

Artigo original

EFEITO DOS RADICAIS LIVRES E DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE NA INFERTILIDADE HUMANA

Fausto Pierdoná Guzen¹
Priscila Figueiredo Brito Guzen²
Orlando Takemura³
Nélida Thayna Treveisan Corrêa⁴

RESUMO

Um significativo aumento da incidência de infertilidade tem sido descrito na literatura mundial, o que gera questionamentos sobre as suas causas. A formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) possui a habilidade de alterar reversivelmente ou irreversivelmente a função celular em humanos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dos radicais livres e da atividade antioxidante na infertilidade humana. É bem reportado na literatura que as ERO alteram a bioquímica e a fisiologia do espermatozoide. O dano no DNA do espermatozoide é uma das causas mais importantes da infertilidade. Desse modo, os fatores que podem danificar o DNA do espermatozoide incluem o estresse oxidativo, microelementos, substância tóxica reprodutiva e emissão radioativa. Por outro lado, o mecanismo antioxidante pode proteger o espermatozoide dos danos produzidos pelos radicais livres.

Palavras-chave: Infertilidade. Radicais livres. Antioxidante.

INTRODUÇÃO

A infertilidade é a incapacidade do casal gerar uma gravidez por um período de no mínimo doze meses, sem uso de contraceptivos e com vida sexual freqüente (STITES *et al.*, 2000).

A incidência dos casos de infertilidade pode variar intensamente conforme a região a ser analisada. De maneira geral, estima-se que possa afetar 10 a 30% dos casais em idade fértil. Cerca de 18% dos casais das metrópoles brasileiras em idade fértil não conseguem ter filhos. Nesse caso, o fator que está diretamente envolvido na causa de infertilidade é a ocorrência de processos infecciosos adquiridos por contato sexual pós-parto e pós-aborto em condições precárias. Pesquisas realizadas indicam que os fatores auto-imunes representam 10 a 15% das causas de infertilidade (HALBE, 1994).

¹ Farmacêutico. Especialista em Bases Morfológicas e Fisiológicas pela Universidade Estadual de Maringá – UEM. Mestre em Ciências Morfofuncionais pela Universidade de São Paulo – USP. Professor da Universidade Estadual do Rio Grande do Norte – UERN e da Faculdade de Enfermagem Nova Esperança de Mossoró. Endereço: Rua Souza Pinto, nº 205, aptº 14, B. Alto do São Manoel, Mossoró – RN. e-mail: fauguzen@usp.br

² Graduada em Educação Física pela Universidade Paranaense – UNIPAR.

³ Graduado em Farmácia e Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Londrina – UEL. Mestre em Botânica pela Universidade Federal do Paraná – UFPR e Doutor em Bioquímica pela Universidade de Gifu Daigaku – Japão. Professor da Universidade Paranaense – UNIPAR.

⁴ Graduada em Farmácia pela Universidade Paranaense – UNIPAR. Especialista em Farmácia Magistral pela Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUC e especializanda em farmacologia pela Universidade Paranaense – UNIPAR.

Dentre as causas de infertilidade feminina, pode-se citar: malformações congênitas dos órgãos reprodutores femininos; anomalias genéticas; fatores uterinos como miomas; fatores tubários, principalmente relacionados à infecção por clamídeas e micoplasmas; fatores imunológicos, como acontece na Síndrome Antifosfolipídica; fatores hormonais; fatores ovarianos, caracterizado por anovulação ou ovulação infreqüente; fatores cervicais relacionados à qualidade do muco e fatores ambientais, como tabagismo ou alcoolismo.

As causas de infertilidade masculina podem ser divididas em causas pré-testiculares, testiculares, pós-testiculares. As causas pré-testiculares geralmente estão relacionadas à produção ou deficiência de hormônios. As causas testiculares podem envolver fatores genéticos, inflamações, infecções, malformações dos órgãos reprodutores, entre outros. As causas pós-testiculares estão associadas à função e transporte espermático (COPELAND, 1996).

Apesar do aumento de pacientes que procuram clínicas especializadas para o tratamento da infertilidade, as formas de tratamento ainda são pouco divulgadas.

Existem casos em que podem ocorrer abortos espontâneos. Um ou dois abortos consecutivos pode ser considerado natural, porém mais que dois abortos recomendam realizar uma pesquisa imunológica. Dessa forma, são de relevante importância os estudos voltados para os fatores envolvidos nas situações de infertilidade masculina e feminina, bem como o papel do laboratório contribuindo no diagnóstico, prevenção e tratamento das infertilidades.

Infertilidade

A infertilidade é considerada como a incapacidade de estabelecer uma gravidez em determinado período de tempo, geralmente um ano. A infertilidade primária se relaciona a casais que nunca conseguiram estabelecer uma gravidez, enquanto a infertilidade secundária se refere a casais que, anteriormente, tiveram uma gravidez, mas atualmente têm dificuldade em estabelecer uma nova gestação (STITES *et*

al., 2000). Porém, um ou dois abortos pode ser aceitável como natural, e não deve ser encarado como uma infertilidade. O aborto de repetição caracteriza a situação de um casal que experimenta três ou mais perdas gestacionais (RIALE, 1992).

A diferença entre infertilidade e esterilidade baseia-se no fato de que a esterilidade representa uma condição em que os recursos terapêuticos atuais não proporcionam cura. Em termos gerais, a infertilidade afeta 10 a 30% dos casais em idade fértil, e a procura por serviços de fertilidade aumentou em quase três vezes. Antigamente a taxa de casais inférteis era em torno de 13%. Uma das regiões de maior prevalência de infertilidade é a África Equatorial, com cerca de 30% de casos.

No Brasil, a infertilidade atinge 18% dos casais e um dos maiores fatores originários é a ocorrência de processos infecciosos pélvicos, adquiridos por contato sexual, pós-parto ou pós-aborto em condições precárias. Existem diversos fatores responsáveis pela infertilidade feminina, dentre eles pode-se citar, principalmente: fatores ovarianos, fatores tubários, fatores imunológicos, fatores uterinos, endometriose, fatores cervicais. Esses apresentam uma incidência de 30 a 40%, 30 a 50%, 20%, 10 a 20%, 6% e 5%, respectivamente. Alguns fatores menos freqüentes também podem ser citados, como: fatores hormonais, malformações congênitas, fatores genéticos e ambientais (HALBE, 1994).

As principais causas de infertilidade masculina podem ser divididos em causas pré-testiculares, testiculares e pós-testiculares. Nas causas pré-testiculares podem estar envolvidos diversos fatores hormonais, como o hipogonadotropismo, hiperestrogenismo, hiperandrogenismo, hiperprolactinemia e excesso de glicocorticóides. Dentre as causas testiculares estão envolvidos distúrbios genéticos, Síndrome de Noonan e Klinefelter, varicocele, distrofia miotônica, orquite, criptorquidia, drogas, oligospermia idiopática, insuficiência testicular idiopática, obesidade e anemia falciforme. Já as causas pós-testiculares envolvem distúrbios no transporte e função dos espermatozoides.

Radicais livres

Sabe-se que, as camadas eletrônicas

de um elemento químico são denominadas K, L, M e N, e seus subníveis, s, p, d, f. De maneira simples, o termo radical livre refere-se a átomo ou molécