoplando esse processo à produção de ATP e contribuindo para a homeostase energética da célula. No entanto, o desequilíbrio entre a produção de ERO e os mecanismos antioxidantes pode resultar em danos oxidativos às biomoléculas e comprometer a integridade celular (ONAOLAPO et al., 2023).

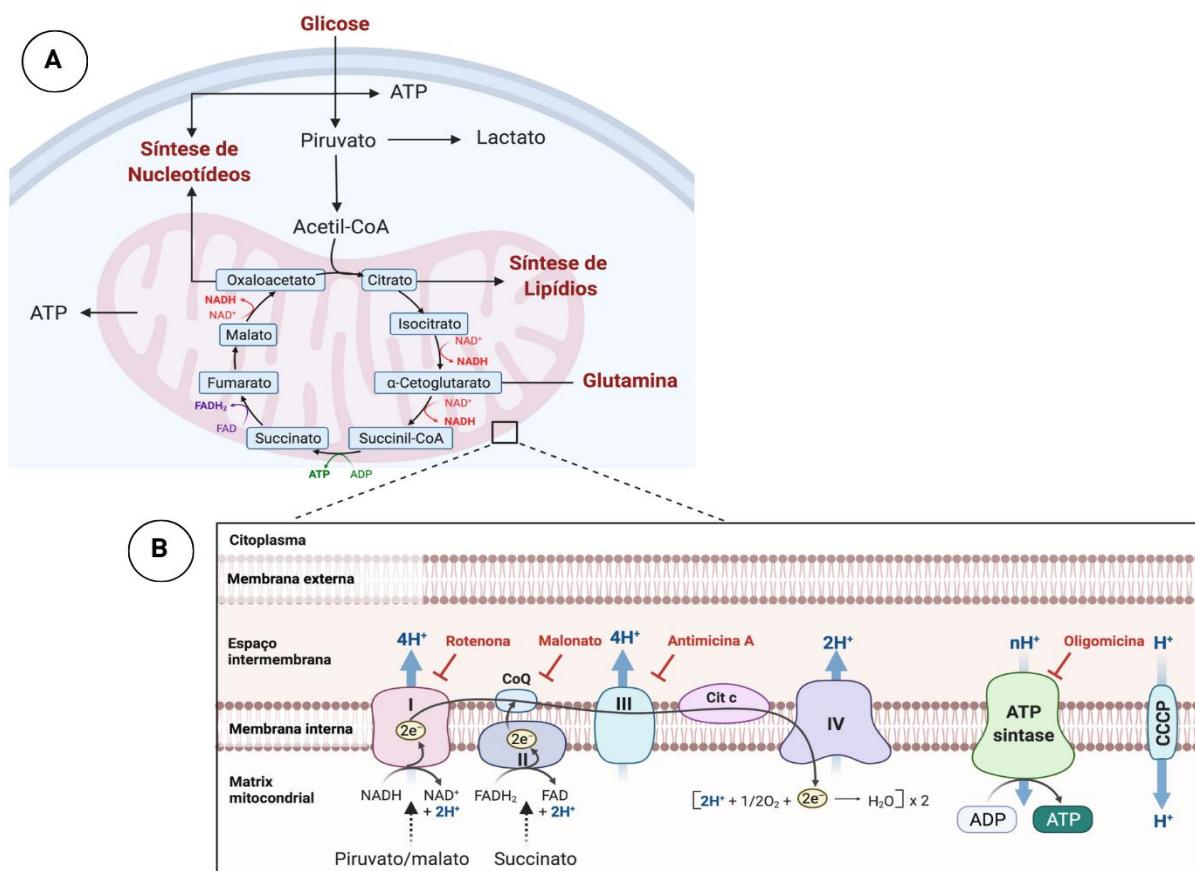
Os processos relacionados à produção de energia celular são cuidadosamente controlados, mas apresentam flexibilidade para se ajustar às condições ambientais da célula (WARZYCH; LIPIŃSKA, 2020). De acordo com os autores, as flutuações metabólicas são influenciadas principalmente pela disponibilidade de enzimas e substratos, além da atividade catalítica (WARZYCH; LIPIŃSKA, 2020). No contexto ovariano, o metabolismo energético do ovócito é sustentado por uma estreita cooperação metabólica com as células do *cumulus*, uma vez que estas apresentam elevada capacidade glicolítica (BAO; YIN & LIU, 2024).

A maior parte da glicose captada no folículo é metabolizada nas células do *cumulus* por meio da glicólise aeróbica e da via das pentoses fosfato, resultando na produção de piruvato, lactato e NADPH (BAO; YIN & LIU, 2024). Isso se deve ao fato de o ovócito apresentar uma capacidade limitada para realizar glicólise, principalmente pela baixa expressão de enzimas-chave dessa via metabólica (BAO; YIN & LIU, 2024). Em contrapartida, as células do *cumulus* possuem alta atividade glicolítica, sendo especializadas na conversão eficiente de glicose em metabólitos intermediários como piruvato e lactato, os quais são transferidos ao ovócito para suprir suas demandas energéticas durante a maturação (BAO; YIN & LIU, 2024). Esses metabólitos são então transferidos para o ovócito por meio de junções comunicantes (*gap*

*junctions*), servindo como principais substratos para a produção de ATP por meio do ciclo do ácido tricarboxílico e da fosforilação oxidativa mitocondrial (BAO; YIN & LIU, 2024).

Embora em menor escala, o ovócito também pode captar glicose diretamente e metabolizá-la por vias específicas, como a via das pentoses fosfato e a via da síntese de hexosaminas (BAO; YIN & LIU, 2024). Ademais, o ovócito obtém ácidos graxos livres do fluido folicular e das células do *cumulus*, sendo capaz de utilizá-los por  $\beta$ -oxidação mitocondrial ou sintetizá-los endogenamente (BAO; YIN & LIU, 2024). Nesse cenário, a quantificação das espécies reativas de oxigênio (EROs) tem se mostrado uma ferramenta valiosa para avaliar a funcionalidade da cadeia transportadora de elétrons (CTE), a eficiência na síntese de ATP e o grau de estresse oxidativo no microambiente folicular (WARZYCH; LIPIŃSKA, 2020).

A Figura 4 detalha a CTE, evidenciando a transferência de elétrons entre os complexos I a IV, o bombeamento de prótons e a geração de ATP. A atuação de inibidores específicos, como rotenona e oligomicina, também é apresentada, demonstrando os efeitos em pontos-chave desse processo metabólico.



**Figura 4.** Metabolismo mitocondrial e cadeia transportadora de elétrons. (A) Representação esquemática do metabolismo mitocondrial destacando o ciclo de Krebs, as principais vias metabólicas envolvidas na síntese de

nucleotídeos, lipídios e utilização de glutamina, bem como a produção de ATP e lactato a partir de glicose. (B) Ilustração detalhada da cadeia transportadora de elétrons (CTE), com a transferência de elétrons através dos complexos I a IV, acoplada ao bombeamento de prótons no espaço intermembrana e a geração de ATP pela ATP sintase. Inibidores como rotenona, malonato, antimicina A, oligomicina e o desacoplador CCCP estão indicados, demonstrando seus efeitos nos diferentes pontos da CTE. Acetil-CoA – Acetil-coenzima A; ATP - Adenosina Trifosfato; ADP - Adenosina Difosfato; NAD<sup>+</sup> - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (forma oxidada); NADH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (forma reduzida); FAD - Flavina Adenina Dinucleotídeo (forma oxidada); FADH<sub>2</sub> - Flavina Adenina Dinucleotídeo (forma reduzida); CoQ - Coenzima Q (Ubiquinona); Cit c - Citocromo c; CCCP - Carbonil Cianeto p-Trifluorometoxifenilhidrazona.

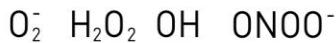
Fonte: Adaptado de Zotta, O'Neill & Yin, 2024.

As ERO também podem ser geradas a partir de fontes exógenas, contribuindo para o desequilíbrio redox celular e danos oxidativos. Entre essas fontes, destacam-se a exposição à radiação ionizante e ultravioleta, frequentemente associadas a terapias anticâncer, que induzem a formação de radicais livres (ONAOLAPO et al., 2023; JOMOVA et al., 2024). Há também o impacto de hábitos de vida prejudiciais, como o tabagismo e o consumo excessivo de álcool, ambos reconhecidos por promoverem a geração de ERO no organismo (GARCÍA-GARCÍA et al., 2020; ONAOLAPO et al., 2023). Além disso, certos medicamentos, especialmente aqueles que contêm metais, como ciclosporina, bleomicina e gentamicina, podem catalisar reações que aumentam a produção desses radicais livres (JOMOVA et al., 2023, 2024). Ressalta-se, ainda, a influência significativa da dieta na formação de EROs, uma vez que diferentes perfis alimentares determinam a natureza dos precursores metabólicos disponíveis para as vias bioenergéticas (JIANG; LIU & LI, 2021). Dietas ricas em carboidratos simples favorecem maior fluxo de elétrons na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, o que pode intensificar o escape de elétrons e, consequentemente, a formação de superóxido. Por outro lado, dietas hiperlipídicas promovem maior oferta de ácidos graxos, que além de alimentarem a  $\beta$ -oxidação mitocondrial, também podem desencadear processos de peroxidação lipídica — outro mecanismo relevante de geração de EROs (JIANG; LIU & LI, 2021).

Esses fatores exógenos, quando combinados ou associados à redução da capacidade antioxidante do organismo, podem exacerbar os danos oxidativos a biomoléculas, contribuindo para o desenvolvimento de doenças crônicas e outras complicações fisiológicas (ONAOLAPO et al., 2023). A Figura 5 apresenta os principais fatores externos que contribuem para o estresse oxidativo, destacando a relação das ERO com condições patológicas do sistema reprodutor feminino.

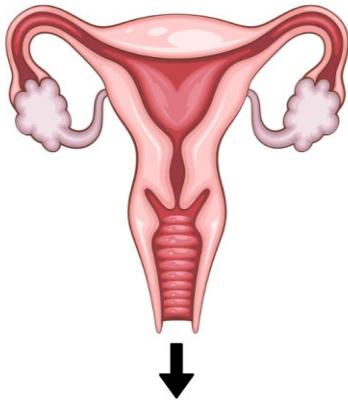
# Estresse oxidativo

## Espécies reativas de oxigênio



### Fatores de estilo de vida

- ↳ Obesidade
- ↳ Tabagismo
- ↳ Álcool
- ↳ Exposição à toxinas
- ↳ Drogas recreativas
- ↳ Desnutrição



### Patologias reprodutivas

- ↳ Endometriose
- ↳ Síndrome dos ovários policísticos
- ↳ Pré-eclâmpsia
- ↳ Declínio na fertilidade
- ↳ Fertilidade inexplicada
- ↳ Parto prematuro

## Infertilidade

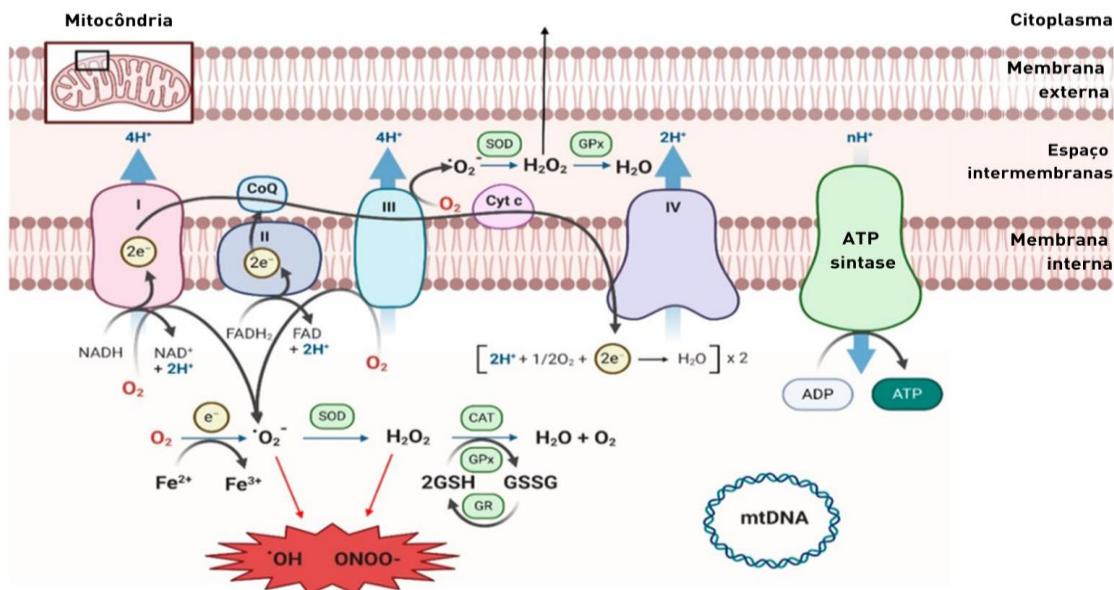
**Figura 5.** Fatores e impactos do estresse oxidativo na reprodução feminina. A imagem destaca os fatores de estilo de vida que contribuem para a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), como obesidade, desnutrição e exposição ambiental, e seus efeitos adversos na saúde reprodutiva. As ERO, incluindo  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\cdot\text{OH}$  e  $\text{ONOO}^-$ , estão associadas a condições reprodutivas, como síndrome do ovário policístico, endometriose, pré-eclâmpsia e infertilidade. Além disso, estão relacionadas a complicações gestacionais, como restrição de crescimento intrauterino, trabalho de parto prematuro e aborto espontâneo, culminando na redução da fertilidade feminina.

Fonte: Adaptado de Agarwal et al., 2012.

### 2.3.2. Os mecanismos de defesa antioxidantes

Os antioxidantes representam a principal linha de defesa do organismo contra os danos provocados pela produção e acúmulo de radicais livres (ONAOLAPO et al., 2023). A exposição de células aos efeitos prejudiciais dos radicais livres desencadeia reações que ativam múltiplos mecanismos de defesa interna, responsáveis pela remoção dessas moléculas reativas e de seus derivados (JOMOVA et al., 2024). Esses mecanismos incluem tanto antioxidantes enzimáticos quanto antioxidantes não enzimáticos, que desempenham papéis complementares na prevenção, reparação e neutralização dos danos oxidativos (ONAOLAPO et al., 2023; JOMOVA et al., 2024). Os antioxidantes enzimáticos desempenham um papel essencial na neutralização e remoção de radicais livres. Essas enzimas convertem produtos oxidativos prejudiciais, como o ânion superóxido, em peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), que é posteriormente transformado em água em um processo de múltiplas etapas (ONAOLAPO et al., 2023). Entre os principais

antioxidantes enzimáticos estão a superóxido dismutase (SOD), a glutationa peroxidase (GPx), a catalase (CAT), a glutationa redutase (GR) e as peroxirredoxinas (Prxs) (DUMANOVIC et al., 2021; ONAOLAPO et al., 2023; YANG et al., 2022; JOMOVA et al., 2024). Essas enzimas trabalham de maneira integrada para exercer suas funções antioxidantas de forma eficiente. Como ilustrado na Figura 6, a superprodução de ERO pode causar danos a biomoléculas, como proteínas, lipídios e DNA mitocondrial (mtDNA), enquanto os mecanismos antioxidantas enzimáticas atuam para mitigar esses danos e manter o equilíbrio redox celular.



**Figura 6.** Mecanismos de produção e controle de espécies reativas de oxigênio na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. Os elétrons gerados a partir de NADH e FADH<sub>2</sub> no ciclo de Krebs são transferidos para a cadeia transportadora de elétrons (CTE), composta pelos complexos I a IV, localizados na membrana interna mitocondrial. Durante esse processo, o bombeamento de prótons (H<sup>+</sup>) cria um gradiente eletroquímico que alimenta a ATP sintase (complexo V), resultando na produção de ATP. Contudo, uma pequena fração dos elétrons pode escapar, gerando ânions superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), que são convertidos em peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pela superóxido dismutase (SOD). O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é então neutralizado em água por enzimas antioxidantas, como a catalase (CAT) e a glutationa peroxidase (GPx), auxiliada pela glutationa redutase (GR). O excesso de ERO pode gerar radicais altamente reativos, como o radical hidroxila (•OH) e o peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), promovendo danos oxidativos a proteínas, lipídios e mtDNA, comprometendo a função mitocondrial.

Fonte: Adaptado de García-García et al., 2020.

Os antioxidantas não enzimáticos desempenham um papel essencial na interrupção das reações em cadeia desencadeadas pelas ERO. Entre os principais exemplos estão a vitamina E, vitamina C, carotenoides, polifenóis vegetais, ferritina, tios, como a glutationa, e a albumina (ONAOLAPO et al., 2023). Esses compostos atuam em diferentes níveis, protegendo

biomoléculas essenciais, além de complementar o sistema antioxidante enzimático (DUMANOVIC et al., 2021; YANG et al., 2022).

A vitamina E, por exemplo, exerce uma função primordial nas membranas celulares, onde previne a formação de radicais livres de oxigênio e protege os lipídios da membrana contra danos oxidativos (JOMOVA et al., 2024). A vitamina C, por sua vez, não apenas neutraliza radicais livres diretamente, mas também regenera a vitamina E em sua forma ativa, prevenindo o estresse oxidativo (CHAUDHARY et al., 2023; JOMOVA et al., 2024).

Os polifenóis vegetais, que incluem compostos bioativos amplamente encontrados em frutas, vegetais e chá, agem de maneira distinta, anulando os radicais livres por meio da doação de um elétron ou átomo de hidrogênio (CHAUDHARY et al., 2023). Esse mecanismo interrompe as reações em cadeia que poderiam causar danos celulares. Dessa forma, os antioxidantes não enzimáticos desempenham um papel complementar ao sistema antioxidante enzimático, contribuindo de forma significativa para a manutenção do equilíbrio redox celular e para a proteção das biomoléculas contra os efeitos prejudiciais do estresse oxidativo.

## **2.4. O papel do estresse oxidativo no sistema reprodutor feminino**

O ovócito, por ser a maior célula dos mamíferos, apresenta um desenvolvimento que exige maior consumo energético em comparação às células somáticas. No entanto, a vantagem é que ele é capaz de armazenar substratos suficientes para produzir a energia necessária no início do desenvolvimento embrionário (WARZYCH & LIPINSKA, 2020; ZAHA et al., 2023). Assim, manter o metabolismo energético do ovócito bem regulado é essencial para garantir o desenvolvimento saudável e a qualidade do embrião.

### *2.4.1. As principais fontes produtoras de ERO no sistema reprodutor feminino*

As células do sistema reprodutor feminino são potenciais fontes de ERO, incluindo as células da granulosa, ovócitos, células do *cumulus* e as células endometriais (KALTSAS et al., 2023; SU et al., 2024). As células da granulosa têm um papel essencial na maturação e no desenvolvimento dos ovócitos, circundando-os e fornecendo o suporte necessário para seu crescimento e ovulação (MALO et al., 2024). Durante esses processos, essas células geram ERO, que participam de mecanismos regulatórios, mas que, em excesso, podem contribuir para o estresse oxidativo.

Os ovócitos, por sua vez, são particularmente vulneráveis ao estresse oxidativo devido à alta densidade de mitocôndrias presentes em seu citoplasma, uma das principais fontes de ERO

(KALTSAS et al., 2023; SU et al., 2024). A produção de ERO nos ovócitos é intensificada durante a meiose, etapa crítica para o desenvolvimento e fertilização. Durante a ovulação, as células do *cumulus*, que formam uma camada protetora ao redor dos ovócitos, também liberam ERO, como  $H_2O_2$  e  $O_2^-$ . Essas moléculas desempenham papéis reguladores importantes na fertilização e nos eventos iniciais de implantação (KALTSAS et al., 2023).

As células endometriais, que revestem o útero, também são fontes significativas de ERO, com níveis variáveis ao longo das diferentes fases do ciclo reprodutivo (GUERRIERO & D'ERRICO, 2022; KALTSAS et al., 2023). As ERO geradas durante a menstruação e a gravidez estão diretamente envolvidas na regulação da receptividade uterina e nos processos de implantação embrionária (KALTSAS et al., 2023). Esses dados destacam a importância de um equilíbrio delicado entre a produção de ERO e os mecanismos antioxidantes no sistema reprodutor feminino. O desequilíbrio entre esses fatores pode comprometer funções fisiológicas essenciais, impactando negativamente a fertilidade e o sucesso reprodutivo.

#### *2.4.2. As funções fisiológicas das ERO no sistema reprodutor feminino*

É importante destacar que, embora o excesso de ERO possa ser prejudicial, essas moléculas desempenham papéis indispensáveis no sistema reprodutivo feminino. As ERO atuam como mediadores em cascatas de sinalização intracelular, funcionando como mensageiros secundários em processos fisiológicos e patológicos relacionados ao trato genital feminino (KALTSAS et al., 2023; MAUCHART et al., 2023; ZAHA et al., 2023).

Essas moléculas estão envolvidas em etapas cruciais da reprodução, como ovulação, maturação de ovócitos, foliculogênese, esteroidogênese ovariana, luteólise e manutenção do corpo lúteo durante a gravidez (KALTSAS et al., 2023; MAUCHART et al., 2023; ZAHA et al., 2023). Ainda segundo esses autores, as ERO desempenham papéis importantes na implantação embrionária, compactação celular, desenvolvimento do blastocisto e na atividade de células germinativas. A atuação coordenada das ERO também é essencial para a formação e funcionalidade do corpo lúteo (KALTSAS et al., 2023).

De acordo com Kaltsas et al. (2023), no início de cada ciclo menstrual, os ovócitos primários começam a crescer, e um deles retoma a meiose I, um processo regulado por uma interação delicada entre ERO e antioxidantes. Segundo o autor, enquanto a elevação nos níveis de ERO é responsável por desencadear a retomada da meiose I, a progressão para a meiose II é controlada principalmente pela ação dos antioxidantes, refletindo assim, a relação complexa e interdependente entre ERO e antioxidantes no microambiente ovariano.

No ciclo menstrual, as ERO também atuam promovendo a remodelação tecidual, a sinalização hormonal e as alterações cíclicas do endométrio (KALTSAS et al., 2023). Nos ovários, essas moléculas regulam processos essenciais, como a produção de hormônios esteroides, a síntese e maturação folicular, a ovulação e a função tubária (AITKEN; BROMFIELD & GIBB, 2022). Portanto, o equilíbrio entre ERO e antioxidantes é crucial para o microambiente do fluido folicular, influenciando diretamente a seleção do folículo dominante (ONAOLAPO et al., 2023).

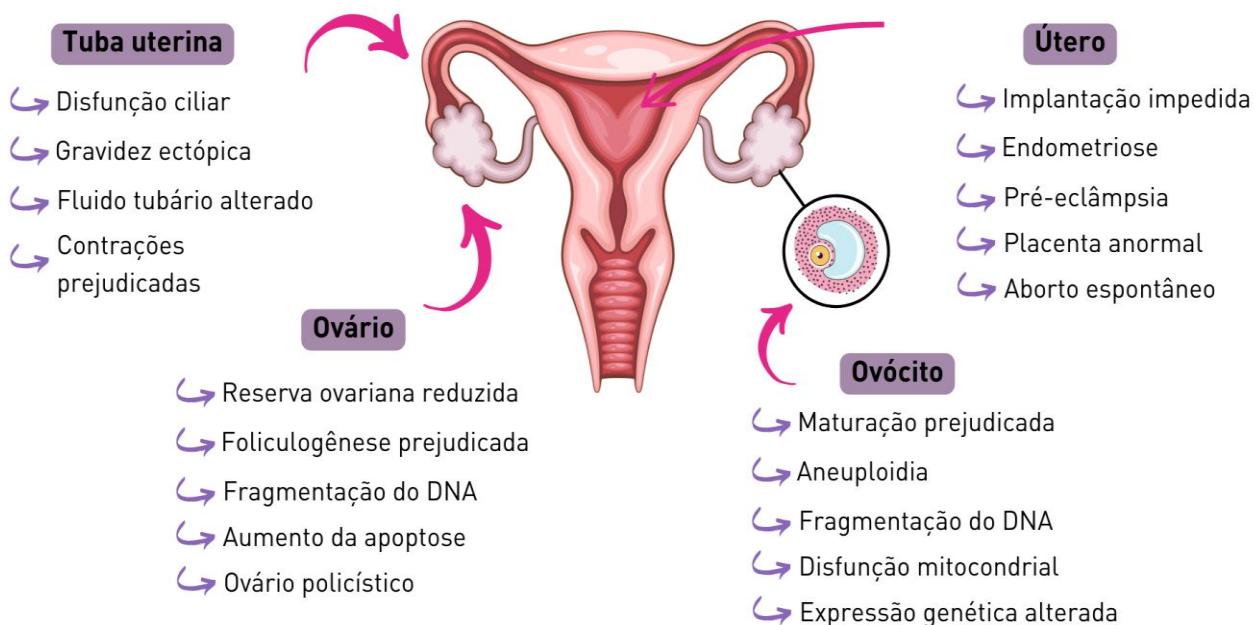
As ERO também desempenham um papel fundamental na degeneração do corpo lúteo, na implantação embrionária e no parto (LU et al., 2018; ONAOLAPO et al., 2023). Além disso, essas moléculas são determinantes na qualidade do ovócito, fertilização, implantação e no desenvolvimento inicial do embrião, regulando o microambiente dos ovários, do fluido folicular e do fluido peritoneal (ONAOLAPO et al., 2023). Conforme revisado por Alhayaza et al., (2020), estudos realizados *in vivo* e *in vitro* demonstraram que as ERO participam ativamente na sinalização do fator de crescimento endotelial vascular, promovendo a angiogênese, e sugerem seu papel essencial na foliculogênese e no desenvolvimento embrionário precoce.

Diante disso, fica evidente que o equilíbrio entre a produção de ERO e a capacidade antioxidante do organismo é fundamental para assegurar o funcionamento adequado do sistema reprodutor feminino. Esse balanço delicado garante que as ERO exerçam suas funções regulatórias sem causar danos oxidativos que possam comprometer os processos reprodutivos.

#### *2.4.3. Mecanismos de danos causados pelo estresse oxidativo no sistema reprodutor feminino*

A elevação nos níveis de ERO tem sido associada à redução da capacidade reprodutiva em mulheres, bem como à infertilidade (ONAOLAPO et al., 2023; KALTSAS et al., 2023; MAUCHART et al., 2023; ZAHA et al., 2023). O estresse oxidativo pode causar danos celulares de diversas maneiras, incluindo peroxidação lipídica, oxidação de proteínas, danos ao DNA e disfunção mitocondrial (AITKEN; BROMFIELD & GIBB, 2022; ZAHA et al., 2023). No sistema reprodutor feminino, esses danos podem levar a consequências significativas, como implantação defeituosa, alterações na função endócrina e danos ao endométrio (KALTSAS et al., 2023). Como ilustrado na Figura 7, os danos causados pelo estresse oxidativo podem impactar diretamente a tuba uterina, o ovário, o útero e os ovócitos, levando a consequências como disfunção ciliar, envelhecimento ovariano acelerado, fragmentação de DNA e falhas na implantação embrionária.

## Efeitos do estresse oxidativo na fertilidade e na saúde feminina



**Figura 7.** Efeitos do estresse oxidativo na fertilidade feminina e na saúde reprodutiva. O estresse oxidativo influencia negativamente diversas partes do sistema reprodutor feminino, incluindo a tuba uterina (disfunção ciliar, risco aumentado de gravidez ectópica), o ovário (reserva ovariana reduzida, envelhecimento acelerado), o útero (falha de implantação, pré-eclâmpsia, aborto espontâneo) e os ovócitos (fragmentação de DNA, aneuploidia e redução na taxa de fertilização). Esses efeitos destacam a complexidade e a amplitude do impacto do desequilíbrio redox na saúde reprodutiva feminina.

Fonte: Adaptado de Kaltsas et al. (2023)

Evidências relatadas na literatura indicam que as células germinativas são significativamente mais vulneráveis aos efeitos deletérios do estresse oxidativo em comparação às células somáticas (ONAOLAPO et al., 2023). Além disso, estudos demonstraram que o estresse oxidativo induzido por radioterapia pode levar à atrofia ovariana, à perda de ovócitos e à redução do estoque de folículos. Esses danos estruturais e funcionais podem desencadear irregularidades menstruais, insuficiência ovariana precoce e, em última instância, infertilidade (AITKEN; BROMFIELD & GIBB, 2022; KALTSAS et al., 2023; MAUCHART et al., 2023; ZAHA et al., 2023).

A peroxidação lipídica, por exemplo, é um processo no qual os lipídios são degradados pelo oxigênio, resultando na formação de peróxidos lipídicos (SU et al., 2019; GUERRIERO & D'ERRICO, 2022). Esse processo afeta diretamente a membrana celular, comprometendo a viabilidade e a função dos ovócitos e folículos. Segundo os autores, a peroxidação lipídica

estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias, exacerbando os danos celulares causados pelo estresse oxidativo. De maneira semelhante, a oxidação de proteínas, que resulta na modificação de resíduos de aminoácidos, interrompe as funções originais das proteínas e reduz sua viabilidade e funcionalidade nos ovócitos e folículos em desenvolvimento (KEHM et al., 2021). Esse processo também promove a liberação de citocinas pró-inflamatórias, contribuindo para um ciclo contínuo de danos oxidativos.

No nível do DNA, o estresse oxidativo provoca alterações que resultam em mutações e disfunções, incluindo quebra de fita simples e dupla e alterações nucleotídicas, afetando negativamente a viabilidade e a função dos ovócitos (GUERRIERO & D'ERRICO, 2022; KALTSAS et al., 2023). A disfunção mitocondrial também desempenha um papel importante nesse processo. Quando a atividade mitocondrial é prejudicada, a produção de energia é reduzida, e os níveis de ERO são intensificados, comprometendo ainda mais a viabilidade dos gametas femininos (ONAOLAPO et al., 2023; KALTSAS et al., 2023).

A ovulação é um processo biologicamente complexo que envolve uma resposta inflamatória local, caracterizada pelo aumento significativo na produção de ERO (KEHM et al., 2021). Embora os níveis elevados de ERO desempenhem um papel crucial no rompimento do folículo, eles também podem causar danos às células da granulosa que estão passando pelo processo de luteinização (ONAOLAPO et al., 2023; MAUCHART et al., 2023). Evidências científicas sugerem que agentes anti-inflamatórios podem inibir a ovulação, evidenciando a estreita relação entre os mecanismos inflamatórios e ovulatórios (AITKEN; BROMFIELD & GIBB, 2022; ZAHA et al., 2023). Nesse contexto, macrófagos e neutrófilos, células imunológicas frequentemente presentes nos ovários, parecem ser as principais fontes de ERO durante o processo ovulatório, visto que contribuem substancialmente para o aumento na produção de radicais livres (ONAOLAPO et al., 2023).

A influência das ERO na fecundação e implantação é dupla e crítica: em níveis fisiológicos, essas moléculas atuam como sinalizadores que promovem processos fundamentais, como capacitação espermática, reação acrossômica e fusão gamética, sendo essenciais para a formação adequada do pronúcleo e a segmentação inicial (AITKEN; BROMFIELD & GIBB, 2022; ZAHA et al., 2023). Por outro lado, concentrações excessivas de ERO podem comprometer a capacidade fertilizadora, induzindo a polimerização da zona pelúcida e enfraquecendo a habilidade de implantação do embrião (ONAOLAPO et al., 2023). Além disso, durante o estágio pré-implantacional, ERO são geradas naturalmente como subprodutos da fosforilação oxidativa, e níveis adequados são necessários para divisões

celulares iniciais. Contudo, seu acúmulo patológico pode resultar em danos ao DNA, apoptose embrionária e queda na viabilidade, reduzindo diretamente as taxas de implantação (AITKEN; BROMFIELD & GIBB, 2022; ONAOLAPO et al., 2023; ZAHA et al., 2023).

O desenvolvimento embrionário, um processo altamente complexo, é particularmente vulnerável aos efeitos do estresse oxidativo (ONAOLAPO et al., 2023). Esse desequilíbrio metabólico pode alterar a expressão genética do embrião, interrompendo o desenvolvimento embrionário e levando a anormalidades cromossômicas (ALMANSA-ORDONEZ et al., 2020). Além disso, estudos associam a presença de estresse oxidativo à redução na produção de ATP e ao desenvolvimento atrofiado do embrião, comprometendo sua viabilidade e progressão (MAY-PANLOUP et al., 2021; ONAOLAPO et al., 2023). Conforme apontado por esses autores, o estresse oxidativo também pode tornar as células embrionárias mais suscetíveis à apoptose, o que agrava ainda mais o desenvolvimento anômalo do embrião. Esses achados reforçam a importância de mecanismos antioxidantes adequados para preservar a integridade celular e garantir um desenvolvimento embrionário saudável.

A implantação embrionária, uma etapa crucial para o estabelecimento de uma gravidez saudável, pode ser significativamente prejudicada pelo estresse oxidativo, conforme descrito por Mukherjee et al., (2021). Em seu estudo, Mukherjee et al. (2021) destacam que esse impacto negativo ocorre por meio de diversos mecanismos, incluindo a indução de inflamação endometrial, a redução da capacidade de invasão do trofoblasto e alterações na expressão genética. A invasão do trofoblasto, essencial para o sucesso da implantação, é particularmente sensível aos efeitos do estresse oxidativo. De forma complementar, Zhang & Wu (2023) ressaltam que a inflamação endometrial induzida por ERO compromete a receptividade uterina e a capacidade do endométrio de nutrir o embrião, dificultando o processo de implantação.

Em resumo, o estresse oxidativo exerce um impacto significativo no sistema reprodutor feminino, comprometendo processos fundamentais, como a qualidade do ovócito, o desenvolvimento embrionário e a implantação. Os danos causados pelas ERO ao DNA, proteínas e lipídios, associados à disfunção mitocondrial e à inflamação, destacam a complexidade e a vulnerabilidade do ambiente reprodutivo frente ao desequilíbrio redox. A compreensão desses mecanismos é essencial para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que minimizem os efeitos deletérios do estresse oxidativo e promovam a saúde reprodutiva feminina.

## 2.5. Fatores relacionados ao estresse oxidativo que afetam a fertilidade feminina

### 2.5.1. Idade

Nas últimas décadas, tem-se registrado um aumento expressivo no número de mulheres que optam por adiar a maternidade, o que resultou em uma elevação significativa da idade média para a primeira gravidez (DELBAERE; VERBIEST & TYDÉN, 2020; YE; BAKER & TONG, 2023; ZHANG & WU, 2023). Esse adiamento pode ser explicado por fatores como maior investimento em educação, desenvolvimento de carreiras profissionais, dificuldades em encontrar o parceiro ideal e maior acesso a métodos contraceptivos (ZHANG & WU, 2023; YE; BAKER & TONG, 2023). Como consequência, observa-se um aumento no número de mulheres enfrentando dificuldades para engravidar, bem como uma maior prevalência de complicações durante a gravidez e o parto (ZHAO et al., 2019).

A infertilidade está se tornando cada vez mais associada à idade materna avançada, que é amplamente reconhecida como um fator de risco para os resultados reprodutivos (DU FOSSÉ et al., 2020; ZHANG & WU, 2023). Tipicamente definida como 35 anos ou mais, a idade materna avançada tem se consolidado como um aspecto central no aconselhamento pré-concepcional, sendo cada vez mais discutida tanto entre profissionais de saúde quanto na população em geral (YE; BAKER & TONG, 2023).

Do ponto de vista biológico, as mulheres nascem com uma quantidade finita e pré-determinada de ovócitos armazenados nos ovários. O número máximo de ovócitos é alcançado ainda durante o desenvolvimento fetal, mas reduz-se para alguns milhões no momento do nascimento (SCHUTZ & BATALHA, 2024). Esse declínio continua progressivamente ao longo da vida: cerca de 500.000 ovócitos estão presentes na puberdade e apenas 25.000 aos 37 anos, refletindo o envelhecimento natural do estoque ovariano (CHUA et al., 2020). Além da redução quantitativa, os ovócitos remanescentes apresentam qualidade diminuída, com maior predisposição a aberrações cromossômicas e erros meióticos, fatores que impactam diretamente a fertilidade feminina (ZHAO et al., 2019; CHUA et al., 2020; SESHADRI et al., 2021; KALTSAS et al., 2023).

A revisão conduzida por Ye; Baker & Tong (2023) destacou ainda que, com o avanço da idade, o sistema endócrino sofre alterações significativas, acompanhadas por um declínio gradual de diversas funções fisiológicas. Segundo os autores, a idade afeta diretamente o padrão de secreção hormonal regulado pelo eixo hipotálamo-hipófise e altera a sensibilidade desse eixo ao feedback negativo exercido pelos hormônios terminais. Além disso, processos fundamentais,

como o metabolismo ósseo, a homeostase da glicose e o equilíbrio do cálcio, também são prejudicados pelo envelhecimento.

Essas mudanças endócrinas e biológicas afetam diretamente os tratamentos de reprodução assistida. Em uma análise conduzida por Havrljenko et al., (2023) foi avaliado o número ideal de ovócitos em metáfase II para maximizar as taxas de nascimentos vivos em mulheres com idade avançada. Os resultados sugerem que, para mulheres com mais de 40 anos, a recuperação de pelo menos nove ovócitos em meiose II durante a FIV aumenta as chances de sucesso. No entanto, a taxa de sucesso diminui drasticamente após os 42 anos.

Na revisão de Delbaere; Verbiest & Tydén (2020), foi evidenciado o impacto do envelhecimento na fertilidade, mostrando que a probabilidade de concepção diminui com o avanço da idade. Mulheres com menos de 30 anos têm cerca de 85% de chance de engravidar em um ano. Essa probabilidade cai para 75% aos 30 anos, 66% aos 35 anos e apenas 44% aos 40 anos. Além disso, os autores evidenciam que as mulheres mais velhas apresentam maior risco de aborto espontâneo em comparação às mulheres mais jovens.

Conforme Terao et al., (2019) a diminuição da qualidade da reserva ovariana está associada a dois fatores principais: o aumento do dano oxidativo nos ovócitos e a disfunção dos sistemas de defesa antioxidante. Os autores demonstraram que, com o avanço da idade, ocorre uma redução na eficiência dos sistemas antioxidantes endógenos, incluindo a GSH, CAT e SOD, o que compromete a neutralização eficaz de ERO. Paralelamente, há um aumento na produção de ERO, impulsionado por alterações no metabolismo mitocondrial, que se torna menos eficiente com o envelhecimento.

Além disso, Seshadri et al., (2021) destacam que fatores cumulativos, como o dano oxidativo ao mtDNA, à membrana lipídica e às proteínas celulares, amplificam significativamente o impacto do estresse oxidativo nas células ovarianas. Esse dano é especialmente preocupante nos ovócitos, que permanecem no estágio meiótico por décadas, tornando-os particularmente vulneráveis ao acúmulo de lesões oxidativas. O estudo de Seshadri também revelou que o microambiente folicular em mulheres mais velhas apresenta níveis elevados de ERO e uma capacidade antioxidante reduzida. Esse desequilíbrio compromete a qualidade dos ovócitos, bem como o processo de maturação folicular, refletindo diretamente na fertilidade feminina.

Em resumo, a idade materna avançada apresenta impactos significativos na fertilidade, influenciando a qualidade e quantidade dos ovócitos, a funcionalidade do sistema endócrino e os resultados de técnicas de reprodução assistida. Além disso, os desafios impostos pelo

envelhecimento reprodutivo reforçam a importância de estratégias integradas de conscientização, aconselhamento pré-concepcional e intervenções clínicas que possam mitigar os riscos associados à maternidade tardia, promovendo melhores desfechos reprodutivos e qualidade de vida para as pacientes.

#### *2.5.2. Peso corporal*

A obesidade é reconhecida pela OMS como um dos mais graves problemas de saúde pública global. A projeção para o ano de 2025 indica que cerca de 2,3 bilhões de adultos estarão com sobrepeso, sendo aproximadamente 700 milhões classificados como obesos — condição definida por um Índice de Massa Corporal (IMC) igual ou superior a 30 kg/m<sup>2</sup>. (FAO, 2024).

A influência da obesidade na infertilidade feminina é um tópico de preocupação significativa na medicina reprodutiva (MARINELLI et al., 2022; ENNAB & ATIOMO, 2023; ZHENG et al., 2023). Alterações nos níveis de adipocinas, como a redução da adiponectina e o aumento da leptina, desempenham um papel central na patogênese da infertilidade associada à obesidade. As adipocinas são peptídeos bioativos produzidos pelo tecido adiposo que regulam processos metabólicos e inflamatórios. A leptina, uma adipocina específica, atua no controle do apetite e no equilíbrio energético, mas, em níveis elevados, como ocorre na obesidade, pode desregular a função ovariana, interferir no equilíbrio hormonal necessário para a ovulação e comprometer a receptividade endometrial (ZHENG et al., 2023).

O eixo hipotálamo-hipófise-ovário desempenha um papel central na regulação da fisiologia reprodutiva feminina. No entanto, a obesidade compromete esse sistema harmonioso, principalmente por meio de alterações nos níveis de leptina e outras adipocinas, que desregulam o funcionamento do eixo (ZHENG et al., 2023). Quando em níveis elevados, como os observados na obesidade, a leptina interfere diretamente na secreção rítmica do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) pelo hipotálamo. Essa interferência prejudica a liberação pulsátil do GnRH, um mecanismo essencial para a regulação do eixo reprodutivo, e resulta em padrões alterados de secreção do LH e do FSH, que são cruciais para o ciclo menstrual e a ovulação (CARSON & KALLEN, 2021; MARINELLI et al., 2022; ENNAB & ATIOMO, 2023; FIELDER; NICKKKHO-AMIRY & SEIF, 2023).

Por outro lado, a diminuição da adiponectina, uma adipocina com propriedades anti-inflamatórias e sensibilizadores à insulina, também desempenha um papel crítico em indivíduos obesos. Sua redução contribui significativamente para a resistência à insulina, que, por sua vez, impacta ainda mais o eixo hormonal ao interferir na secreção e ação dessas moléculas (ZHENG

et al., 2023). As consequências desse desequilíbrio hormonal são abrangentes, variando desde ciclos anovulatórios e períodos menstruais irregulares até um quadro de fertilidade desafiador. Além de reduzir as chances de concepção natural, esse cenário complexo apresenta obstáculos adicionais para tratamentos de reprodução assistida, evidenciando a necessidade de intervenções específicas voltadas à regulação metabólica e ao equilíbrio hormonal em pacientes obesas (CARSON & KALLEN, 2021; MARINELLI et al., 2022; ENNAB & ATIOMA, 2023; FIELDER; AMIRY & SEIF, 2023).

A revisão conduzida por Amiri & Tehrani (2020) destacou que a desregulação hormonal dos esteroides sexuais em mulheres obesas pode impactar significativamente os resultados da FIV. Essa desregulação está associada a períodos mais longos de estimulação folicular, maior assincronia no desenvolvimento dos folículos, maior probabilidade de cancelamento do ciclo e menores taxas de nascidos vivos, quando comparadas a pacientes inférteis com peso normal. Ainda, segundo os autores, cada aumento de uma unidade no IMC reduz a probabilidade de sucesso na FIV em aproximadamente 2,2% a 4,3%. Além disso, as taxas de implantação em mulheres obesas também são consideravelmente menores do que naquelas com peso normal, evidenciando o impacto negativo do excesso de peso nos desfechos reprodutivos.

Nesse contexto, torna-se imprescindível adotar mudanças no estilo de vida, com ênfase nos hábitos alimentares. As mudanças alimentares recomendadas pela OMS incluem medidas voltadas para o equilíbrio da ingestão de energia — ou seja, da quantidade total de calorias consumidas — e para a promoção de uma alimentação saudável. Essa ingestão calórica é determinada pelos macronutrientes presentes na dieta, como carboidratos, proteínas e gorduras, que são as principais fontes de energia utilizadas pelo organismo. Entre as principais orientações estão a limitação do consumo de gorduras saturadas e trans, com a substituição por gorduras insaturadas, além do aumento da ingestão de frutas, vegetais e fibras alimentares. A OMS também recomenda a redução do consumo de açúcares e sal, visando prevenir doenças metabólicas e cardiovasculares (FAO, 2024). Essas diretrizes são especialmente relevantes diante do aumento global dos índices de obesidade e distúrbios metabólicos.

Adicionalmente, a suplementação com antioxidantes e outras substâncias vem ganhando espaço na comunidade científica como uma abordagem terapêutica adjuvante. Estudos indicam que compostos antioxidantes, como vitaminas C e E, polifenóis e ácidos graxos ômega-3, podem oferecer benefícios, especialmente para indivíduos com condições metabólicas, como diabetes e obesidade (ZHENG et al., 2023). Essas substâncias ajudam a combater o estresse oxidativo, reduzir inflamações sistêmicas e melhorar marcadores metabólicos,

complementando as mudanças alimentares recomendadas para a promoção de uma saúde global mais equilibrada (DUMANOVIC et al., 2021; YANG et al., 2022; CHAUDHARY et al., 2023; JOMOVA et al., 2024).

### *2.5.3. Estilo de vida*

O impacto de um estilo de vida não saudável no bem-estar humano tem sido amplamente reconhecido. Hábitos como tabagismo, consumo de álcool e uso de drogas lícitas ou ilícitas vêm sendo identificados como fatores de risco para diversas doenças (ANGELIS et al., 2020; KALTSAS et al., 2023). Nesse contexto, a infertilidade feminina pode ser influenciada por diversos fatores, principalmente por meio do aumento do estresse oxidativo e do comprometimento da qualidade dos ovócitos e do ambiente folicular (KALTSAS et al., 2023).

Apesar das inúmeras evidências científicas sobre os danos causados pelo tabagismo, por exemplo, e das campanhas antitabagismo conduzidas por profissionais de saúde, estima-se que, mundialmente, cerca de 175 milhões de mulheres com 15 anos ou mais ainda fumem, seja de forma regular ou ocasional (DHAGE et al., 2024). Está estabelecido que a fumaça do cigarro é composta por cerca de 5.000 classes químicas, incluindo hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, metais pesados e alcaloides, muitas das quais apresentam toxicidade reprodutiva. Essa mistura complexa de compostos afeta diferentes componentes do sistema reprodutivo feminino, resultando em impactos combinados e significativos (CUI & WANG, 2024; DHAGE et al., 2024).

Um estudo recente de Cui & Wang (2024) elucidou que o tabagismo pode reduzir a reserva ovariana em cerca de 20%, interferindo diretamente na foliculogênese por meio de processos como aumento de apoptose, autofagia e danos ao DNA. Além disso, o tabaco compromete as conexões entre os ovócitos e as células da granulosa, resultando na morte de folículos ovarianos. De acordo com os autores, o tecido ovariano de mulheres fumantes frequentemente apresenta níveis elevados de ERO e peroxidação lipídica, contribuindo para a disfunção dos ovócitos e redução no potencial de fertilização.

O estudo conduzido por Kaltsas et al. (2023) demonstrou que o consumo de álcool, uma droga lícita amplamente utilizada, também está associado a efeitos adversos na saúde reprodutiva feminina. Durante o metabolismo do álcool, são gerados metabólitos como radicais acetil e metil, responsáveis pela formação de ERO. Esses radicais causam peroxidação lipídica, reduzem os níveis de antioxidantes como a GSH e a SOD, e aumentam o estresse oxidativo no plasma materno. Os autores afirmam que quando consumido durante a gravidez, o álcool pode

levar à restrição de crescimento intrauterino, parto prematuro, baixo peso ao nascer, maior risco de doenças congênitas, aborto espontâneo e prematuridade.

Com relação ao consumo de drogas psicoativas, como maconha e cocaína, Hamed et al., (2010) evidenciaram que essas substâncias induzem toxicidade ao promover danos oxidativos nos órgãos reprodutivos, inflamação e apoptose celular. Além disso, essas drogas podem suprimir o eixo hipotálamo-hipófise, reduzindo a secreção de hormônios sexuais, prejudicando a gametogênese e afetando a qualidade dos gametas. Especificamente, o tetrahidrocannabinol (THC), principal composto ativo da maconha, e seus metabólitos, assim como a nicotina, geram estresse oxidativo e radicais peroxil lipídicos. Esses efeitos estão associados ao esgotamento das reservas antioxidantas, danos ao DNA e apoptose celular. Kaltsas et al. (2023) destacam que o THC pode impactar negativamente a maturação dos ovócitos, reduzir as chances de atingir a metáfase II e comprometer o desenvolvimento embrionário inicial, com aumento nos níveis de apoptose em blastocistos derivados.

Diante desses efeitos prejudiciais das drogas sobre a função reprodutiva, cresce o interesse por estratégias que atuem de forma inversa — protegendo ou restaurando a fertilidade. Nesse contexto, a atividade física tem se tornado um recurso promissor no tratamento da infertilidade, devido aos seus efeitos benéficos nos processos biológicos e fisiológicos envolvidos na reprodução (XIE et al., 2022; BRINSON et al., 2023). A OMS define a atividade física como qualquer movimento físico produzido pelo músculo esquelético que consome energia (BULL et al., 2020). Além disso, a OMS recomenda a prática de pelo menos 150 minutos de atividade física de intensidade moderada a vigorosa, por semana, para reduzir o risco de doenças relacionadas à infertilidade.

Os benefícios da atividade física na fertilidade feminina estão associados a mecanismos que fortalecem as defesas antioxidantas e reduzem a inflamação em fluidos corporais, órgãos e tecidos reprodutivos (XIE et al., 2022). Conforme a revisão realizada por XIE et al. (2022), ensaios clínicos randomizados têm relatado efeitos terapêuticos dessa prática na infertilidade, principalmente por meio de melhorias sistêmicas, como a melhora da função imunológica, maior sensibilidade à insulina e regulação dos hormônios sexuais circulantes. Brinson et al. (2023) destacam que, entre mulheres, o aumento da atividade física e a redução do comportamento sedentário estão associados à manutenção do peso corporal e ao equilíbrio hormonal, fatores essenciais para o aumento das chances de concepção.

No entanto, é importante observar que altos níveis de atividade física podem ter efeitos negativos na fertilidade, como a inibição da ovulação, o que reduz a probabilidade de

concepção. Embora os seus efeitos benéficos na fertilidade sejam evidentes, o impacto geral da prática de atividade física em populações diversas ainda não está completamente esclarecido, exigindo mais estudos para entender os limites ideais de intensidade e frequência (MUSSAWAR et al., 2023; ZHANG et al., 2024).

#### *2.5.4. Uso de tecnologias de reprodução assistida (TRA) como alternativa para infertilidade*

A utilização de tecnologias de reprodução assistida (TRA) teve início em 1978 e, desde então, tem se expandido amplamente em todo o mundo, transformando o tratamento da infertilidade (YANG; ZHU & JIN, 2020). De acordo com os autores, até 2020, mais de oito milhões de bebês foram concebidos por meio dessas tecnologias, com uma taxa média anual de crescimento de 9,1%. No entanto, apesar desse progresso, evidências sugerem que esses procedimentos podem aumentar os níveis de estresse oxidativo, afetando negativamente a qualidade ovocitária e os resultados reprodutivos (YANG; ZHU & JIN, 2020; MAUCHART et al., 2023; HENRY & NISOLLE, 2024).

Entre as principais abordagens atualmente utilizadas, destacam-se a inseminação intrauterina, a FIV e a ICSI. Esses procedimentos são frequentemente acompanhados de estratégias complementares, como hiper estimulação ovariana controlada, recuperação de ovócitos, cultivo e transferência de embriões, com ou sem diagnóstico genético ou triagem pré-implantação. Além disso, técnicas avançadas como congelação e descongelamento de gametas e embriões, recuperação cirúrgica de espermatozoides e eclosão assistida têm ampliado significativamente o alcance e a eficácia das TRA (YANG; ZHU & JIN, 2020; HENRY & NISOLLE, 2024).

O estudo conduzido por Mauchart et al. (2023) destacou que, durante o desenvolvimento *in vitro*, vários fatores podem ser responsáveis pelo aumento da geração de ERO no microambiente dos ovócitos, levando a resultados abaixo do ideal. Entre os principais fatores identificados estão a ausência de antioxidantes não enzimáticos no meio de cultura, as diferenças na concentração de oxigênio entre as condições *in vivo* e *in vitro*, a exposição à luz visível e a presença de aditivos no meio de cultura. Esses fatores, em conjunto, podem intensificar o estresse oxidativo, comprometendo a viabilidade dos ovócitos e o desenvolvimento embrionário.

Além disso, os autores investigaram as diferenças na origem celular das ERO entre a FIV convencional e a ICSI. Na FIV convencional, as células do *cumulus*, os ovócitos presentes em cada placa e os espermatozoides utilizados durante a co-incubação contribuem de forma

significativa para a produção de ERO. Em contraste, no procedimento de ICSI, as células do *cumulus* são removidas previamente, eliminando essa fonte potencial de ERO antes do início da incubação. Assim, com base nesses achados, Mauchart et al. (2023) sugerem que, em casos de patologias clínicas como síndrome dos ovários policísticos e endometriose, que estão frequentemente associadas a níveis elevados de ERO no microambiente ovocitário, a ICSI pode ser a abordagem mais indicada. A remoção das células do *cumulus* minimiza a geração adicional de ERO, reduzindo o impacto do estresse oxidativo sobre os ovócitos e criando condições mais favoráveis para a fertilização e o desenvolvimento embrionário.

A revisão de Kushnir; Smith & Adashi, (2022) sobre os desafios atuais e as perspectivas futuras na reprodução humana destacou o impacto negativo das TRA no equilíbrio redox das pacientes. Segundo os autores, o processo de tratamento da infertilidade é altamente complexo, envolvendo diversas etapas que podem se prolongar por vários meses. Durante esse período, as pacientes enfrentam desafios significativos, incluindo sobrecargas financeiras, físicas e psicológicas, que frequentemente levam à interrupção do tratamento antes da obtenção de uma gravidez. Além disso, essa carga emocional e fisiológica está diretamente associada ao aumento na produção de radicais livres, intensificando o estresse oxidativo. Esse desequilíbrio no estado redox pode comprometer não apenas a qualidade dos gametas, mas também as taxas de sucesso do tratamento, reforçando a necessidade de estratégias para mitigar esses efeitos e melhorar os desfechos clínicos.

O estudo de Zaha et al., (2023) expandiu o conhecimento sobre o impacto do estresse oxidativo em técnicas de reprodução assistida, investigando os marcadores de estresse oxidativo no fluido folicular e no soro de mulheres submetidas à FIV. Os resultados destacaram que níveis elevados de malondialdeído (MDA), um marcador de peroxidação lipídica, estavam diretamente associados à redução na qualidade dos ovócitos e a taxas mais baixas de fertilização. Esses achados destacam a importância de garantir um ambiente folicular saudável e equilibrado, com níveis adequados de antioxidantes, como um fator crucial para otimizar os resultados em procedimentos de reprodução assistida. Além disso, o monitoramento contínuo de marcadores de estresse oxidativo revela-se uma ferramenta valiosa para avaliar as condições do microambiente reprodutivo, permitindo ajustes terapêuticos precisos e personalizados. Essa abordagem pode contribuir significativamente para aumentar as taxas de sucesso dos tratamentos, melhorando tanto a qualidade ovocitária quanto os desfechos embrionários.

## 2.6. Os biomarcadores do estresse oxidativo e suas influências na reprodução assistida

O estresse oxidativo é caracterizado por um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a capacidade antioxidante do organismo, resultando em danos a biomoléculas essenciais, como mencionado anteriormente. Esse estado de desequilíbrio tem implicações significativas na saúde, incluindo impactos na fertilidade feminina, ao comprometer diversos processos fisiológicos.

A avaliação do estresse oxidativo é realizada por meio de biomarcadores específicos que fornecem informações detalhadas sobre os níveis de peroxidação lipídica, integridade do DNA e eficácia dos sistemas antioxidantes. Esses biomarcadores não apenas refletem o estado redox do organismo, mas também auxiliam na identificação de mecanismos subjacentes a patologias relacionadas ao estresse oxidativo.

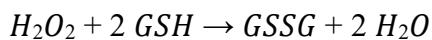
Neste contexto, os biomarcadores discutidos a seguir são fundamentais para a detecção e quantificação do estresse oxidativo. Cada um deles é analisado com base em sua localização celular, função, mecanismo de ação e impacto na fertilidade feminina, contribuindo para a compreensão das interações entre o estresse oxidativo e a saúde reprodutiva. Além disso, essas informações são cruciais para o desenvolvimento de abordagens diagnósticas e terapêuticas mais eficazes, visando otimizar os desfechos em mulheres afetadas por condições associadas ao estresse oxidativo.

### 2.6.1. Glutationa (GSH)

A glutationa (GSH) é um tripeptídeo formado por glutamato, cisteína e glicina, amplamente encontrado nas células eucarióticas. Apesar de sua síntese exclusiva no citosol, a GSH é compartimentada em diferentes organelas, predominantemente em núcleos, retículo endoplasmático e mitocôndrias, sendo considerada o tiol de baixo peso molecular mais abundante no organismo (CHEN; YANG & ZHANG, 2023). O grupo tiol ativo (-SH) presente na GSH é crucial para suas propriedades funcionais, permitindo sua atuação como cofator na ativação de diversas enzimas e desempenhando um papel central em processos de detoxificação e defesa antioxidante (HUANG et al., 2023). Esse grupo funcional é altamente reativo, possibilitando à GSH neutralizar ERO, regenerar outros antioxidantes e se ligar a compostos tóxicos, como metais pesados e radicais livres, promovendo a proteção celular e a manutenção da homeostase redox (CHEN; YANG & ZHANG, 2023; HUANG et al., 2023).

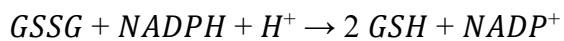
A glutationa existe predominantemente na sua forma reduzida (GSH), que atua como antioxidante ativo. Durante a neutralização das ERO, duas moléculas de GSH são convertidas

em sua forma oxidada (GSSG) por meio da formação de uma ponte dissulfeto (HAMAD et al., 2021;AITKEN, 2022). Apesar de serem termodinamicamente favoráveis, muitas reações entre a glutationa reduzida (GSH) e moléculas oxidantes apresentam velocidades extremamente reduzidas (AVERILL-BATES, 2023). Por esse motivo, grande parte da função antioxidante da GSH depende da ação catalítica das enzimas glutationa peroxidases (GPXs). As GPXs são peroxidases que catalisam a redução de hidroperóxidos lipídicos ou do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), convertendo-os em seus respectivos álcoois ou em água, protegendo, assim, as células contra os danos oxidativos (AVERILL-BATES, 2023). A equação a seguir mostra a redução do peróxido de hidrogênio em água:



Em condições normais, o organismo mantém altos níveis de GSH em relação a GSSG, garantindo a eficácia do sistema antioxidante (AVERILL-BATES, 2023). Porém, reduções nos níveis de GSH ou um aumento significativo na relação GSSG/GSH estão associados a uma maior suscetibilidade ao estresse oxidativo, comprometendo processos fundamentais como a maturação ovocitária, a fertilização e o desenvolvimento embrionário (HAMAD et al., 2021). A soma das formas reduzida e oxidada, conhecida como glutationa total (tGSH), reflete a capacidade antioxidante global da célula. Assim, um aumento na relação GSSG/GSH é amplamente utilizado como indicador de estresse oxidativo, sinalizando desequilíbrios no estado redox celular e suas implicações na saúde (HAMAD et al., 2021; AITKEN, 2022; CHEN, YANG E ZHANG, 2023; HUANG et al., 2023).

As enzimas que catalisam as reações de troca de elétrons entre glutationa e diferentes alvos são glutaredoxinas, glutationa redutase, glutationa peroxidases e glutationa transferases. A glutationa redutase (GR) desempenha um papel crucial na manutenção da GSH em sua forma reduzida, reconvertendo a GSSG em GSH por meio da utilização do NADPH como doador de elétrons (LA ROSA; GARCÍA-RUIZ & FERNÁNDEZ-CHECA, 2012; AVERILL-BATES, 2023). Esse processo é essencial para preservar a capacidade antioxidante das células. Paralelamente, a glutationa peroxidase catalisa a redução de peróxidos, utilizando o GSH como substrato para neutralizar essas espécies reativas. Essas funções interligadas tornam a GSH uma peça fundamental no sistema antioxidante e de defesa celular (LA ROSA; GARCÍA-RUIZ & FERNÁNDEZ-CHECA, 2012). A equação a seguir mostra a reação de síntese do GSH:



No sistema reprodutivo feminino, a glutationa é especialmente relevante. No microambiente folicular, a GSH protege o ovócito contra os danos causados pelo estresse oxidativo, desempenhando um papel crucial na preservação da qualidade ovocitária (HAMAD et al., 2021; AITKEN et al., 2022). Estudos demonstram que altos níveis de GSH no fluido folicular estão associados a melhores taxas de fertilização e desenvolvimento embrionário. Por outro lado, um aumento na razão GSSG/GSH é relacionado à redução da qualidade dos ovócitos e ao comprometimento da competência reprodutiva (BABAYEV & DUNCAN, 2022; CHEN; YANG & ZHANG, 2023; HUANG et al., 2023). Assim, a glutationa não apenas atua como um marcador do estado redox, mas também como um elemento essencial para a saúde reprodutiva feminina.

Adicionalmente, a GSH regula vias de sinalização redox, modulando o estado de oxidação de resíduos de cisteína em proteínas (LA ROSA; GARCÍA-RUIZ & FERNÁNDEZ-CHECA, 2012). Essa regulação é essencial para processos como ciclo celular, proliferação e morte celular. Seu sistema antioxidante também protege contra danos ao DNA e à membrana celular, resultantes da peroxidação lipídica induzida por ERO (AITKEN et al., 2022; AVERILL-BATES, 2023). Durante procedimentos de reprodução assistida o equilíbrio redox é crucial, pois os gametas e embriões são expostos a potenciais fontes de estresse oxidativo (BABAYEV & DUNCAN, 2022; CHEN; YANG & ZHANG, 2023; HUANG et al., 2023). Observações durante ciclos de estimulação ovariana indicam que o aumento nos níveis de GSSG no fluido folicular reflete maior atividade metabólica e carga oxidativa local (BABAYEV & DUNCAN, 2022). Isso ressalta a necessidade de estratégias clínicas para mitigar o estresse oxidativo, como o uso de suplementação antioxidante, incluindo precursores de GSH, que têm demonstrado potencial para melhorar a qualidade ovocitária e os desfechos reprodutivos.

Em resumo, a glutationa desempenha um papel indispensável no controle do estado redox, protegendo processos fisiológicos críticos para a fertilidade feminina. Sua localização estratégica, ação antioxidante e impacto direto no microambiente folicular a tornam um marcador-chave na reprodução assistida, com aplicações promissoras para intervenções terapêuticas e otimização de tratamentos de fertilidade (BABAYEV & DUNCAN, 2022; CHEN; YANG & ZHANG, 2023; HUANG et al., 2023).

### 2.6.2. Nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e Nitrato ( $\text{NO}_3^-$ )

Os nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) e nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) são metabólitos estáveis derivados do óxido nítrico (NO), uma molécula sinalizadora essencial no organismo humano, produzida principalmente por células endoteliais, macrófagos e outros tipos celulares especializados (STAICU et al., 2021). O NO desempenha funções fisiológicas cruciais, incluindo a regulação do tônus vascular, a neurotransmissão e a modulação da resposta imune. O NO é produzido a partir do aminoácido L-arginina em uma reação catalisada pelas enzimas óxido nítrico sintases. Nesse processo, duas moléculas de L-arginina são convertidas em duas moléculas de L-citrulina e duas moléculas de NO. Essa reação é dependente de cofatores como NADPH e oxigênio molecular, que fornecem os elétrons necessários para a síntese de NO (DUTTA & SENGUPTA, 2022). Após sua produção, o NO é rapidamente oxidado no organismo, formando primeiramente  $\text{NO}_2^-$  e, posteriormente,  $\text{NO}_3^-$  sendo este último a forma mais estável e predominante no plasma sanguíneo (DUTTA & SENGUPTA, 2022; BARBOSA et al., 2024). A seguir o esquema de representação da síntese e redução do NO:



Um processo reverso pode ocorrer na cavidade oral, quando enzimas redutases específicas, como as redutases de nitrato, realizam a conversão de nitratos em nitritos, sendo este um processo que pode ocorrer em condições de hipóxia (DREJZA et al., 2022; AWONUGA; CAMP & ABU-SOUD, 2023). Esse ciclo é importante porque o nitrito pode atuar como uma fonte alternativa de NO em tecidos com baixo oxigênio, ajudando a manter a homeostase redox e a funcionalidade vascular (BARBOSA et al., 2024). Diante disso, a quantificação desses biomarcadores no plasma é amplamente utilizada como um indicador da produção de NO no organismo (DREJZA et al., 2022; AWONUGA; CAMP & ABU-SOUD, 2023).

O ciclo entre  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  e NO é dinâmico e adaptável às condições metabólicas. Em situações de baixa oxigenação, como no ambiente uterino ou folicular, o  $\text{NO}_2^-$  é convertido de volta em NO. Este processo permite que o NO atue localmente na regulação do fluxo sanguíneo e na homeostase tecidual (STAICU et al., 2021; DUTTA & SENGUPTA, 2022). No sistema reprodutor feminino, o NO desempenha um papel crítico em várias etapas da fertilidade. Ele regula o fluxo sanguíneo uterino, promove a vascularização do endométrio e influencia a

contratilidade uterina, processos indispensáveis para a implantação embrionária e a manutenção da gravidez (DREJZA et al., 2022; AWONUGA; CAMP & ABU-SOUD, 2023; BARBOSA et al., 2024). No microambiente folicular, concentrações adequadas de  $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NO}_3^-$  estão associadas à maturação ovocitária, à função do corpo lúteo e à qualidade dos gametas. Contudo, desequilíbrios na produção ou degradação de NO, refletidos por alterações nos níveis dessas biomoléculas, podem levar a complicações reprodutivas, como infertilidade, abortos espontâneos e distúrbios gestacionais (BARBOSA et al., 2024). Além disso, o excesso de  $\text{NO}_2^-$  pode reagir com superóxidos formando peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), um radical altamente reativo que compromete a integridade do DNA, das membranas lipídicas e das proteínas do ambiente reprodutivo (STAICU et al., 2021; DUTTA & SENGUPTA, 2022; AWONUGA; CAMP & ABU-SOUD, 2023).

De acordo com Barbosa et al., (2024), o estresse oxidativo, uma condição frequentemente observada em mulheres submetidas a técnicas de reprodução assistida, está intimamente relacionado à produção e função do NO. Durante a estimulação ovariana, o aumento do metabolismo e a geração de ERO podem interferir no ciclo do NO, desviando-o de suas funções benéficas e promovendo a formação de moléculas pró-oxidantes. Esse desequilíbrio pode comprometer a capacidade antioxidante local e aumentar os danos teciduais, afetando negativamente os resultados reprodutivos (DUTTA & SENGUPTA, 2022; TREFFON & VIERLING, 2024).

Portanto, a quantificação de  $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NO}_3^-$ , tanto no plasma quanto no fluido folicular, é uma ferramenta em potencial para avaliar o estado redox sistêmico e local. Esses biomarcadores não apenas refletem a dinâmica do metabolismo de ERN, mas também auxiliam na identificação de pacientes com maior risco de complicações relacionadas ao estresse oxidativo (STAICU et al., 2021; DREJZA et al., 2022). Além disso, o monitoramento dessas moléculas pode guiar intervenções terapêuticas, como a suplementação antioxidante e a personalização dos protocolos de estimulação ovariana, visando à melhora da qualidade ovocitária e dos desfechos reprodutivos (AWONUGA; CAMP & ABU-SOUD, 2023; BARBOSA et al., 2024).

### 3. JUSTIFICATIVA

A infertilidade feminina é um problema de saúde pública que afeta milhões de mulheres ao redor do mundo. Devido à complexidade do sistema reprodutivo feminino, o diagnóstico e o tratamento dessa condição se tornam desafiadores. Clinicamente, a infertilidade corresponde à incapacidade de alcançar uma gravidez clínica após 12 meses de relações sexuais regulares e

desprotegidas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2023). Essa condição não apenas afeta a qualidade de vida das mulheres, mas também reflete questões mais amplas de saúde reprodutiva e social. Dados recentes da OMS indicam que, em 2022, cerca de uma em cada seis pessoas no mundo enfrentou infertilidade em algum momento da vida (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2023).

Um estudo recente, conduzido na Europa, destacou o impacto econômico significativo da infertilidade, estimando custos anuais em 70 milhões de euros para cada grupo de 10.000 mulheres com idades entre 18 e 50 anos (BOURRION et al., 2022). Esses dados reforçam que a infertilidade não é apenas um problema médico, mas também uma questão social de grande relevância, com implicações profundas para a saúde global. Além disso, representa um ônus considerável tanto para os indivíduos quanto para a sociedade como um todo (SUN et al., 2023). Diante da gravidade desse cenário, a OMS reconheceu a infertilidade como um distúrbio social (VAYENA; ROWE & GRIFFIN, 2002).

Nos últimos anos, diversos estudos têm evidenciado o papel do estresse oxidativo na fisiopatologia da infertilidade feminina (AITKEN et al., 2022; GUERRIERO & D'ERRICO, 2022; KALTSAS et al., 2023; MAUCHART et al., 2023; SU et al., 2024). Esse processo metabólico é caracterizado pelo desequilíbrio entre as ERO e os sistemas antioxidantes, culminando em danos celulares. Quando o sistema antioxidante não consegue neutralizar o excesso de ERO, o trato genital feminino torna-se altamente suscetível (SU et al., 2024). Estruturas como ovócitos e folículos, devido à sua elevada sensibilidade, estão entre as mais afetadas, resultando em prejuízos significativos em processos fundamentais, como a implantação embrionária, a função endócrina e a integridade do endométrio. Essas alterações comprometem diretamente a ovulação, a esteroidogênese e a maturação dos ovócitos, além de intensificar a apoptose nas células da granulosa (GUERRIERO & D'ERRICO, 2022; SU et al., 2024).

Na comunidade científica, é amplamente reconhecido que as anormalidades oxidativas podem ser intensificadas por fatores como desnutrição, obesidade e hábitos de vida prejudiciais, incluindo o consumo de álcool, tabagismo e uso de drogas recreativas (ANGELIS et al., 2020; HERNÁNDEZ-RUIZ et al., 2022; XIE et al., 2022; ZHENG et al., 2023). Além disso, a exposição a toxinas presentes no ambiente de trabalho ou no meio ambiente tem um impacto negativo comprovado na fertilidade (SEGAL & GIUDICE, 2019; KINKADE et al., 2021; YAO et al., 2023). O estresse oxidativo também está associado a condições como endometriose, síndrome do ovário policístico e infertilidade sem causa aparente (BANERJEE &

BHATTACHARYA, 2019; DIDZIOKAITE et al., 2023; ZEBER-LUBECKA; CIEBIERA & HENNIG, 2023). Diante dessas adversidades, muitos casais enfrentam dificuldades para conceber e acabam recorrendo às TRA como uma alternativa viável para aumentar suas chances de alcançar uma gestação bem-sucedida.

Apesar dessas descobertas, os estudos realizados até o momento, predominantemente *in vitro* ou em modelos animais, apresentam resultados inconsistentes. Para esclarecer como o estresse oxidativo impacta a fertilidade e investigar o potencial dos antioxidantes como abordagem terapêutica, é fundamental a realização de ensaios clínicos randomizados e controlados em humanos.

Nesse contexto, o estudo propõe uma análise a nível sistêmico e folicular do estresse oxidativo e seu impacto nos parâmetros reprodutivos femininos, incluindo a taxa de gravidez, o número de nascidos vivos, a quantidade de ovócitos capturados e o número de blastocistos formados. A hipótese é de que esse impacto seria causado pelo desequilíbrio entre as ERO, ERN e os mecanismos antioxidantes, refletido em alterações nos níveis de glutationa, nitrato, nitrito, peroxidação lipídica e capacidade antioxidante total. Além disso, acredita-se que a modulação do desequilíbrio oxidativo, seja por meio da redução do estresse oxidativo ou do fortalecimento do sistema antioxidante, possa contribuir significativamente para a melhoria dos desfechos reprodutivos e para o tratamento de condições associadas.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo geral

Investigar o impacto do estresse oxidativo, tanto a nível sistêmico quanto folicular, nos parâmetros reprodutivos femininos de mulheres submetidas a tratamentos de infertilidade e avaliar sua influência na contagem de folículos antrais (CFA), na quantidade de ovócitos capturados, no número de blastocistos formados e nas taxas de gravidez.

### 4.2. Objetivos específicos

- Quantificar os níveis de estresse oxidativo por meio da análise de biomarcadores como glutationa, nitrato, nitrito e espécies reativas de oxigênio em amostras de sangue e fluido folicular;
- Comparar os efeitos do estresse oxidativo a nível sistêmico e folicular, identificando como essas diferenças impactam os principais parâmetros reprodutivos femininos;

- Analisar a relação entre o estresse oxidativo e fatores associados à infertilidade feminina, com destaque para a influência da idade.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (CEP/UnB) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), sob o parecer consubstanciado CAAE nº 4.882.986. Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), garantindo que estavam cientes dos objetivos e procedimentos da pesquisa e concordaram em participar voluntariamente.

### 5.1. Seleção da população

O estudo contou com a participação de 49 pacientes inférteis ( $n = 49$ ), que estavam em tratamento de reprodução assistida no Centro de Assistência em Reprodução Humana – Genesis e no Hospital Materno Infantil de Brasília (HMIB), ambos localizados em Brasília/DF. Os critérios de inclusão foram definidos para garantir a homogeneidade do grupo e incluíram o diagnóstico prévio de infertilidade feminina, IMC entre 18 e 30 kg/m<sup>2</sup> e a ausência de doenças crônicas de alto risco que pudessem comprometer uma gestação saudável. Foram excluídas da pesquisa pacientes com sorologia positiva para doenças infecciosas (HIV, HTLV, Sífilis, Hepatites B e C), fumantes, aquelas com diagnóstico de síndrome dos ovários policísticos ou endometriose moderada e grave, bem como mulheres com histórico de perda gestacional recorrente ou gravidez ectópica.

### 5.2. Protocolo de investigação básica e estimulação ovariana

Os casais participantes foram submetidos a uma avaliação inicial, realizada pelo médico responsável, abrangendo aspectos como a idade, o tempo de infertilidade e os fatores causais associados ao quadro de infertilidade. Entre os exames solicitados, estavam a contagem de folículos antrais (CFA), sorologias do casal e o espermograma do parceiro. Exames adicionais foram solicitados de acordo com o fator causal da infertilidade identificado em cada caso.

É importante ressaltar que, em ambas as clínicas a detecção de gravidez bioquímica foi realizada por meio de um teste de gonadotrofina coriônica humana (Beta-hCG), com valores superiores aos valores de referência predefinidos pelo laboratório ( $> 0,2$  mUI/mL). O exame

foi realizado 14 dias após a transferência de embriões ou a inseminação intrauterina, seguindo os protocolos estabelecidos.

A confirmação de gravidez clínica foi feita pela visualização de um saco gestacional no ultrassom, sendo esta a evidência definitiva da implantação embrionária. Por fim, a taxa de nascidos vivos foi calculada como o número de recém-nascidos vivos após uma gestação com duração mínima de 37 semanas.

#### *5.2.1. Protocolo de aspiração folicular utilizado no Centro de Assistência em Reprodução Humana – Genesis*

A estimulação ovariana foi conduzida seguindo os protocolos padrão de avaliação e tratamento estabelecidos pela instituição. A escolha do protocolo apropriado levou em consideração a disponibilidade dos insumos e o julgamento clínico do médico responsável, que avaliou as necessidades específicas de cada paciente.

De maneira geral, a maturação folicular final, conhecida como trigger, foi realizada quando a ultrassonografia identificou ao menos dois folículos com diâmetro  $\geq 18$  mm. O trigger foi induzido por injeção de gonadotrofina coriônica humana recombinante (rhCG), gonadotrofina coriônica humana extraída da urina (uhCG) ou um agonista do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH). Posteriormente, a aspiração folicular foi realizada entre 34 e 36 horas após o trigger, com o objetivo de captar os ovócitos.

Para a coleta de ovócitos, as pacientes compareceram ao centro clínico em jejum e receberam um comprimido de Maleato de Midazolam (15 mg, Dormonid®, Roche, São Paulo, Brasil) cerca de 30 minutos antes do procedimento. A região vaginal foi lavada com água bidestilada estéril para garantir a assepsia, e uma anestesia local foi aplicada com xilazina a 2% (10 mg/kg, Xylazin 2%, Sintética, São Paulo, Brasil), administrando aproximadamente 7 ml em cada lado da região pélvica, visando minimizar o desconforto.

As coletas de ovócitos foram realizadas por uma equipe médica especializada, utilizando sistemas de recuperação de ovócitos de lúmen duplo Wallace® [Wallace Dual Lumen Oocyte Recovery, 17g needle (33 cm) with 750mm aspiration, Smiths Medical International Ltd., London], guiados por ultrassom endovaginal (Aloka SSD-500). Antes do uso, as agulhas foram lavadas com meio de cultivo heparinizado (Dulbecco's fosfato salino tamponado - 9,6 g/l, Sigma), suplementado com heparina (0,003 g - 50.000 UI), penicilina (0,075 g) e gentamicina (1 ml), ajustado a 37°C, com pH de 7,3  $\pm$  0,3 e osmolaridade de 288  $\pm$  5 mOsm/l, garantindo o aquecimento do meio e minimizando o volume morto.

Durante a aspiração, as agulhas foram conectadas a uma bomba de aspiração (Pioneer Pro-Pump® Dual - Cooper Surgical) com pressão negativa constante de 80 mmHg. Após a coleta do líquido folicular do primeiro folículo, este foi lavado com 0,1 ml do meio de cultivo e submetido a uma nova aspiração.

O líquido folicular aspirado foi transferido para placas de Petri (100 x 20 mm, Corning, USA) e, sob visão estereoscópica (Nikon SMZ 745), o *cumulus-oophoro* foi identificado e separado. Em seguida, as células foram transferidas para placas contendo meio de cultivo específico para gametas e embriões (CSCM-NXC, Irvine Scientific, USA), e mantidos em incubadoras (Benchtop Incubadora, G185, Sensor Tech, K-System Kivex Biotec A/S, USA) sob condições controladas de gases (5% CO<sub>2</sub>) e temperatura (37°C), com pH estabilizado em 7,29. Somente ovócitos em estágio de maturidade (Metáfase II) foram utilizados para vitrificação ou microinseminação por ICSI. A verificação da fertilização foi realizada sob microscopia (Nikon TI) aproximadamente 17 horas após a microinseminação. O cultivo embrionário foi conduzido por até seis dias, sob as mesmas condições previamente descritas, garantindo um ambiente otimizado para o desenvolvimento embrionário.

#### *5.2.2. Protocolo de aspiração folicular no Hospital Materno Infantil de Brasília (HMIB)*

Os protocolos de estimulação ovariana foram implementados com base em critérios médicos individualizados, ajustando a dosagem de medicamentos de acordo com a idade da paciente e a CFA. A dosagem prescrita foi definida conforme as seguintes faixas etárias:

- Pacientes até 29 anos: 150 a 225 UI.
- Pacientes entre 30 e 35 anos: 150 a 300 UI.
- Pacientes acima de 36 anos: 150 a 300 UI, ou conforme avaliação médica específica.

Após a realização de um ultrassom inicial para avaliar a quiescência dos ovários (idealmente com folículos  $\geq 9$  mm de diâmetro), iniciou-se a administração diária da medicação de estimulação até que os folículos atingissem o diâmetro desejado ( $\geq 18$  mm). Os medicamentos utilizados no protocolo de estimulação incluíram:

- Menotropina: Menopur (LH 75 UI + FSH 75 UI, Ferring GmbH, Alemanha) e Merional (IBSA Institut Biochimique, Suíça).
- Urofoltropina (FSH altamente purificado): Fostimon (75 UI ou 150 UI de urofoltropina, IBSA Institut Biochimique, Suíça).
- FSH recombinante (FSH-r): Gonal (900 UI/1,5 mL alfa-folitropina, Merck, Itália).

Quando os folículos atingiram diâmetros entre 16 e 22 mm, foi realizado o *trigger* para indução da maturação folicular final. Os medicamentos utilizados para o *trigger* incluíram:

- hCG recombinante: Ovidrel (6.500 UI/mL, Merck, Itália).
- hCG urinário: Choriomon (5.000 UI ou 10.000 UI, IBSA Institut Biochimique, Suíça).
- Trigger duplo (hCG + agonista GnRH): Gonapeptyl daily (Ferring GmbH, Alemanha).

Após 36 horas da administração, foi realizada a aspiração dos folículos ovarianos para a coleta dos ovócitos, acompanhada pela coleta de sêmen para os procedimentos subsequentes. Para a coleta de ovócitos, as pacientes compareceram ao Laboratório de Reprodução Humana em jejum, seguindo as orientações clínicas estabelecidas. O procedimento foi realizado pela equipe médica da clínica, utilizando agulhas de lúmen único calibre 17 (CooperSurgical® Wallace® Single Lumen Oocyte Recovery System, EUA) sob orientação de ultrassom endovaginal (Logic GE® P5).

Antes do início da coleta, as agulhas foram preparadas com lavagem utilizando meio de cultura heparinizado (solução salina tamponada com fosfato - Ingamed, Maringá, Brasil), suplementado com 25 UI/ml de heparina (Cristalia, São Paulo, Brasil). O meio de cultura foi mantido em uma faixa de temperatura entre 25°C e 37°C, com pH estabilizado em 7,3 ± 0,1 e osmolaridade ajustada entre 280-288 mOsm/L, condições que visam preservar a viabilidade dos ovócitos durante a coleta.

O fluido folicular foi aspirado cuidadosamente por meio de seringas Luer-lock de 20 mL, que estavam acopladas à agulha. À medida que cada seringa se enchia, era imediatamente substituída por outra, garantindo a continuidade e eficiência do processo de coleta. O fluido folicular coletado foi então transferido para o laboratório, onde foi analisado sob um estereomicroscópio para a identificação do complexo *cumulus-oophorus*, essencial para a seleção dos ovócitos.

### **5.3. Obtenção do fluido folicular e sangue**

Para todas as análises subsequentes, a obtenção do fluido folicular e do sangue seguiu um protocolo rigoroso. Durante o procedimento de aspiração folicular, foram coletados aproximadamente 4 mL de fluido folicular de cada paciente, extraídos de um ou mais folículos dominantes ( $\geq 18$  mm). As amostras passaram por uma avaliação visual inicial, sendo descartadas imediatamente caso apresentassem contaminação por sangue. Em seguida, o fluido

folicular foi submetido à centrifugação a 10.000xg por 10 minutos a 4°C, com o objetivo de remover resíduos celulares. Após o processo, as amostras foram separadas em alíquotas de 500 µL e destinadas às análises específicas, descritas a seguir.

Simultaneamente, foram coletados 4 mL de sangue utilizando tubos de coleta a vácuo heparinizados ou contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), utilizando uma agulha de calibre 24G. A coleta foi realizada no mesmo momento da aspiração folicular, antes da paciente se encontrar sob efeito anestésico. As amostras de sangue também foram submetidas à centrifugação a 10.000xg por 10 minutos em temperatura ambiente, permitindo a separação do plasma sanguíneo. O sobrenadante foi então coletado em alíquotas de 500 µL e preparado para os procedimentos analíticos correspondentes.

#### **5.4. Análises bioquímicas**

##### *5.4.1. Atividade antioxidante*

Após a obtenção das amostras (ver secção 5.3.), 180 µl dos sobrenadantes de fluido folicular e plasma sanguíneo foram cuidadosamente coletados e incorporados a 20 µl de ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v) para estabilização das amostras. Após, as amostras foram rapidamente imersas em nitrogênio líquido a -196°C para congelamento imediato e, em seguida, armazenadas em freezer a -80°C até a realização das análises subsequentes.

A quantificação da concentração de GSH, GSSG e glutationa total ( $t\text{GSH} = [\text{GSH}] + 2 \times [\text{GSSG}]$ ) foi realizada por meio de um método enzimático reciclagem, com modificações para utilização em microplacas, baseado no princípio da capacidade dos grupos tiol (-SH) de reduzir a ligação dissulfeto do DTNB (Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico). Isso resulta na produção de TNB (2-nitro-5-thiobenzoato), um composto que apresenta absorção de luz a 412 nm (RAHMAN; KODE & BISWAS, 2007).

Em um meio reacional que contém glutationa (GSH e/ou GSSG), DTNB, glutationa redutase (GR) e NADPH, a taxa de variação da absorbância a 412 nm ( $\Delta\text{A412/min}$ ) está diretamente relacionada à concentração total de glutationa. Para determinar especificamente a concentração de GSSG, soluções padrão foram preparadas em tubos eppendorfs, dissolvidas em uma solução niveladora contendo 2,4% (p/v) de TCA, 357 mM de fosfato de potássio (KPi) e 4,8% (v/v) de etanol. Estas soluções padrão foram preparadas nas concentrações de 0,2; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 µM. A solução niveladora foi usada para replicar as condições das amostras destinadas à determinação de GSSG. Foi construída uma curva padrão aplicando 20 µL de cada solução padrão em um volume final de 200 µL de um meio reacional composto por 125 mM de

tampão fosfato (pH 7,0); 1,25 mM de EDTA; 0,2 mM de NADPH; 0,4 mM de DTNB e 0,4 U/mL de GR (GRIFFITH, 1980).

Para determinar os níveis de tGSH, foram preparadas soluções padrão de GSH em tubos contendo 10% (p/v) de TCA em concentrações de 5, 10, 20, 40 e 80  $\mu$ M. Foi elaborada uma curva padrão aplicando 10  $\mu$ L de cada solução padrão em um volume final de 200  $\mu$ L de meio reacional contendo 125 mM de tampão fosfato (pH 7,0); 1,25 mM de EDTA; 0,5% (p/v) de TCA; 0,2 mM de NADPH; 0,27 mM de DTNB e 0,27 U/mL de GR. No caso das amostras, o padrão foi substituído por 5  $\mu$ L do sobrenadante ácido, completando o volume restante com 10% de TCA para manter a concentração final. Cada ponto da curva e das amostras foi realizado em triplicata em uma microplaca de 96 poços. A reação foi iniciada pela adição de NADPH, e a absorbância a 412 nm foi monitorada por dois minutos. A leitura da curva e das amostras foi feita simultaneamente na mesma placa.

As taxas de variação da absorbância das amostras foram comparadas com as curvas-padrão, e as concentrações de tGSH e GSSG foram calculadas. A concentração de GSH reduzida foi obtida subtraindo-se tGSH de GSSG, e a razão GSSG/GSH foi calculada pela divisão entre os valores.

#### 5.4.2. Espécies reativas de nitrogênio (ERN)

Após a coleta das amostras de fluido folicular e plasma sanguíneo, aproximadamente 500  $\mu$ L dos sobrenadantes foram cuidadosamente transferidos para tubos eppendorfs, imediatamente imersos em nitrogênio líquido (-196°C) e, em seguida, armazenados em um ultrafreezer a -80°C até a realização das análises subsequentes.

Para o início das análises, as amostras foram retiradas do ultrafreezer e mantidas sob refrigeração controlada até o completo descongelamento. Em seguida, foi adicionada acetonitrila às alíquotas na proporção de 2:1, com o objetivo de precipitar as proteínas presentes. As amostras foram mantidas em gelo por 10 minutos para assegurar a estabilização do processo de precipitação proteica. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 10.000xg por 10 minutos a 4°C, permitindo a separação das frações proteica e líquida. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram cuidadosamente coletados, sendo destinados às quantificações de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NO}_2^-$ .

Para a determinação dos níveis de  $\text{NO}_2^-$ , 100  $\mu$ L do sobrenadante foi combinado com 100  $\mu$ L da solução de Griess, contendo N-(1-naftil) etilenodiamina (NED) a 0,1% p/v e sulfanilamida (SULF) a 2% p/v. Este processo foi conduzido em triplicata, utilizando placas

estéreis de 96 poços, e as amostras foram mantidas à temperatura ambiente por 10 minutos, conforme a metodologia descrita por (GIUSTARINI et al., 2008). Para a quantificação de  $\text{NO}_3^-$ , 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram misturados com 80  $\mu\text{L}$  de cloreto de vanádio ( $\text{VCl}_3$ ) e 50  $\mu\text{L}$  da solução de Griess, contendo N-(1-naftil) etilenodiamina (NED) a 0,1% p/v e sulfanilamida (SULF) a 2% p/v, sendo as amostras distribuídas em triplicata nas mesmas placas estéreis de 96 poços. As amostras foram então incubadas a 37°C por 30 minutos.

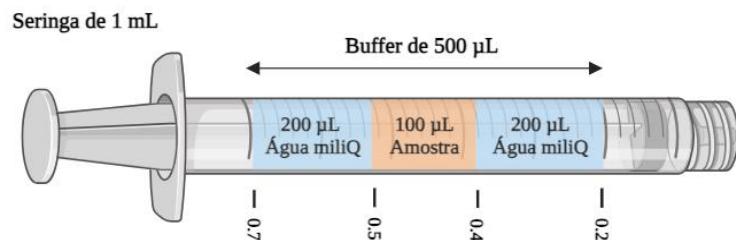
Uma curva padrão foi gerada para ambos os ensaios, utilizando concentrações decrescentes de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NO}_2^-$  (200; 100; 50; 12,5; 6,25; 3,125  $\mu\text{M}$ ). A absorbância das amostras foi medida a 540 nm em um leitor de microplacas, permitindo a quantificação dos níveis de ERN nas amostras. O Nox total foi calculado através da soma das concentrações de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NO}_2^-$ .

### 5.5. Espécies reativas de oxigênio (ERO)

Para a análise quantitativa de ERO foi utilizada a técnica de ressonância paramagnética eletrônica (RPE). Após a obtenção das amostras, 500  $\mu\text{l}$  do fluido folicular foram imediatamente tratados com uma solução de trabalho contendo CMH (carboximetoxi-hidroxiamina) a 400 mM, DF (desferroxamina mesilato) a 25 mM, DETC (dietilditiocarbamato) a 5 mM, e heparina sódica a 100 U/mL, na proporção de 1:1. A mistura foi incubada sob agitação suave a 37 °C por 30 minutos. Em seguida, 500  $\mu\text{L}$  da solução foram transferidos para um recipiente de 1 mL, que foi imediatamente imerso em nitrogênio líquido a -196°C. As amostras foram mantidas no freezer a -80 °C até a realização das análises. Todas as soluções foram preparadas em tampão Krebs HEPES (KHB, Noxygen, Elzach, Alemanha), com pH ajustado para 7,4, utilizando água bidestilada e deionizada, imediatamente antes da execução dos experimentos.

Para as análises de RPE no sangue, as amostras foram coletadas em tubos de coleta a vácuo heparinizados e 100  $\mu\text{L}$  foi imediatamente tratado com uma solução de trabalho que continha CMH (carboximetoxi-hidroxiamina) a 400 mM, DF (desferroxamina mesilato) a 25 mM, DETC (dietilditiocarbamato) a 5 mM e heparina sódica a uma concentração de 100 U/mL, na proporção de 1:1. O tubo contendo a mistura foi incubado sob agitação suave a 37°C por exatos 30 minutos. Em seguida, 100  $\mu\text{L}$  da solução foram colocados entre dois blocos de gelo de água miliQ (cada um com 200  $\mu\text{L}$ ) em um recipiente destampado de 1 mL, conforme ilustrado na Figura 8 a seguir. As amostras foram imediatamente submersas em nitrogênio

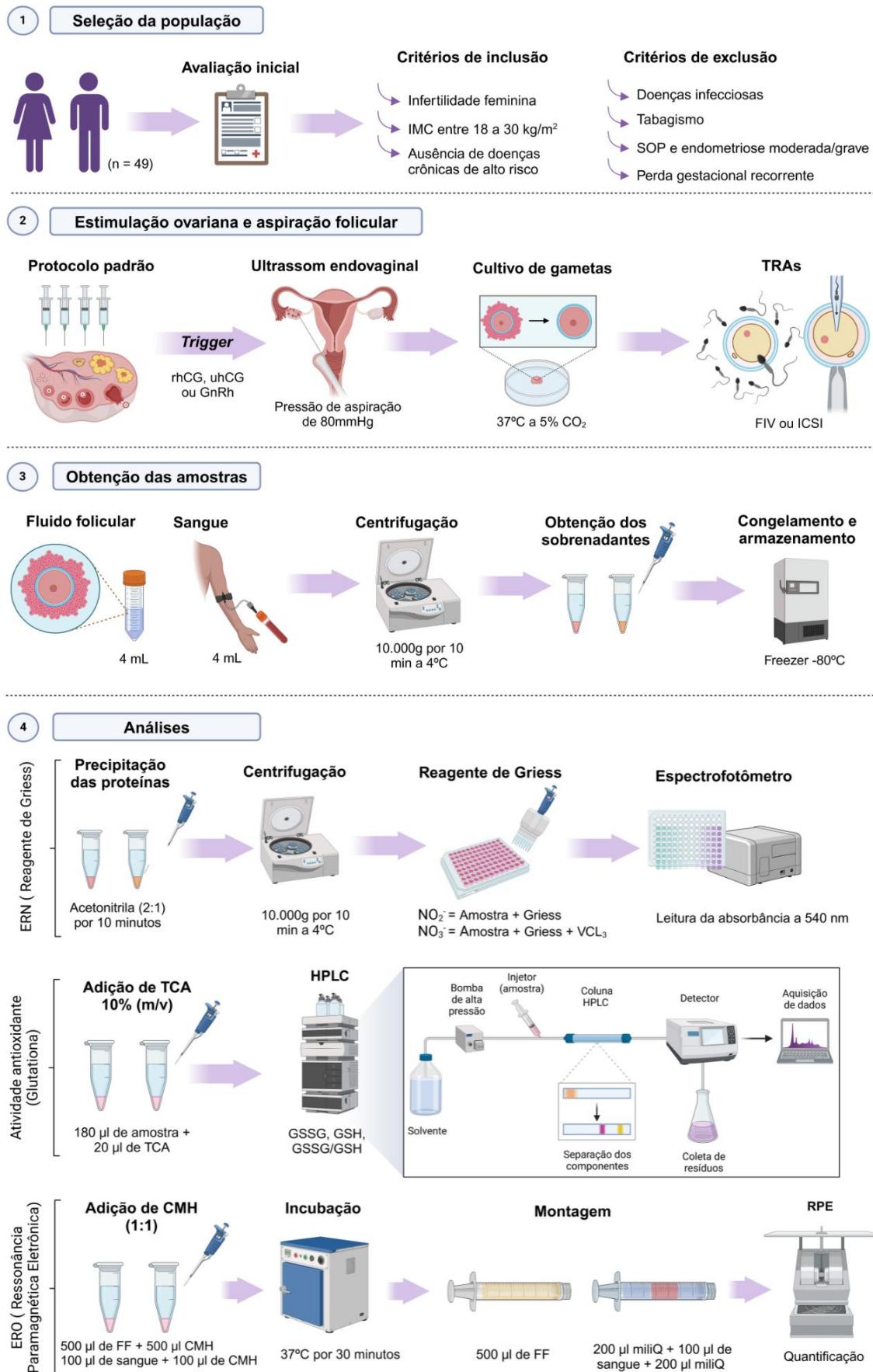
líquido a -196°C e, posteriormente, mantidas em um freezer a -80 °C até a realização das análises subsequentes.



**Figura 8.** Esquema da montagem das amostras de sangue para análise de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE). A seringa de 1 mL é preenchida com 100 µL da amostra de sangue tratada com carboximetoxihidroxamina (CMH), na proporção de 1:1. A amostra de sangue é colocada ao centro, entre dois blocos de gelo contendo 200 µL de água miliQ, formando um buffer de 500 µL no total.

Fonte: Autoria própria.

A Figura 9 ilustra de forma detalhada o delineamento experimental adotado neste estudo, desde os critérios de inclusão e exclusão para a seleção da população até os procedimentos laboratoriais utilizados para cada análise. Este fluxograma fornece uma visão integrada dos métodos aplicados, permitindo a compreensão clara das etapas realizadas para a coleta e análise das amostras.



**Figura 9.** Delineamento experimental. (1) Mulheres diagnosticadas com infertilidade, com índice de massa

corporal (IMC) entre 18 e 30 kg/m<sup>2</sup> e sem doenças crônicas de alto risco, foram incluídas. Pacientes com doenças infeciosas, tabagismo, síndrome dos ovários policísticos, endometriose moderada/grave ou histórico de perda gestacional recorrente foram excluídas do estudo. (2) A estimulação ovariana foi conduzida de acordo com protocolos padrão, com ajustes de medicação baseados nas características individuais de cada paciente. O desenvolvimento folicular foi monitorado por ultrassonografia endovaginal, e a aspiração folicular foi realizada após o "trigger", induzido com rhCG, uhCG ou agonista de GnRH, quando os folículos atingiram o diâmetro adequado ( $\geq 18$  mm). Após a coleta folicular, os gametas foram cultivados em meios específicos para fertilização *in vitro* (FIV) ou injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), sendo mantidos em incubadoras a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. (3) Durante a aspiração folicular, foram coletados 4 mL de fluido folicular de folículos dominantes. Amostras com contaminação visível por sangue foram descartadas. Simultaneamente, 4 mL de sangue venoso foram coletados utilizando tubos a vácuo contendo heparina ou EDTA. As amostras de fluido folicular e sangue foram submetidas à centrifugação a 10.000xg por 10 minutos a 4°C para separar o plasma e remover resíduos celulares. Os sobrenadantes obtidos foram armazenados em alíquotas de 500 µL a -80°C até a realização das análises. (4) As análises realizadas abrangearam diferentes metodologias. Para a quantificação de espécies reativas de nitrogênio (ERN), as amostras foram tratadas com acetonitrila (2:1) para precipitação proteica, seguidas de centrifugação a 10.000xg por 10 minutos a 4°C. O reagente de Griess foi então adicionado, e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm. Para a avaliação da atividade antioxidante, as amostras foram tratadas com ácido tricloroacético (TCA) a 10% (p/v) e submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para determinar os níveis de glutatona reduzida (GSH), glutatona oxidada (GSSG) e a relação GSSG/tGSH. Por fim, a análise por Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) foi realizada após a adição de CMH (1:1) às amostras, que foram incubadas a 37°C por 30 minutos. As amostras de fluidos foliculares e plasma sanguíneo foram então analisadas para quantificar as ERO presentes. GnRH = Hormônio liberador de gonadotrofina; rhCG = Gonadotrofina coriônica humana recombinante; uhCG = Gonadotrofina coriônica humana urinária; TCA = Ácido tricloroacético; GSH = Glutatona reduzida; GSSG = Glutatona oxidada; RPE = Ressonância Paramagnética Eletrônica; TRA = Tecnologias de Reprodução Assistida; FIV = Fertilização *in vitro*; ICSI = Injeção intracitoplasmática de espermatozoides.

Fonte: Autoria própria.

## 5.6. Análise estatística

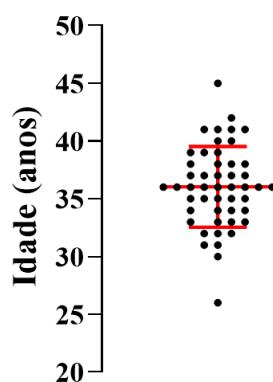
Inicialmente, foi realizada uma análise descritiva das variáveis, incluindo o cálculo de médias e desvios padrão. Posteriormente, foi avaliada a normalidade dos dados utilizando o teste de Shapiro-Wilk, para definir o método de correlação mais adequado. Como algumas das variáveis não apresentaram distribuição normal, foram aplicadas correlações de Spearman para investigar associações lineares entre as variáveis contínuas, como idade, IMC, contagem de folículos antrais (CFA), número de ovócitos recuperados, ovócitos maduros e níveis de ERO e ERN no sangue e no fluido folicular. Os coeficientes de correlação (r) foram interpretados quanto à força e direção das associações, e os respectivos valores de significância (p) foram calculados para avaliar a relevância estatística. A análise estatística foi realizada utilizando o

software GraphPad Prism 9.0 (GraphPad, San Diego, EUA). Em todos os casos, o efeito da variável no desfecho foi considerado estatisticamente significativo quando  $p < 0,05$ .

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. Características clínicas e perfil demográfico das pacientes

O estudo contou com a participação de 49 pacientes, cujos perfis foram avaliados com base em variáveis descritivas importantes para compreender os desfechos reprodutivos. Entre os dados analisados, o fator idade se destacou por apresentar ótima normalidade e homogeneidade, com média de  $36,0 \pm 3,5$  anos, demonstrando consistência no grupo estudado em relação a esse parâmetro. A distribuição etária das pacientes é apresentada na Figura 10.



**Figura 10.** Distribuição da idade das pacientes avaliadas no estudo, representada por pontos individuais. A linha vermelha central indica a média e as linhas horizontais superiores e inferiores representam os desvios padrão, evidenciando a homogeneidade do grupo em relação à idade.

Fonte: Autoria própria.

Em estudos de reprodução assistida, onde fatores como idade desempenham papéis centrais, ter um grupo homogêneo é essencial para evitar vieses. Com idade média de 36 anos, as participantes representam mulheres em uma fase decisiva da vida reprodutiva, caracterizada por desafios como a redução da reserva ovariana e a piora na qualidade dos ovócitos. Essas alterações, amplamente descritas na literatura, estão associadas a processos biológicos como, por exemplo, o aumento do risco de aneuploidias embrionárias e a redução da eficiência mitocondrial (DU FOSSÉ et al., 2020; YE; BAKER & TONG, 2023; ZHANG & WU, 2023).

De acordo com a literatura, as populações nessa faixa etária apresentam desafios reprodutivos importantes, mas ainda têm chances razoáveis de sucesso, como demonstrado pela taxa de gravidez de 59,8% observada entre as pacientes submetidas a FIV e ICSI (BOSCH et al., 2021). No entanto, apesar de ser uma força metodológica, a homogeneidade etária limita a

aplicação dos resultados a mulheres fora dessa faixa etária. Por exemplo, mulheres mais jovens (< 30 anos) costumam apresentar maior CFA e melhor qualidade ovocitária, enquanto mulheres com idade reprodutiva avançada (> 35 anos) enfrentam declínios mais acentuados na quantidade e qualidade dos ovócitos (YE; BAKER & TONG, 2023). Assim, embora os achados sejam altamente relevantes para populações típicas de reprodução assistida, sua aplicação em faixas etárias extremas deve ser feita com cautela.

A Tabela 1 apresenta os principais parâmetros clínicos analisados no estudo, detalhando os valores mínimos, máximos, médias e desvios padrão. As variáveis incluem a idade das pacientes, IMC, CFA, duração da infertilidade, número de ovócitos recuperados, ovócitos maduros e blastocistos.

Tabela 1. Parâmetros clínicos avaliados no estudo, incluindo idade, índice de massa corporal (IMC), contagem de folículos antrais (CFA), duração da infertilidade, número de ovócitos recuperados, ovócitos maduros e blastocistos, com valores mínimos, máximos, médias e desvios padrão ( $\pm$  DP).

<b>Parâmetros clínicos</b>			
	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Média <math>\pm</math> DP</b>
Idade (anos)	26	45	36,0 $\pm$ 3,5
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	22,5	29,7	24,6 $\pm$ 2,4
CFA (n)	4	49	15,7 $\pm$ 9,4
Duração da infertilidade (anos)	1	24	6,4 $\pm$ 3,8
Número de ovócitos recuperados	2	31	11,2 $\pm$ 6,6
Número de ovócitos maduros	0	26	8,2 $\pm$ 5,6
Número de Blastocistos	0	12	2,3 $\pm$ 2,8

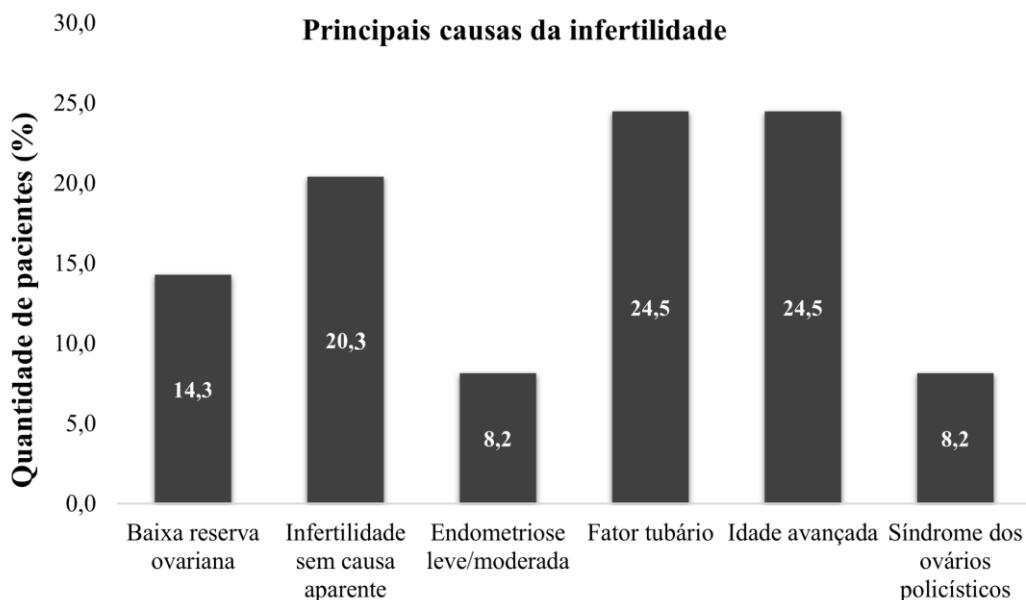
Fonte: Dados da pesquisa.

Os dados da Tabela 1 destacam pontos importantes sobre o perfil das pacientes e os desfechos reprodutivos. A idade média de 36 anos, aliada à ampla variabilidade na CFA, reflete a presença de pacientes em idade reprodutiva avançada, onde o declínio da reserva ovariana é esperado, mas com respostas heterogêneas à estimulação ovariana. O número médio de ovócitos recuperados (11,2  $\pm$  6,6) e maduros (8,2  $\pm$  5,6) sugere uma resposta global positiva em muitas pacientes, embora o intervalo (mínimo de 2 recuperados e 0 maduros) indique que

algumas enfrentam desafios significativos, possivelmente devido a baixa reserva ou qualidade ovocitária. A média de  $2,3 \pm 2,8$  blastocistos formados por paciente, com um intervalo de 0 a 12, reforça a variabilidade na capacidade de desenvolvimento embrionário, que pode ser influenciada por fatores como idade, tempo de infertilidade e qualidade dos gametas. Adicionalmente, o IMC médio de  $24,6 \pm 2,4$  está dentro da faixa saudável, mas a proximidade ao sobre peso em algumas pacientes pode ser um fator a ser considerado nos desfechos reprodutivos.

O estudo de Havrljenko et al., (2023) analisou os resultados preditivos em 490 pacientes com mais de 35 anos submetidas a um ciclo de FIV, evidenciando o impacto da idade avançada na redução dos parâmetros reprodutivos. Os autores observaram uma diminuição significativa no número médio de ovócitos recuperados, ovócitos em metáfase II e embriões desenvolvidos conforme a idade aumentava. Além disso, foi destacado que, para mulheres nessa faixa etária, são necessários entre 10-12 ovócitos em metáfase II ou 10-11 embriões para alcançar uma taxa ideal de nascimentos vivos ou uma taxa cumulativa de nascimentos vivos. Esses achados reforçam a importância de estratégias personalizadas para maximizar a recuperação de ovócitos em mulheres mais velhas, visando melhorar as taxas de sucesso em tratamentos de reprodução assistida.

O tempo médio de infertilidade observado no estudo foi de 6,3 anos, o que evidencia a longa e desafiadora jornada enfrentada por essas mulheres, desde as primeiras tentativas de engravidar até a busca por ajuda médica especializada. A infertilidade feminina pode ter diferentes causas, que não apenas influenciam a escolha do tratamento, mas também os resultados que podem ser alcançados (XIE et al., 2022; ZHENG et al., 2023). Neste estudo, foram analisadas as principais causas de infertilidade que motivaram as pacientes na procura da reprodução assistida. A Figura 11 apresenta a distribuição percentual dessas causas, destacando as mais frequentes.



**Figura 11.** Distribuição percentual das principais causas de infertilidade feminina identificadas no estudo. As causas mais frequentes foram fatores tubários e idade avançada, seguidos por baixa reserva ovariana, infertilidade sem causa aparente, endometriose leve/moderada e síndrome dos ovários policísticos.

Fonte: Autoria própria.

Os dados apresentados na Figura 11 destacam que os fatores tubários e a idade avançada são as principais causas de infertilidade feminina, na população estudada, seguidos pela baixa reserva ovariana e pela infertilidade sem causa aparente. Essa distribuição é consistente com a literatura, que reconhece a idade avançada como um fator determinante na redução da fertilidade (DU FOSSÉ et al., 2020; YE; BAKER & TONG, 2023; ZHANG & WU, 2023). Os fatores tubários, como obstruções ou danos às tubas uterinas, frequentemente associados a infecções prévias ou endometriose, também são causas importantes de infertilidade, sendo tratados com maior frequência por meio de técnicas de reprodução assistida, como a FIV (YANG et al., 2020; HENRY & NISOLLE, 2024). A baixa reserva ovariana, apontada como outra causa significativa, reflete a diminuição do número de folículos viáveis no ovário, uma condição muitas vezes agravada pela idade ou por fatores genéticos. Por outro lado, a infertilidade sem causa aparente, que também apresenta uma alta prevalência, evidencia as limitações diagnósticas e a complexidade multifatorial da infertilidade, exigindo abordagens personalizadas.

A Tabela 2 complementa esses dados ao mostrar a distribuição das finalidades dos tratamentos realizados. Além disso, a análise dos desfechos reprodutivos, tanto positivos quanto negativos, oferece uma visão mais abrangente sobre a eficácia dos procedimentos.

Tabela 2. Distribuição das finalidades dos tratamentos realizados e os desfechos de gravidez clínica entre as pacientes avaliadas no estudo. As finalidades incluem fertilização *in vitro* (FIV), injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) e preservação da fertilidade. Os desfechos são apresentados em termos de gravidez clínica positiva e negativa, com os resultados expressos em números absolutos e percentuais, evidenciando as escolhas terapêuticas predominantes e suas respectivas taxas de sucesso.

Nº de pacientes	Finalidade do tratamento			Gravidez clínica	
	FIV	ICSI	Preservação da fertilidade	Positiva	Negativa
	11	25	13	16	20
<b>Porcentagem (%)</b>	<b>22,4</b>	<b>51,0</b>	<b>26,6</b>	<b>44,4</b>	<b>55,6</b>

Fonte: Dados da pesquisa.

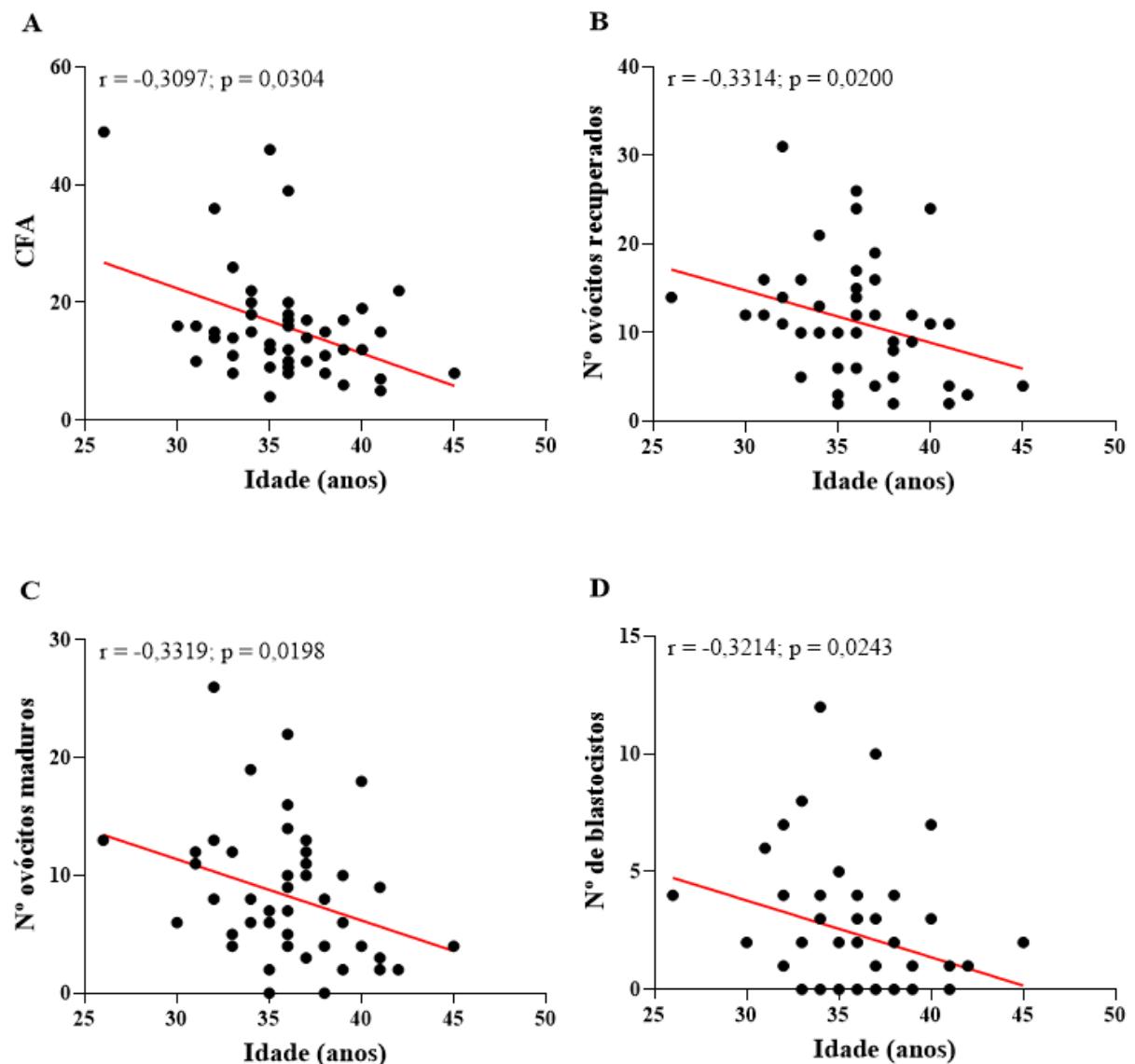
Essa abordagem personalizada é ainda mais relevante quando observamos os dados apresentados na Tabela 2, que mostram a ICSI como o procedimento mais utilizado, abrangendo 51,0% dos casos. A escolha predominante pela ICSI pode estar associada a condições específicas, como fator masculino de infertilidade ou baixa qualidade ovocitária, que exigem técnicas mais avançadas para superar barreiras à fertilização.

Como as causas masculinas de infertilidade não foram objetos de estudo, as pacientes que realizaram ICSI provavelmente a fizeram por outras indicações. A técnica é frequentemente adotada como estratégia de controle em casos de fertilização inadequada em ciclos de FIV, ou ainda como uma tentativa de otimizar resultados em pacientes com histórico de falhas reprodutivas (BALLI et al., 2022). Nesse sentido, o histórico reprodutivo das pacientes, como o número de ciclos realizados e os resultados anteriores obtidos, é um fator crucial que não foi analisado, mas que pode influenciar diretamente a escolha da técnica.

A realização de múltiplos ciclos de tratamentos de reprodução assistida, por exemplo, pode aumentar o estresse físico e emocional, contribuindo para a elevação dos níveis de estresse oxidativo nas pacientes. Esse desequilíbrio impacta negativamente a qualidade dos gametas, comprometendo os desfechos reprodutivos (KUSHNIR; SMITH & ADASHI, 2022). Apesar de não ter comprovação científica, o estudo de Negris et al., (2021) destaca a percepção amplamente difundida entre mulheres que buscam cuidados de fertilidade de que o estresse emocional pode impactar negativamente os resultados reprodutivos. Entre as 1460 participantes incluídas no estudo, 28,9% acreditavam que o estresse emocional poderia causar infertilidade,

enquanto 69,0% associavam o estresse a uma redução no sucesso dos tratamentos de fertilidade e 31,3% consideravam que ele poderia levar a um aborto espontâneo. Diante disso, os autores destacaram a importância de abordar o impacto psicológico nos cuidados de fertilidade de maneira mais compreensiva e informativa. Assim, estudos futuros que incluam variáveis como histórico reprodutivo e o número de ciclos realizados são essenciais.

Alguns indicadores clínicos foram analisados em conjunto, permitindo compreender melhor como as características demográficas influenciam os parâmetros reprodutivos. A Figura 12 apresenta as correlações entre a idade das participantes e os indicadores reprodutivos analisados, destacando o impacto do envelhecimento na reserva ovariana, na qualidade dos ovócitos e na capacidade de formar embriões viáveis.



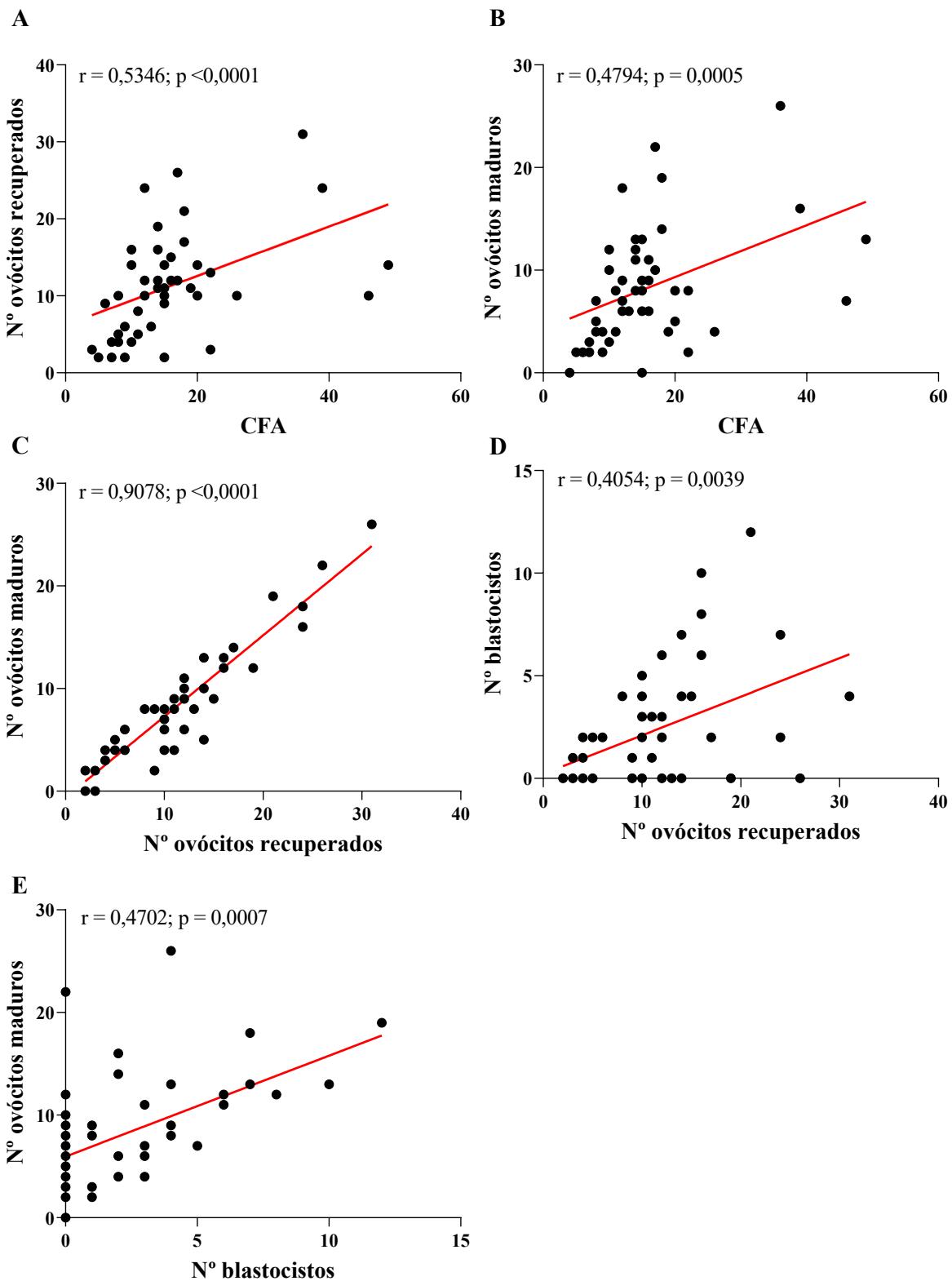
**Figura 12.** Relação entre a idade das pacientes e os principais parâmetros reprodutivos avaliados. (A) Relação entre a contagem de folículos antrais (CFA) e a idade, mostrando uma redução significativa com o aumento da

idade. (B) Relação entre o número de ovócitos recuperados durante a punção ovariana e a idade, evidenciando uma correlação negativa. (C) Correlação negativa entre o número de ovócitos maduros e a idade. (D) Número de blastocistos formados, que também diminui significativamente com a idade avançada.  $r$  = coeficiente de correlação de Spearman. São consideradas diferenças significativas com  $p < 0,05$ .

Fonte: Autoria própria.

Os resultados apresentados na Figura 12 mostram de forma clara que a idade tem um impacto negativo em todos os parâmetros reprodutivos avaliados. Com o passar dos anos, ocorre uma redução progressiva na CFA (Figura 12A), indicando a diminuição da reserva ovariana, que é fundamental para a capacidade reprodutiva. Essa redução também se reflete na quantidade de ovócitos recuperados durante a aspiração folicular (Figura 12B), demonstrando que, à medida que a idade avança, menos folículos são puncionados. É possível inferir que essas observações estão diretamente relacionadas, já que uma diminuição na reserva ovariana resulta, naturalmente, em menos ovócitos disponíveis para recuperação.

Além da quantidade, a idade também influencia negativamente a qualidade dos ovócitos e a formação de embriões viáveis. É possível observar na Figura 12 (C) que mulheres mais velhas têm menos ovócitos que atingem a maturidade, o que compromete as etapas subsequentes da reprodução assistida. Por fim, a Figura 12 (D) evidencia que o envelhecimento impacta diretamente a formação de blastocistos, etapa fundamental para a implantação embrionária e o sucesso da gravidez. Complementando as análises, a Figura 13 apresenta as correlações entre os principais parâmetros reprodutivos. Esses gráficos destacam as relações positivas e significativas entre a CFA e os parâmetros ovocitários, além de evidenciar a interação entre o número de ovócitos recuperados e maduros e o impacto desses fatores na formação de blastocistos.



**Figura 13.** Correlações existentes entre os parâmetros reprodutivos avaliados. (A) Relação positiva entre a contagem de folículos antrais (CFA) e o número de ovócitos recuperados; (B) Relação positiva entre a CFA e o número de ovócitos maduros; (C) Relação positiva entre o número de ovócitos recuperados e o número de ovócitos maduros; (D-E) Relações positivas entre o número de ovócitos recuperados e ovócitos maduros, com a quantidade

de blastocistos formados.  $r$  = coeficiente de correlação de Spearman. São consideradas diferenças significativas com  $p < 0,05$ .

Fonte: Autoria própria.

A partir da Figura 13 (A-B), observa-se uma correlação positiva significativa entre a CFA e o número de ovócitos recuperados, bem como entre a CFA e a quantidade de ovócitos que atingiram a maturidade durante os tratamentos de reprodução assistida. Novamente, os dados reforçam que mulheres com maior número de folículos antrais apresentam melhores perspectivas reprodutivas, pois possuem uma maior disponibilidade de ovócitos viáveis e maduros para fertilização. Esse achado destaca a relevância da CFA como um marcador essencial para prever o sucesso em ciclos de reprodução assistida, auxiliando no planejamento e personalização dos tratamentos.

Muitos fatores são reconhecidos como preditores da resposta ovariana em tratamentos de reprodução assistida, incluindo idade, concentrações basais de hormônios (FSH, LH, estradiol, inibina B e AMH) e medidas de ultrassom, como a CFA. No entanto, estudos recentes têm destacado a CFA como o preditor mais forte da reserva ovariana, superando o AMH, o IMC e a idade. A *European Society of Human Reproduction and Embryology* (ESHRE) recomenda o uso da CFA ou do AMH para prever respostas altas e baixas à estimulação ovariana, sendo a CFA preferida por sua maior capacidade de prever resultados reprodutivos de forma precisa e confiável (LU et al., 2023; ALTERI et al., 2024; DERMOLO; ANSA & SIFERIH, 2024).

O estudo de Dermolo; Ansa & Siferih, (2024) que avaliou 412 pacientes, demonstrou que aquelas com CFA inferior a 5 folículos antrais tiveram 84% menos chances de resposta ovariana em comparação com pacientes com CFA mais alta. Os autores também identificaram uma correlação positiva entre a CFA e o número de ovócitos recuperados, destacando sua importância como preditor clínico. Além disso, as análises realizadas confirmaram que a CFA foi um preditor mais eficaz de desfechos adversos em comparação ao AMH, IMC ou idade. Esses resultados estão alinhados com os achados encontrados no presente estudo, no qual a CFA apresentou uma correlação positiva significativa com os parâmetros ovocitários, reforçando sua influência na resposta ovariana.

Nesse sentido, a classificação POSEIDON (*Patient-Oriented Strategies Encompassing Individualized Oocyte Number*), amplamente utilizada para estratificar pacientes submetidas as TRA, considera a CFA como critério central para prognóstico. Nesse modelo, as pacientes são classificadas em quatro grupos com base na idade ( $< 35$  anos ou  $\geq 35$  anos) e na CFA ( $< 5$  ou  $\geq 5$  folículos). Pacientes com CFA  $\geq 5$  e AMH  $\geq 1,2$  ng/ml, por exemplo, são categorizadas

como boas respondedoras aos estímulos hormonais, indicando maior probabilidade de sucesso reprodutivo (ESTEVES et al., 2018; REIG; GARCIA-VELASCO & SELI, 2023). Assim, com base em nosso estudo, em que a CFA média foi de  $15,7 \pm 9,4$  (Tabela 1), observa-se que a maioria das pacientes se enquadraria como boas respondedoras segundo os critérios POSEIDON, dada a média superior a 5 folículos.

Essa perspectiva é reforçada pelos dados apresentados na Figura 13 (C), que destaca a forte correlação positiva ( $r = 0,9078$ ;  $p < 0,0001$ ) entre o número de ovócitos recuperados e o número de ovócitos que atingiram a maturidade, evidenciando que pacientes com maior quantidade de ovócitos puncionados tendem a alcançar melhores resultados em termos de maturação ovocitária. Esse achado está diretamente relacionado à reserva ovariana, medida pela CFA, que influencia diretamente a quantidade de ovócitos disponíveis para alcançar os estágios necessários para a fertilização. Além disso, a Figura 13 (D) apresenta uma correlação positiva significativa, embora mais moderada ( $r = 0,4054$ ;  $p = 0,0039$ ) entre o número de ovócitos recuperados e o número de blastocistos formados. Essa diferença de força nas correlações pode ser atribuída à complexidade adicional envolvida na formação de blastocistos, um processo que depende não apenas da quantidade de ovócitos maduros disponíveis, mas de diversos fatores, como por exemplo, a qualidade dos gametas (RESHEF et al., 2022).

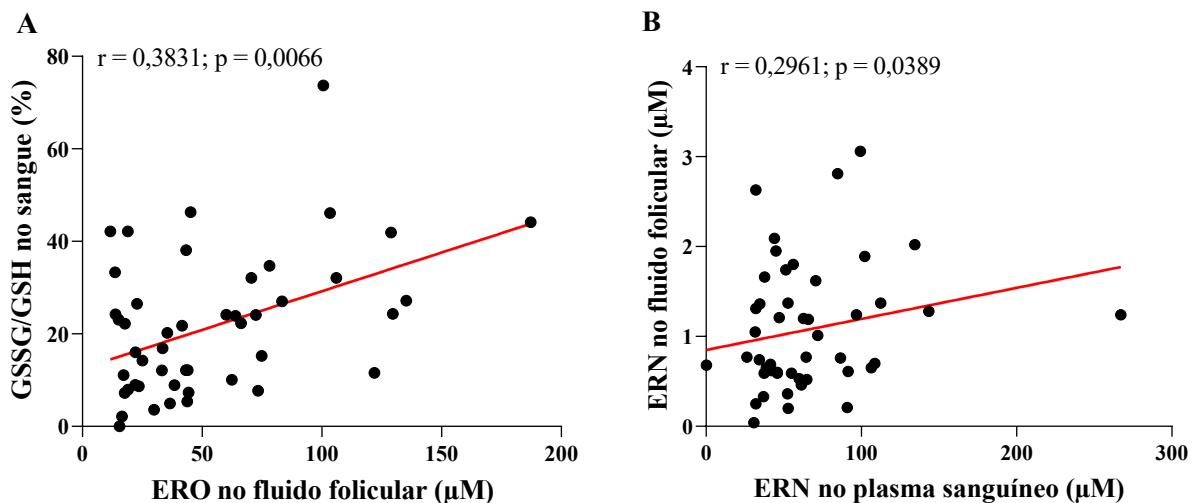
## 6.2. Parâmetros oxidativos: biomarcadores e impactos reprodutivos

Foram avaliados os principais biomarcadores de estresse oxidativo para entender como eles influenciam os desfechos reprodutivos das pacientes. Os resultados mostram as associações entre esses biomarcadores, fatores clínicos e a resposta aos tratamentos, permitindo analisar o impacto do estresse oxidativo na fertilidade feminina.

### 6.2.1. Marcadores de estresse oxidativo: ERO e ERN

As análises realizadas indicaram que a concentração média de ERO no fluido folicular foi de  $52,20 \pm 31,78 \mu\text{M}$ , enquanto no sangue essa concentração foi consideravelmente menor,  $28,40 \pm 8,78 \mu\text{M}$ . No caso das ERN, avaliadas por meio do Nox total (soma das concentrações de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NO}_2^-$ ), as médias foram de  $49,78 \pm 16,79 \mu\text{M}$  no fluido folicular e  $64,63 \pm 28,53 \mu\text{M}$  no plasma sanguíneo. Foi identificada uma correlação estatisticamente significativa entre as concentrações de ERN no sangue e no microambiente folicular, sugerindo uma dinâmica distinta de distribuição ou produção desses radicais livres. A Figura 14 apresenta as correlações entre os marcadores de estresse oxidativo, avaliando as interações entre as ERO no fluido

folicular e a razão GSSG/GSH no sangue, assim como as ERN no plasma sanguíneo e no fluido folicular.



**Figura 14.** Correlações entre os marcadores de estresse oxidativo no sangue e no fluido folicular. (A) Correlação positiva significativa entre as concentrações de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) no fluido folicular e a razão GSSG/GSH no sangue, indicando que o aumento do estresse oxidativo sistêmico pode influenciar diretamente o microambiente folicular. (B) Correlação positiva significativa entre os níveis de Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN) no plasma sanguíneo e no fluido folicular, sugerindo uma conexão entre os estados oxidativos nos dois compartimentos. GSSG = glutationa oxidada; GSH = glutationa reduzida;  $r$  = coeficiente de correlação de Spearman. São consideradas diferenças significativas com  $p < 0,05$ .

Fonte: Autoria própria.

A Figura 14 apresenta dados importantes sobre a relação entre os marcadores de estresse oxidativo sistêmico e local no contexto da fertilidade feminina. A correlação positiva entre as concentrações de ERO no fluido folicular e a razão GSSG/GSH no sangue, observadas na Figura 14 (A), sugere que o aumento do estresse oxidativo sistêmico está diretamente ligado à intensificação desse processo no ambiente folicular. A razão GSSG/GSH é um indicador sensível do estado redox do organismo. Fisiologicamente, uma baixa razão GSSG/GSH reflete um sistema antioxidante eficiente, capaz de neutralizar as ERO e preservar a integridade celular (ALKAZEMI; RAHMAN & HABRA, 2021; AITKEN et al., 2022). Porém, foi observado que a razão se manteve elevada, indicando maior estado oxidativo.

Embora o aumento dessa razão indique maior carga oxidativa, a correlação positiva observada sugere que o sistema antioxidante das pacientes está respondendo, ajustando a proporção de GSSG para GSH em resposta ao aumento das ERO. Isso reflete a capacidade do organismo de lidar com o estresse oxidativo de forma adaptativa, evitando, até certo ponto, que

os danos oxidativos se acumulem (WARZYCH & LIPINSKA, 2020). Entretanto, reduções persistentes nos níveis de GSH ou um aumento significativo na razão GSSG/GSH podem comprometer essa capacidade adaptativa, levando a uma maior suscetibilidade ao estresse oxidativo, o que poderia afetar processos fundamentais, como a maturação ovocitária, a fertilização e o desenvolvimento embrionário (KARABULUT et al., 2020; ZHANG et al., 2020b; AITKEN, 2022; BARROSO-VILLA et al., 2023; KALTSAS et al., 2023). Estudos demonstraram que altos níveis de GSH no fluido folicular estão associados a melhores taxas de fertilização e desenvolvimento embrionário. Por outro lado, um aumento na razão GSSG/GSH é relacionado à redução da qualidade dos ovócitos e ao comprometimento da competência reprodutiva (BABAYEV & DUNCAN, 2022; CHEN; YANG & ZHANG, 2023; HUANG et al., 2023).

É possível observar na Figura 14 (B) uma correlação positiva significativa entre as ERN no plasma sanguíneo e no fluido folicular, indicando uma integração funcional entre os compartimentos sistêmico e local. Esses dados sugerem uma interação dinâmica entre o estado oxidativo sistêmico e o microambiente folicular, levantando a hipótese de que o estresse oxidativo presente no sangue pode influenciar a fisiologia folicular (MAUCHART et al., 2023; ZAHA et al., 2023; SU et al., 2024). No entanto, também é plausível considerar que alterações oxidativas locais, no próprio folículo, contribuem para a liberação de biomarcadores detectáveis na circulação sistêmica, indicando uma relação bidirecional entre esses compartimentos. Estudos prévios corroboram essa relação, mostrando que níveis elevados de radicais livres estão associados a danos ao DNA e disfunções nas células da granulosa, o que compromete a viabilidade dos ovócitos e o desenvolvimento embrionário (MAUCHART et al., 2023; ZAHA et al., 2023; SU et al., 2024).

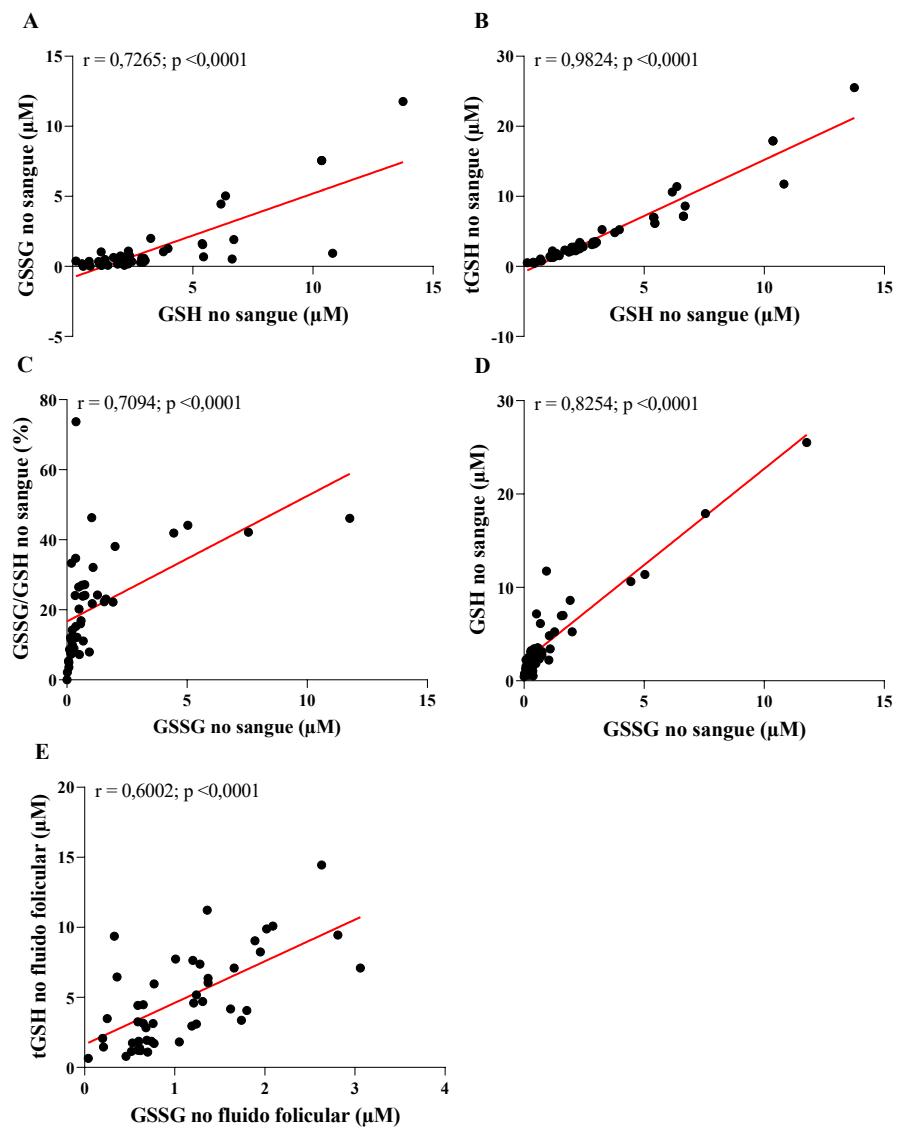
Esses achados reforçam a importância do controle do estresse oxidativo sistêmico para a manutenção de um microambiente folicular saudável e otimização dos resultados reprodutivos. Estratégias para monitorar e modular o estado oxidativo, como a suplementação antioxidant ou intervenções voltadas para reduzir o estresse oxidativo, podem ser exploradas como ferramentas para otimizar os resultados em tratamentos de reprodução assistida. Esses esforços são especialmente relevantes em populações vulneráveis, como mulheres em idade avançada ou submetidas a múltiplos ciclos de tratamento (MAUCHART et al., 2023; ZAHA et al., 2023; SU et al., 2024).

No entanto, é importante considerar que o pequeno tamanho amostral do estudo pode ter limitado a detecção de algumas associações ou influenciado a ausência de significância em

outros parâmetros avaliados. Apesar das correlações significativas observadas, a intensidade dessas relações não é muito alta, como podemos observar pelos valores de  $r$ . Isso pode refletir a complexidade dos mecanismos envolvidos e a influência de múltiplos fatores sistêmicos e locais.

#### 6.2.2. Atividade antioxidante

Os marcadores da atividade antioxidante avaliados neste estudo estão diretamente relacionados à glutationa, um dos antioxidantes endógenos mais importantes no organismo humano. A Figura 15 apresenta as correlações entre diferentes marcadores de glutationa no sangue e no fluido folicular, destacando o funcionamento do sistema antioxidante em diferentes compartimentos.



**Figura 15.** Correlações entre diferentes marcadores de glutationa no sangue e no fluido folicular, avaliando a capacidade antioxidante sistêmica e local. (A) Correlação positiva significativa entre os níveis de glutationa oxidada (GSSG) e glutationa reduzida (GSH) no sangue, indicando um equilíbrio funcional do sistema redox. (B) Correlação positiva entre a glutationa total (tGSH) e a GSH no sangue, reforçando o papel da GSH como principal componente da capacidade antioxidante total. (C) Correlação positiva significativa entre a razão GSSG/GSH e os níveis de GSSG no sangue, sugerindo que o aumento da carga oxidativa altera o equilíbrio redox. (D) Correlação positiva significativa entre GSH e GSSG no sangue, evidenciando uma resposta adaptativa do sistema antioxidante frente ao estresse oxidativo. (E) Correlação positiva significativa entre GSH e GSSG no fluido folicular, indicando que o microambiente folicular reflete o estado redox sistêmico e tenta preservar o equilíbrio antioxidante local.  $r$  = coeficiente de correlação de Spearman. São consideradas diferenças significativas com  $p < 0,05$ .

Fonte: Autoria própria.

A correlação positiva entre GSSG e GSH no sangue ( $r = 0,7265$ ;  $p < 0,0001$ ), apresentada na Figura 15 (A), sugere um equilíbrio dinâmico entre a regeneração da GSH e a conversão para GSSG, indicando que o sistema antioxidante das pacientes está funcional e respondeativamente ao estresse oxidativo. No entanto, a correlação significativa entre a razão GSSG/GSH e os níveis de GSSG (Figura 15C) evidencia que, em situações de maior carga oxidativa, o sistema antioxidante pode se inclinar para um estado mais oxidativo, o que potencialmente compromete a qualidade do ambiente reprodutivo. Estes dados corroboram estudos anteriores que relatam que o aumento na razão GSSG/GSH está relacionado à diminuição da qualidade ovocitária e ao comprometimento da fertilização (ZHANG et al., 2020b; AITKEN et al., 2022; BARROSO-VILLA et al., 2023).

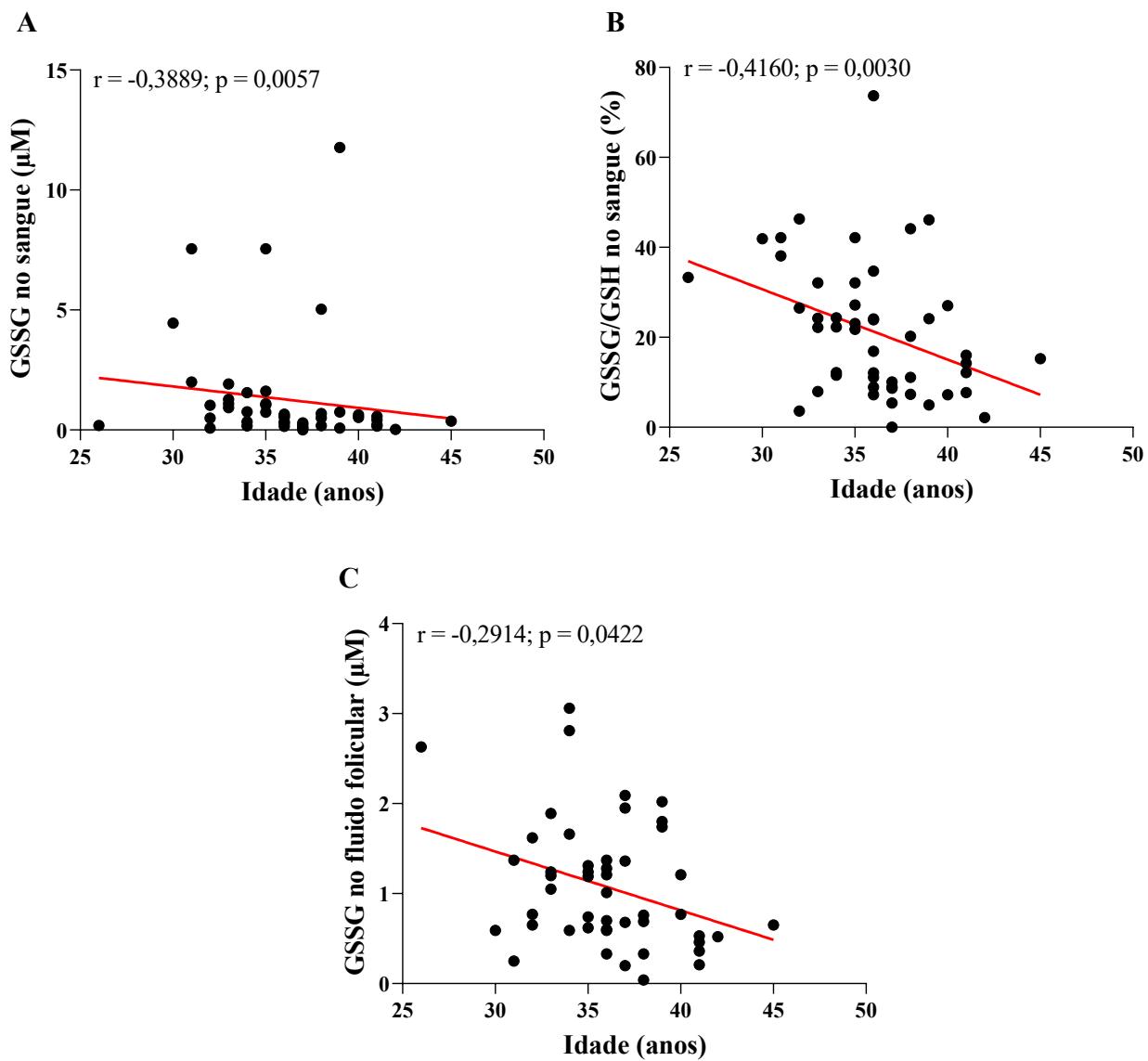
Os resultados apresentados na Figura 15 (B) revelam uma forte correlação positiva entre tGSH e GSH no sangue ( $r = 0,9824$ ;  $p < 0,0001$ ), indicando que a capacidade antioxidante total é predominantemente determinada pelos níveis de GSH. Fisiologicamente, isso reforça o papel central da GSH como principal defesa antioxidante celular, essencial para neutralizar ERO e proteger células reprodutivas contra danos oxidativos (BABAYEV & DUNCAN, 2022). Em contextos reprodutivos, níveis adequados de GSH são particularmente relevantes, pois estão associados à maturação ovocitária e à viabilidade embrionária (AITKEN et al., 2022).

Podemos inferir da Figura 15 (D) que, apesar do aumento nos níveis de GSSG, a GSH também aumenta de maneira proporcional. Esse fato sugere que o sistema antioxidante das pacientes está se adaptando para lidar com o estresse oxidativo, pois o aumento da GSH reflete a capacidade do organismo de manter uma reserva antioxidante total, mesmo em condições de maior carga oxidativa. No entanto, isso também pode refletir uma sobrecarga do sistema redox, na qual o aumento de GSSG sinaliza que as defesas antioxidantes estão sendo constantemente

mobilizadas para neutralizar as ERO, o que pode, eventualmente, comprometer os mecanismos antioxidantes caso a carga oxidativa continue a aumentar (ZHANG et al., 2020b;AITKEN et al., 2022; BARROSO-VILLA et al., 2023). Em contextos reprodutivos, níveis elevados de GSSG podem afetar negativamente a qualidade ovocitária e a saúde do ambiente folicular. No estudo realizado por Babayev & Duncan, (2022). foi constatado que durante os ciclos de estimulação ovariana há um aumento significativo nos níveis de GSSG no fluido folicular. Esse achado reflete uma maior atividade metabólica associada à carga oxidativa local.

No microambiente folicular, os dados também mostram uma correlação positiva entre GSH e GSSG ( $r = 0,6002$ ;  $p < 0,0001$ ) (Figura 15E), indicando que o estado antioxidant local reflete, em parte, o estado sistêmico. Isso significa que, embora exista uma relação direta entre os marcadores antioxidantes do sangue e do fluido folicular, o equilíbrio redox local não é totalmente dependente do sistema circulatório. O microambiente folicular é influenciado por fatores adicionais, como o metabolismo das células da granulosa, a permeabilidade da barreira folículo-sangue e os níveis de hormônios e nutrientes específicos (ONAOLAPO et al., 2023; SCHÜTZ & BATALHA, 2024). Esses fatores podem modular o estado redox de forma independente, criando um ambiente antioxidante com características próprias. Esse achado é fisiologicamente relevante porque o fluido folicular é o ambiente imediato dos ovócitos, e seu equilíbrio redox desempenha um papel fundamental na proteção contra danos oxidativos (ONAOLAPO et al., 2023).

Em relação aos parâmetros reprodutivos e demográficos, o presente estudo avaliou as relações entre a idade das pacientes e os marcadores de glutationa, proporcionando uma visão integrada do impacto do envelhecimento sobre o sistema antioxidante. A Figura 16 apresenta os resultados dessas análises.



**Figura 16.** Relação entre a idade das pacientes e os marcadores de glutationa no sangue e no fluido folicular. (A) Correlação negativa significativa entre os níveis de glutationa oxidada (GSSG) no sangue e a idade das pacientes, sugerindo uma redução na capacidade de reciclagem de GSH em GSSG com o aumento da idade. (B) Correlação negativa significativa entre a razão GSSG/GSH no sangue e a idade, indicando uma diminuição na eficiência do equilíbrio redox sistêmico em mulheres mais velhas. (C) Correlação negativa significativa entre os níveis de GSSG no fluido folicular e a idade, refletindo a redução da capacidade antioxidante local no microambiente folicular com o avanço da idade.  $r$  = coeficiente de correlação de Spearman. São consideradas diferenças significativas com  $p < 0,05$ .

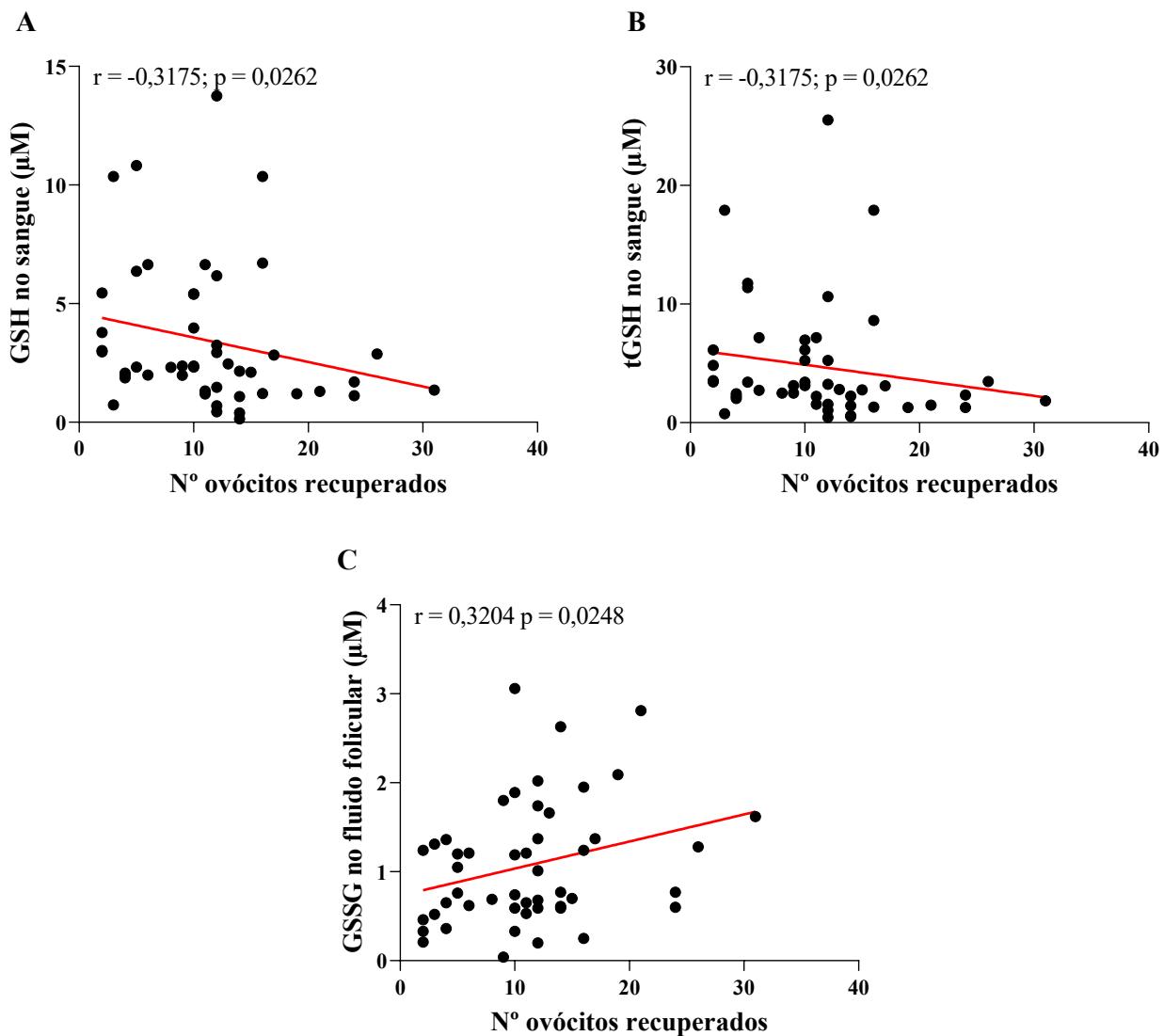
Fonte: Autoria própria.

Os dados apresentados na Figura 16 destacam como o envelhecimento afeta a eficiência do sistema antioxidante, tanto no contexto sistêmico quanto no ambiente local do folículo. Na Figura 16 (A), a correlação negativa ( $r = 0,3889; p = 0,0057$ ) entre os níveis de GSSG no sangue

e a idade das pacientes sugere que, com o passar dos anos, há uma redução nos níveis de GSSG. Essa diminuição pode refletir uma redução na capacidade do organismo de reciclar GSH em GSSG, indicando um declínio na eficiência do sistema redox. Esse declínio pode comprometer a capacidade antioxidante total, impactando negativamente os processos reprodutivos (AITKEN et al., 2022; BARROSO-VILLA et al., 2023; ONAOLAPO et al., 2023). Nas Figuras 16 (B e C), a razão GSSG/GSH no sangue e os níveis de GSSG no fluido folicular também apresentam uma correlação negativa com a idade, indicando que o equilíbrio redox se torna menos eficiente em mulheres mais velhas. Essa redução no mecanismo antioxidante pode refletir a menor capacidade do organismo de lidar com o aumento do estresse oxidativo associado ao envelhecimento, comprometendo assim a qualidade ovocitária e a viabilidade dos embriões.

De maneira a corroborar os resultados apresentados, o estudo conduzido por Seshadri et al., (2021) evidenciou que o microambiente folicular de mulheres mais velhas apresenta uma elevação nos níveis de ERO acompanhada de uma redução na capacidade antioxidante, comprometendo significativamente a qualidade dos ovócitos e o processo de maturação.

A relação entre os níveis de marcadores de glutationa no sangue e no fluido folicular e o número de ovócitos recuperados durante os tratamentos reprodutivos também foi explorada. Os achados destacam diferenças importantes no comportamento antioxidante sistêmico e local em relação à quantidade de gametas obtidos. A Figura 17 apresenta essas correlações, evidenciando como o equilíbrio redox é influenciado pela quantidade de ovócitos recuperados.



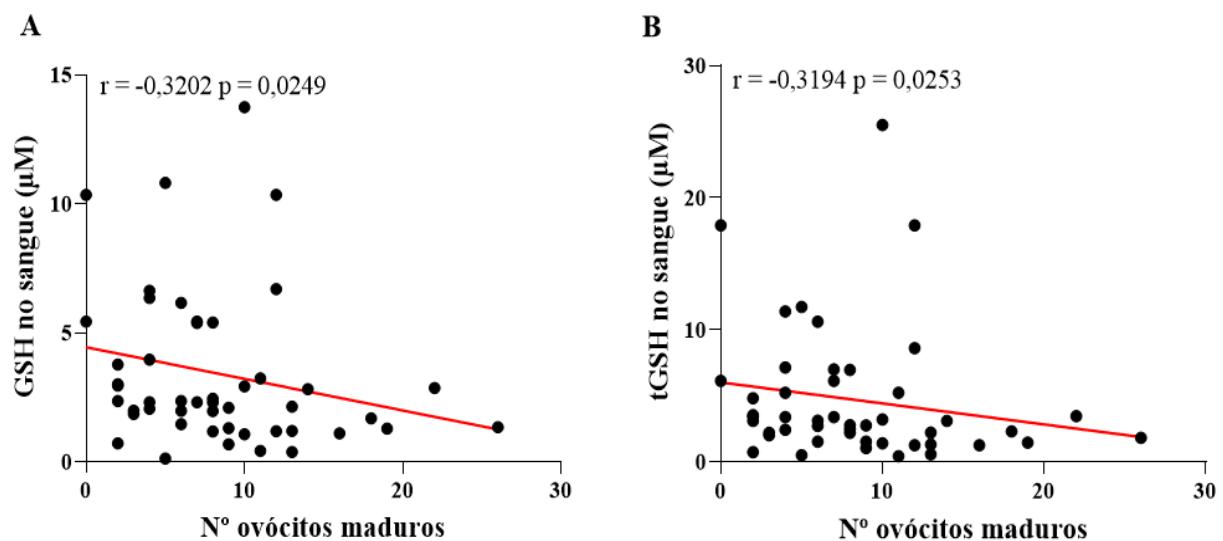
**Figura 17.** Relações entre os níveis de marcadores de glutationa no sangue e no fluido folicular e o número de ovócitos recuperados. (A) Correlação negativa significativa entre os níveis de glutationa reduzida (GSH) no sangue e o número de ovócitos recuperados, sugerindo que o aumento na recuperação de ovócitos está associado a um consumo maior de antioxidantes sistêmicos. (B) Correlação negativa significativa entre os níveis de glutationa total (tGSH) no sangue e o número de ovócitos recuperados, indicando o impacto da estimulação ovariana sobre a capacidade antioxidante sistêmica. (C) Correlação positiva significativa entre os níveis de glutationa oxidada (GSSG) no fluido folicular e o número de ovócitos recuperados, refletindo uma intensificação da atividade metabólica local e da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) no ambiente folicular com o aumento da quantidade de ovócitos obtidos.  $r$  = coeficiente de correlação de Spearman. São consideradas diferenças significativas com  $p < 0,05$ .

Fonte: Autoria própria.

No sangue, os resultados sugerem que, conforme aumenta o número de ovócitos recuperados, há um consumo maior de antioxidantes sistêmicos, possivelmente devido à maior

demanda metabólica e ao aumento do estresse oxidativo induzido pela hiper estimulação ovariana (Figura 17 A-B) (BABAYEV & DUNCAN, 2022). Por outro lado, no microambiente folicular, os níveis de GSSG apresentaram uma correlação positiva com o número de ovócitos recuperados. Esse aumento proporcional de GSSG local sugere que, à medida que mais ovócitos são obtidos, ocorre uma intensificação da atividade metabólica no ambiente folicular. Essa maior atividade está frequentemente associada a um aumento na produção de ERO, resultante do metabolismo celular elevado. Embora esse processo seja esperado durante a estimulação ovariana, níveis excessivos de ERO podem superar as defesas antioxidantes disponíveis no fluido folicular, potencialmente comprometendo a qualidade dos ovócitos e a sua capacidade de fertilização (HAMAD et al., 2021; AITKEN et al., 2022; CHEN; YANG & ZHANG, 2023; HUANG et al., 2023).

A Figura 18 apresenta a relação entre os níveis de GSH e tGSH no sangue e o número de ovócitos maduros obtidos durante os tratamentos reprodutivos. Esses gráficos exploram como o consumo de antioxidantes sistêmicos se correlaciona com o processo de maturação ovocitária, que é metabolicamente intenso e gera um aumento na produção de espécies reativas de ERO.



**Figura 18.** Relações entre os níveis de glutationa reduzida (GSH) e glutationa total (tGSH) no sangue e o número de ovócitos maduros. (A) Correlação negativa significativa entre os níveis de GSH no sangue e o número de ovócitos maduros, sugerindo maior consumo de antioxidantes sistêmicos durante o processo de maturação ovocitária. (B) Correlação negativa significativa entre os níveis de tGSH no sangue e o número de ovócitos maduros, indicando uma redução na capacidade antioxidante global associada à maior demanda metabólica.  $r$  = coeficiente de correlação de Spearman. São consideradas diferenças significativas com  $p < 0,05$ .

Fonte: Autoria própria.

Os gráficos apresentados na Figura 18 (A-B) mostram uma correlação negativa entre os níveis de GSH e tGSH ( $r = -0,3204$ ;  $p = 0,0249$  e  $r = -0,3194$ ;  $p = 0,0253$ , respectivamente) no sangue, com o número de ovócitos maduros. Esses achados sugerem que, à medida que o número de ovócitos maduros aumenta, ocorre uma redução nos níveis desses biomarcadores, indicando maior consumo de antioxidantes sistêmicos para lidar com o estresse oxidativo gerado pelo processo de maturação ovocitária. A literatura aponta que a maturação dos ovócitos é um processo metabolicamente intenso, que eleva a produção de ERO, aumentando a demanda por mecanismos antioxidantes sistêmicos, como a glutationa (ZHANG et al., 2020b; AITKEN et al., 2022). Essa redução pode refletir a sobrecarga do sistema antioxidante em situações de maior atividade metabólica, o que pode impactar a qualidade ovocitária e os desfechos reprodutivos.

Por fim, os resultados indicam que o equilíbrio redox desempenha um papel essencial na qualidade ovocitária, particularmente em processos de alta demanda metabólica, como a recuperação e maturação dos ovócitos. Os dados também destacam o impacto do envelhecimento e da estimulação ovariana sobre o sistema antioxidante, evidenciando uma redução na capacidade de neutralizar as ERO. Esses achados apontam para a necessidade de estratégias clínicas voltadas à proteção antioxidante em pacientes mais vulneráveis e de estudos futuros para explorar melhor esses mecanismos e seus efeitos nos desfechos reprodutivos.

## 7. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo evidenciam a glutationa como um marcador redox robusto, sensível e clinicamente promissor para a avaliação da fertilidade feminina. Foram observadas correlações altamente significativas entre os diferentes marcadores de glutationa no sangue, em especial a glutationa nas formas reduzida (GSH), oxidada (GSSG) e total (tGSH), assim como entre seus níveis no plasma e no fluido folicular, sugerindo forte interdependência entre os sistemas redox sistêmico e local. Essa relação fortalece a hipótese de que o perfil redox periférico pode refletir, ao menos parcialmente, o microambiente folicular, oferecendo uma via promissora para avaliações clínicas menos invasivas e mais abrangentes.

Além disso, o estudo demonstrou que o avanço da idade e a repetição de ciclos de estimulação ovariana comprometem progressivamente a capacidade antioxidante, impactando negativamente parâmetros reprodutivos como o número de ovócitos maduros, blastocistos formados e taxas de gravidez. A uniformidade etária entre as participantes contribuiu para análises mais robustas, permitindo identificar correlações consistentes entre biomarcadores e

indicadores clínicos, como a contagem de folículos antrais (CFA), reforçando o papel do estresse oxidativo como fator determinante na qualidade ovocitária.

Por fim, para que esses biomarcadores sejam aplicados de forma eficaz na prática clínica, é necessário estabelecer valores de referência a partir de grupos controle compostos por mulheres férteis. A razão GSH/GSSG, por exemplo, apresenta potencial para uso como ferramenta prognóstica da qualidade folicular. Com base nesses parâmetros, pacientes com perfis oxidativos desfavoráveis poderiam se beneficiar de intervenções personalizadas, como estratégias nutricionais antioxidantes. Além disso, a quantificação de ERO e ERN em amostras sanguíneas pode auxiliar na personalização dos protocolos de estimulação ovariana, contribuindo para melhores desfechos clínicos em reprodução assistida.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, A.; APONTE-MELLADO, A.; PREMKUMAR, B. J.; SHAMAN, A.; GUPTA, S. The effects of oxidative stress on female reproduction: A review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, 2012. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-10-49>.
- AITKEN, R. J. Oxidative stress and reproductive function. **Reproduction**, 2022. <https://doi.org/10.1530/REP-22-0368>.
- AITKEN, R. J.; BROMFIELD, E. G.; GIBB, Z.; AITKEN, J. The impact of oxidative stress on reproduction: a focus on gametogenesis and fertilization. **Reproduction**, 2022. <https://doi.org/10.1530/REP-22-0126>.
- ALHAYAZA, R.; HAQUE, E.; KARBASIAFSHAR, C.; SELLKE, F. W.; ABID, M. R. The Relationship Between Reactive Oxygen Species and Endothelial Cell Metabolism. **Frontiers in Chemistry**, 2020. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.592688>
- ALKAZEMI, D.; RAHMAN, A.; HABRA, B. Alterations in glutathione redox homeostasis among adolescents with obesity and anemia. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82579-5>
- ALMANSA-ORDONEZ, A.; BELLIDO, R.; VASSENA, R.; BARRAGAN, M.; ZAMBELLI, F. Oxidative stress in reproduction: A mitochondrial perspective. **Biology**, 2020. <https://doi.org/10.3390/biology9090269>.

ALTERI, A. et al. ESHRE guideline: number of embryos to transfer during IVF/ICSI. **Human Reproduction**, v. 39, n. 4, p. 647–657, 2024. <https://doi.org/10.1093/humrep/deae010>

AMIRI, M.; TEHRANI, F. R. Potential Adverse Effects of Female and Male Obesity on Fertility: A Narrative Review. **International Journal of Endocrinology and Metabolism**, 2020. <https://doi.org/10.5812/ijem.101776>.

ANGELIS, C. DE et al. Smoke, alcohol and drug addiction and female fertility. **Reproductive Biology and Endocrinology**, 2020. <https://doi.org/10.1186/s12958-020-0567-7>.

AVERILL-BATES. The antioxidant glutathione. **Vitam Horm.** n. 121. p. 109-141. 2023. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2022.09.002>.

AWONUGA, A. O.; CAMP, O. G.; ABU-SOUD, H. M. A review of nitric oxide and oxidative stress in typical ovulatory women and in the pathogenesis of ovulatory dysfunction in PCOS. **Reproductive Biology and Endocrinology**, 2023. <https://doi.org/10.1186/s12958-023-01159-6>

BABAYEV, E.; DUNCAN, F. E. Age-Associated changes in cumulus cells and follicular fluid: The local oocyte microenvironment as a determinant of gamete quality. **Biology of Reproduction**, v. 106, n. 2, p. 351–365, 2022. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioab241>

BAHR, J. M. Ovary, overview. **Encyclopedia of Reproduction**. Elsevier, 2018. p. 3–7. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64389-1>.

BALLI, M.; CECCHELE, A.; PISATURO, V.; MAKIEVA, S.; CARULLO, G.; SOMIGLIANA, E.; PAFFONI, A.; VIGANO', P. Opportunities and Limits of Conventional IVF versus ICSI: It Is Time to Come off the Fence. **Journal of Clinical Medicine**, 2022. <https://doi.org/10.3390/jcm11195722>

BANERJEE, P.; BHATTACHARYA, J. Impact of Oxidative stress on Infertility, with emphasis on infertility management strategies. **Global Journal of Fertility and Research**, v. 4, n. 1, p. 010–018, 2019. <https://doi.org/10.17352/gjfr.000012>

BAO, S., YIN, T. & LIU, S. Ovarian aging: energy metabolism of oocytes. **Journal Ovarian Res**, v. 17, n. 118, 2024. <https://doi.org/10.1186/s13048-024-01427-y>

BARBOSA, P. O.; TANUS-SANTOS, J. E.; CAVALLI, R. DE C.; BENGTSSON, T.; MONTENEGRO, M. F.; SANDRIM, V. C. The Nitrate-Nitrite-Nitric Oxide Pathway: Potential

Role in Mitigating Oxidative Stress in Hypertensive Disorders of Pregnancy. **Nutrients**, 2024. <https://doi.org/10.3390/nu16101475>

BARROSO-VILLA, G.; VALDESPIN-FIERRO, C.; WEISER-SMEKE, A. E.; MACHARGO-GORDILLO, A. P.; FLORES-PLIEGO, A.; PALMA-LARA, I.; OEHNINGER, S. Follicular fluid biomarkers for prediction of human IVF outcome in women with poor ovarian response. **Middle East Fertility Society Journal**, v. 28, n. 1, 2023. <https://doi.org/10.1186/s43043-023-00128-8>

BOSCH, E. et al. ESHRE guideline: Ovarian stimulation for IVF/ICSI. **Human Reproduction**, 2021. <https://doi.org/10.1093/hropen/hoaa009>.

BOURRION, B.; PANJO, H.; BITHOREL, P. L.; LA ROCHEBROCHARD, E. DE; FRANÇOIS, M.; PELLETIER-FLEURY, N. The economic burden of infertility treatment and distribution of expenditures overtime in France: a self-controlled pre-post study. **BMC Health Services Research**, v. 22, n. 1, 2022. <https://doi.org/10.1186/s12913-022-07725-9>

BRAUTSCH, L. A. S.; VOSS, I.; SCHMIDT, L.; VASSARD, D. Social disparities in the use of ART treatment: a national register-based cross-sectional study among women in Denmark. **Human Reproduction**, v. 38, n. 3, p. 503–510, 2023. <https://doi.org/10.1093/humrep/deac247>

BRINSON, A. K.; SILVA, S. G. DA; HESKETH, K. R.; EVENSON, K. R. Impact of Physical Activity and Sedentary Behavior on Spontaneous Female and Male Fertility: A Systematic Review. **Journal of Physical Activity and Health**, v. 20, n. 7, p. 600–615, 2023. <https://doi.org/10.1123/jpah.2022-0487>

BULL, F. C. et al. World Health Organization 2020 guidelines on physical activity and sedentary behaviour. **British Journal of Sports Medicine**, 2020. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2020-102955>

CARSON, S. A.; KALLEN, A. N. Diagnosis and Management of Infertility: A Review. **Journal of the American Medical Association**, 2021. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.4788>

CHAUDHARY, P.; JANMEDA, P.; DOCEA, A. O.; YESKALIYEVA, B.; ABDULL RAZIS, A. F.; MODU, B.; CALINA, D.; SHARIFI-RAD, J. Oxidative stress, free radicals and antioxidants: potential crosstalk in the pathophysiology of human diseases. **Frontiers in Chemistry**, 2023. <https://doi.org/10.3389/fchem.2023.1158198>.

CHEN, Y.; YANG, J.; ZHANG, L. The Impact of Follicular Fluid Oxidative Stress Levels on the Outcomes of Assisted Reproductive Therapy. **Antioxidants**, 2023. <https://doi.org/10.3390/antiox12122117>

CHUA, S. J. et al. Age-related natural fertility outcomes in women over 35 years: A systematic review and individual participant data meta-analysis. **Human Reproduction**, 2020. <https://doi.org/10.1093/humrep/deaa129>

CUI, J.; WANG, Y. Premature ovarian insufficiency: a review on the role of tobacco smoke, its clinical harm, and treatment. **Journal of ovarian research**, 2024. <https://doi.org/10.1186/s13048-023-01330-y>

DA BROI, M. G.; GIORGI, V. S. I.; WANG, F.; KEEFE, D. L.; ALBERTINI, D.; NAVARRO, P. A. Influence of follicular fluid and cumulus cells on oocyte quality: Clinical implications. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 35, n. 5, p. 735–751, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1143-3>

DELBAERE, I.; VERBIEST, S.; TYDÉN, T. Knowledge about the impact of age on fertility: a brief review. **Journal of Medical Sciences**, 2020. <https://doi.org/10.1080/03009734.2019.1707913>

DERMOLO, M.; ANSA, M.; SIFERIH, M. Ovarian response to controlled stimulation and its predictors in a limited-resource setting. **BMC Women's Health**, v. 24, n. 1, 2024. <https://doi.org/10.1186/s12905-024-02991-7>

DEVESA, J.; CAICEDO, D. The role of growth hormone on ovarian functioning and ovarian angiogenesis. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, p. 1–17, 2019. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00450>

DHAGE, V. D.; NAGTODE, N.; KUMAR, D.; BHAGAT, A. K. A Narrative Review on the Impact of Smoking on Female Fertility. **Cureus**, 2024. <https://doi.org/10.7759/cureus.58389>

DIDZIOKAITE, G.; BILIUTE, G.; GUDAITE, J.; KVEDARIENE, V. Oxidative Stress as a Potential Underlying Cause of Minimal and Mild Endometriosis-Related Infertility. **International Journal of Molecular Sciences**, 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms24043809>

DREJZA, M. A.; RYLEWICZ, K.; MAJCHEREK, E.; GROSS-TYRKIN, K.; MIZGIER, M.; PLAGENS-ROTMAN, K.; WÓJCIK, M.; PANECKA-MYSZA, K.; PISARSKA-

KRAWCZYK, M.; KĘDZIA, W.; JARZĄBEK-BIELECKA, G. Markers of Oxidative Stress in Obstetrics and Gynaecology - A Systematic Literature Review. **Antioxidants**, 2022. <https://doi.org/10.3390/antiox11081477>

DU FOSSÉ, N. A.; HOORN, M. L. P. VAN DER; LITH, J. M. M. VAN; CESSIE, S. LE; LASHLEY, E. E. L. O. Advanced paternal age is associated with an increased risk of spontaneous miscarriage: A systematic review and meta-analysis. **Human Reproduction**, v. 26, n. 5, p. 650–669, 2020. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmaa010>

DUMANOVIC, J.; NEPOVIMOVA, E.; NATIC, M.; KUCA, K.; JAČEVIĆ, V. The Significance of Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense System in Plants: A Concise Overview. **Frontiers in Plant Science**, 2021. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.552969>

DUTTA, S.; SENGUPTA, P. The Role of Nitric Oxide on Male and Female Reproduction. **Malaysian Journal of Medical Sciences**, v. 29, n. 2, p. 18–30, 2022. <https://doi.org/10.21315/mjms2022.29.2.3>

ENNAB, F.; ATIOMO, W. Obesity and female infertility. **Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology**, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2023.102336>

EPPIG, J. J.; O'BRIEN, M.; WIGGLESWORTH, K. Mammalian oocyte growth and development in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, 1996. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199606\)44:2<260::AID-MRD17>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199606)44:2<260::AID-MRD17>3.0.CO;2-6)

ESTEVES, S. C.; ROQUE, M.; BEDOSCHI, G. M.; CONFORTI, A.; HUMAIDAN, P.; ALVIGGI, C. Defining low prognosis patients undergoing assisted reproductive technology: POSEIDON criteria-the why. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, n. 1–10, 2018. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00461>

FAO; IFAD; UNICEF; WFP; WHO. The State of Food Security and Nutrition in the World 2024. <https://doi.org/10.4060/cd1254en>

FIELDER, S.; NICKKHO-AMIRY, M.; SEIF, M. W. Obesity and menstrual disorders. **Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology**, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2023.102343>

FORTUNE, J. E. The early stages of follicular development: Activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3–4, p. 135–163, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(03\)00088-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00088-5)

FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; YANG, M. Y. Follicular development: The role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Animal Reproduction Science**, v. 82–83, p. 109–126, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.031>

GARCÍA-GARCÍA, F. J.; MONISTROL-MULA, A.; CARDELLACH, F.; GARRABOU, G. Nutrition, bioenergetics, and metabolic syndrome. **Nutrients**, 2020. <https://doi.org/10.3390/nu12092785>

GARCÍA-ROCHE, M.; CASAL, A.; CARRIQUIY, M.; RADI, R.; QUIJANO, C.; CASSINA, A. Respiratory analysis of coupled mitochondria in cryopreserved liver biopsies. **Redox Biology**, v. 17, p. 207–212, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.03.008>

GIUSTARINI, D.; ROSSI, R.; MILZANI, A.; DALLE-DONNE, I. Nitrite and Nitrate Measurement by Griess Reagent in Human Plasma: Evaluation of Interferences and Standardization. **Methods in Enzymology**, v. 440, p. 361–380, 2008. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)00823-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)00823-3)

GOUGEON, A. Regulation of ovarian follicular development in primates: Facts and hypotheses. **Endocrine Reviews**, v. 17, n. 2, p. 121–155, 1996. <https://doi.org/10.1210/edrv-17-2-121>

GOUGEON, A. Croissance folliculaire dans l'ovaire humain: de l'entrée en croissance du follicule primordial jusqu'à la maturation préovulatoire. **Annales d'Endocrinologie**, v. 71, n. 3, p. 132–143, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2010.02.021>

GRIFFITH, O. W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. **Analytical Biochemistry**, v. 106, n. 1, p. 207–212, 1980. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(80\)90139-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90139-6)

GUERRIERO, G.; D'ERRICO, G. Effect of Oxidative Stress on Reproduction and Development. **Antioxidants**, 2022. <https://doi.org/10.3390/antiox11020312>

HAMAD, A.; ELSHAHAWY, M.; NEGM, A.; MANSOUR, F. R. Analytical methods for determination of glutathione and glutathione disulfide in pharmaceuticals and biological fluids. **Reviews in Analytical Chemistry**, v. 38, n. 4, 2021. <https://doi.org/10.1515/revac-2019-0019>

HAMED, S.; EGOZI, D.; KRUCHEVSKY, D.; TEOT, L.; GILHAR, A.; ULLMANN, Y. Erythropoietin improves the survival of fat tissue after its transplantation in nude mice. **PLoS ONE**, v. 5, n. 11, 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013986>

HAVRLJENKO, J.; KOPITOVIC, V.; PJEVIC, A. T.; MILATOVIC, S.; PAVLICA, T.; ANDRIC, N.; POGRMIC-MAJKIC, K. The Prediction of IVF Outcomes with Autologous Oocytes and the Optimal MII Oocyte/Embryo Number for Live Birth at Advanced Maternal Age. **Medicina (Lithuania)**, v. 59, n. 10, 2023. <https://doi.org/10.3390/medicina59101799>

HENRY, L.; NISOLLE, M. Current Challenges and Future Prospects in Human Reproduction and Infertility. **Medicina (Lithuania)**, 2024. <https://doi.org/10.3390/medicina60101627>

HERNÁNDEZ-RUIZ, Á.; GARCÍA-VILLANOVA, B.; GUERRA-HERNÁNDEZ, E. J.; CARRIÓN-GARCÍA, C. J.; AMIANO, P.; SÁNCHEZ, M. J.; MOLINA-MONTES, E. Oxidative Balance Scores (OBSs) Integrating Nutrient, Food and Lifestyle Dimensions: Development of the NutrientL-OBS and FoodL-OBS. **Antioxidants**, v. 11, n. 2, 2022. <https://doi.org/10.3390/antiox11020300>

HUANG, Y.; CHENG, Y.; ZHANG, M.; XIA, Y.; CHEN, X.; XIAN, Y.; LIN, D.; XIE, S.; GUO, X. Oxidative stress and inflammatory markers in ovarian follicular fluid of women with diminished ovarian reserve during in vitro fertilization. **Journal of Ovarian Research**, v. 16, n. 1, 2023a. <https://doi.org/10.1186/s13048-023-01293-0>

JIANG, S.; LIU, H.; LI, C. Dietary Regulation of Oxidative Stress in Chronic Metabolic Diseases. **Foods**, v. 10, n. 1854, 2021. <https://doi.org/10.3390/foods10081854>

JOMOVA, K.; ALOMAR, S. Y.; ALWASEL, S. H.; NEPOVIMOVA, E.; KUCA, K.; VALKO, M. Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: antioxidant enzymes, nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight antioxidants. **Archives of Toxicology**, 2024. <https://doi.org/10.1007/s00204-024-03696-4>

JOMOVA, K.; RAPTOVA, R.; ALOMAR, S. Y.; ALWASEL, S. H.; NEPOVIMOVA, E.; KUCA, K.; VALKO, M. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants:

chronic diseases and aging. **Archives of Toxicology**, 2023. <https://doi.org/10.1007/s00204-023-03562-9>

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia Básica. **Texto e Atlas**. 12<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: v. 53. ISBN: 9788578110796

KALTSAS, A.; ZIKOPOULOS, A.; MOUSTAKLI, E.; ZACHARIOU, A.; TSIRKA, G.; TSIAMPALI, C.; PALAPELA, N.; SOFIKITIS, N.; DIMITRIADIS, F. The Silent Threat to Women's Fertility: Uncovering the Devastating Effects of Oxidative Stress. **Antioxidants**, 2023. <https://doi.org/10.3390/antiox12081490>

KARABULUT, S.; KORKMAZ, O.; KUTLU, P.; GOZEL, H. E.; KESKIN, I. Effects of follicular fluid oxidative status on human mural granulosa cells, oocyte competency and ICSI parameters. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, v. 252, p. 127–136, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2020.06.021>

KEHM, R.; BALDENSPERGER, T.; RAUPBACH, J.; HÖHN, A. Protein oxidation - Formation mechanisms, detection and relevance as biomarkers in human diseases. **Redox Biology**, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101901>

KINKADE, C. W.; RIVERA-NÚÑEZ, Z.; GORCYZCA, L.; ALEKSUNES, L. M.; BARRETT, E. S. Impact of fusarium-derived mycoestrogens on female reproduction: A systematic review. **Toxins**, v. 13, n. 6, 2021. <https://doi.org/10.3390/toxins13060373>

KUSHNIR, V. A.; SMITH, G. D.; ADASHI, E. Y. The Future of IVF: The New Normal in Human Reproduction. **Reproductive Sciences**, v. 29, n. 3, p. 849–856, 2022. <https://doi.org/10.1007/s43032-021-00829-3>

LA MARCA, A.; LONGO, M.; SIGHINOLFI, G.; GRISENDI, V.; IMBROGN. New insights into the role of LH in early ovarian follicular growth: a possible tool to optimize follicular recruitment. **RBMO**, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2023.103369>

LA ROSA, C. L.; GARCÍA-RUIZ, C.; FERNÁNDEZ-CHECA, J. C. Glutathione in mammalian biology. **Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants**, p. 617–644, 2012. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-30018-9\\_40](https://doi.org/10.1007/978-3-642-30018-9_40)

LI, L.; SHI, X.; SHI, Y.; WANG, Z. The Signaling Pathways Involved in Ovarian Follicle Development. **Frontiers in Physiology**, 2021. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.730196>

LONGOBARDI, S.; KLINGER, F. G.; ZHENG, W.; CAMPITIELLO, M. R.; D'HOOGHE, T.; MARCA, A. LA. Gonadotropin Activity during Early Folliculogenesis and Implications for Polycystic Ovarian Syndrome and Premature Ovarian Insufficiency: A Narrative Review. **International Journal of Molecular Sciences**, 2024. <https://doi.org/10.3390/ijms25147520>

LU, J.; WANG, Z.; CAO, J.; CHEN, Y.; DONG, Y. A novel and compact review on the role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0391-5>

LU, X. M.; LIU, Y. B.; ZHANG, D. D.; CAO, X.; ZHANG, T. C.; LIU, M.; SHI, H. J.; DONG, X.; LIU, S. Y. Effect of advanced paternal age on reproductive outcomes in IVF cycles of non-male-factor infertility: a retrospective cohort study. **Asian Journal of Andrology**, v. 25, n. 2, p. 245–251, 2023. <https://doi.org/10.4103/aja202234>

MALO, C.; OLIVÁN, S.; OCHOA, I.; SHIKANOV, A. In Vitro Growth of Human Follicles: Current and Future Perspectives. **International Journal of Molecular Sciences**, 2024. <https://doi.org/10.3390/ijms25031510>

MARINELLI, S.; NAPOLETANO, G.; STRACCAMORE, M.; BASILE, G. Female obesity and infertility: outcomes and regulatory guidance. **Acta Biomedica**, 2022. <https://doi.org/10.23750/abm.v93i4.13466>

MAUCHART, P.; VASS, R. A.; NAGY, B.; SULYOK, E.; BÓDIS, J.; KOVÁCS, K. Oxidative Stress in Assisted Reproductive Techniques, with a Focus on an Underestimated Risk Factor. **Current Issues in Molecular Biology**, 2023. <https://doi.org/10.3390/cimb45020083>

MAY-PANLOUP, P.; BOGUENET, M.; HACHEM, H. EL; BOUET, P. E.; REYNIER, P. Embryo and its mitochondria. **Antioxidants**, 2021. <https://doi.org/10.3390/antiox10020139>

MUKHERJEE, I.; DHAR, R.; SINGH, S.; SHARMA, J. B.; NAG, T. C.; MRIDHA, A. R.; JAISWAL, P.; BISWAS, S.; KARMAKAR, S. Oxidative stress-induced impairment of trophoblast function causes preeclampsia through the unfolded protein response pathway. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97799-y>

MUSSAWAR, M.; BALSOM, A. A.; TOTOSY DE ZEPETNEK, J. O.; GORDON, J. L. The effect of physical activity on fertility: a mini review. **F and S Reports**, v. 4, n. 2, p. 150–158, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.xfre.2023.04.005>

NADIA, A. et al. Prokineticin 1 (PROK1) is a new biomarker of human oocyte competence: expression and hormonal regulation throughout late folliculogenesis. **Biol Reprod**, v. 101, p. 832- 841, 2019. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox114>

NEGRIS, O.; LAWSON, A.; BROWN, D.; WARREN, C.; GALIC, I.; BOZEN, A.; SWANSON, A.; JAIN, T. Emotional stress and reproduction: what do fertility patients believe? **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, 2021. <https://doi.org/10.1007/s10815-021-02079-3>

NJAGI, P.; ARSENIJEVIC, J.; GROOT, W. Decomposition of changes in socioeconomic inequalities in catastrophic health expenditure in Kenya. **PLoS ONE**, v. 15, n. 12, 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244428>

OLSZAK-WASIK, K.; BEDNARSKA-CZERWIŃSKA, A.; OLEJEK, A.; TUKIENDORF, A. From “every Day” Hormonal to Oxidative Stress Biomarkers in Blood and Follicular Fluid, to Embryo Quality and Pregnancy Success? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 1–11, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244428>

ONAOLAPO, M. C.; NZEKWE, S. C.; LATEEF, O.; OLABISI, V. O.; AMOS, H.; AJAYI, A.; FOLORUNSHO, A. Importance of Oxidative Stress Mechanism in Reproductive Functions and Infertility. **Importance of Oxidative Stress and Antioxidant System in Health and Disease**. ISBN: 978-1-80356-330-5

PEARL, R.; FAIRCHILD, T. E. Studies on the physiology of reproduction in the domestic fowl. XIX. On the influence of free choice of food materials on winter egg production and body weight. **The American Journal of Hygiene**, v. 1, n. 3, p. 253–277, 1921. <https://doi.org/10.7723/antiochreview.72.3.0546>

PIZARRO, B. M. et al. Estradiol and Progesterone Levels are Related to Redox Status in the Follicular Fluid During In Vitro Fertilization. **Journal of the Endocrine Society**, v. 4, n. 7, p. 1–18, 2020. <https://doi.org/10.1210/jendso/bvaa064>

RAHMAN, I.; KODE, A.; BISWAS, S. K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 3159–3165, 2007. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.378>

REIG, A.; GARCIA-VELASCO, J. A.; SELI, E. Bologna vs. POSEIDON criteria as predictors of the likelihood of obtaining at least one euploid embryo in poor ovarian response: an analysis of 6,889 cycles. **Fertility and Sterility**, v. 120, n. 3, p. 605–614, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2023.05.007>

RESHEF, E. A.; ROBLES, A.; HYNES, J. S.; TUROCY, J. M.; FORMAN, E. J. A review of factors influencing the implantation of euploid blastocysts after in vitro fertilization. **F and S Reviews**, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.xfnr.2022.03.001>

RODRIGUES, A. & PAULINI, F. Sistema reprodutor feminino. In: **Educação sexual na escola. Curso básico para profissionais do ensino fundamental e médio**. Gati, Christiano & Paulini, Fernanda. Ed. CRV. 2023. ISBN: 978-65-251-4794-9

SCHÜTZ, L. F.; BATALHA, I. M. Granulosa Cells: Central Regulators of Female Fertility. **Endocrines**, v. 5, n. 4, p. 547–565, 2024. <https://doi.org/10.3390/endocrines5040040>

SEGAL, T. R.; GIUDICE, L. C. Before the beginning: environmental exposures and reproductive and obstetrical outcomes. **Fertility and Sterility**, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.08.001>

SESHADRI, S.; MORRIS, G.; SERHAL, P.; SAAB, W. Assisted conception in women of advanced maternal age. **Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynecology**, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.08.001>

SIES, H. Oxidative Stress: Introductory Remarks. **Oxidative Stress**. Elsevier, 1985. p. 1–8. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-642760-8.50005-3>

STAICU, F. D.; CANHA-GOUVEIA, A.; SORIANO-ÚBEDA, C.; MARTÍNEZ-SOTO, J. C.; ADOAMNEI, E.; CHAVARRO, J. E.; MATÁS, C. Nitrite and Nitrate Levels in Follicular Fluid from Human Oocyte Donors Are Related to Ovarian Response and Embryo Quality. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, 2021. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.647002>

SU, Z.; DING, P.; SU, W.; LI, XIA; LI, Y.; LI, XIAORAN; LAO, K.; WANG, Y. Association between oxidative balance score and female infertility from the national health and nutrition examination survey 2013–2018. **Frontiers in Endocrinology**, v. 15, 2024. <https://doi.org/10.3389/fendo.2024.1386021>

SUGIURA, K.; MARUYAMA, N.; AKIMOTO, Y.; MATSUSHITA, K.; ENDO, T. Paracrine regulation of granulosa cell development in the antral follicles in mammals. **Reproductive Medicine and Biology**, 2023. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12538>

SUN, Y.; HAO, L.; HAN, W.; LUO, J.; ZHENG, J.; YUAN, D.; YE, H.; LI, Q.; HUANG, G.; HAN, T.; YANG, Z. Intrafollicular fluid metabolic abnormalities in relation to ovarian hyperstimulation syndrome: Follicular fluid metabolomics via gas chromatography-mass spectrometry. **Clinica Chemical Acta**, v. 538, p. 189–202, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2022.11.033>

TERAO, H.; WADA-HIRAIKE, O.; NAGUMO, A.; KUNITOMI, C.; AZHARY, J. M. K.; HARADA, M.; HIRATA, T.; HIROTA, Y.; KOGA, K.; FUJII, T.; OSUGA, Y. Role of oxidative stress in follicular fluid on embryos of patients undergoing assisted reproductive technology treatment. **Journal of Obstetrics and Gynecology Research**, v. 45, n. 9, p. 1884–1891, 2019. <https://doi.org/10.1111/jog.14040>

TREFFON, P. & VIERLING, E. Disrupted Nitric Oxide Homeostasis Impacts Fertility through Multiple Processes Including Protein Quality Control. **Plant Physiol**, 2024.

VAYENA, EFFY.; ROWE, P. J.; GRIFFIN, P. DAVID. Current practices and controversies in assisted reproduction: report of a meeting. Geneva, Switzerland, 17-21 September 2001. **World Health Organization**, 2002. ISBN: 9241590300

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Infertility prevalence estimates**. 2023. ISBN: 978 92 4 0030787

XIE, F.; YOU, Y.; GUAN, C.; GU, Y.; YAO, F.; XU, J. Association between physical activity and infertility: a comprehensive systematic review and meta-analysis. **Journal of Translational Medicine**, 2022. <https://doi.org/10.1186/s12967-022-03426-3>

YANG, H.; KUHN, C.; KOLBEN, T.; MA, Z.; LIN, P.; MAHNER, S.; JESCHKE, U.; SCHÖNFELDT, V. VON. Early life oxidative stress and long-lasting cardiovascular effects on offspring conceived by assisted reproductive technologies: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21155175>

YANG, K.; CAO, F.; XUE, Y.; TAO, L.; ZHU, Y. Three Classes of Antioxidant Defense Systems and the Development of Postmenopausal Osteoporosis. **Frontiers in Physiology**, 2022. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.840293>

YANG, Q.; ZHU, L.; JIN, L. Human Follicle In vitro Culture Including Activation, Growth, and Maturation: A Review of Research Progress. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, n. August, p. 1–9, 2020. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00548>

YAO, X.; LIU, W.; XIE, Y.; XI, M.; XIAO, L. Fertility loss: negative effects of environmental toxicants on oogenesis. **Frontiers in Physiology**, 2023. <https://doi.org/>

YE, X.; BAKER, P. N.; TONG, C. The updated understanding of advanced maternal age. **Fundamental Research**, 2023. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1219045>

WARZYCH, E.; LIPINSKA, P. Advance Publication by J-STAGE Journal of Reproduction and Development. **Journal of Reproduction and Development**, v. 66, n. 1, p. 1–7, 2020. <https://doi.org/10.1262/jrd.2019-102>

ZAHA, I.; MURESAN, M.; TULCAN, C.; HUNIADI, A.; NAGHI, P.; SANDOR, M.; TRIPON, R.; GASPAR, C.; KLAUDIA-MELINDA, M.; SACHELARIE, L.; STEFAN, L. The Role of Oxidative Stress in Infertility. **Journal of Personalized Medicine**, v. 13, n. 8, 2023. <https://doi.org/10.3390/jpm13081264>

ZEBER-LUBECKA, N.; CIEBIERA, M.; HENNIG, E. E. Polycystic Ovary Syndrome and Oxidative Stress—From Bench to Bedside. **International Journal of Molecular Sciences**, 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms241814126>

ZHANG, H.; HUA, L.; LIU, D.; SU, X.; CHEN, JIANLIN; CHEN, JINGFEI. Effects of physical activity on infertility in reproductive females. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 22, n. 1, 2024. <https://doi.org/10.1186/s12958-024-01234-6>

ZHANG, W.; WU, F. Effects of adverse fertility-related factors on mitochondrial DNA in the oocyte: a comprehensive review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, 2023. <https://doi.org/10.1186/s12958-023-01078-6>

ZHANG, X.; WANG, T.; SONG, J.; DENG, J.; SUN, Z. Study on follicular fluid metabolomics components at different ages based on lipid metabolism. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 18, n. 1, 2020. <https://doi.org/10.1186/s12958-020-00599-8>

ZHAO, Q.; ZHANG, Y.; SU, K.; WANG, X. W.; HAI, P. P.; HAN, B.; BIAN, A. P.; GUO, R. X. Vitrification freezing of large ovarian tissue in the human body. **Journal of Ovarian Research**, v. 12, n. 77, p. 1–8, 2019. <https://doi.org/10.1186/s13048-019-0553-x>

ZHENG, L.; YANG, L.; GUO, Z.; YAO, N.; ZHANG, S.; PU, P. Obesity and its impact on female reproductive health: unraveling the connections. **Frontiers in Endocrinology**, 2023. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1326546>

ZOTTA, A.; O'NEILL, L. A. J.; YIN, M. Unlocking potential: the role of the electron transport chain in immunometabolism. **Trends in Immunology**, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.it.2024.02.002>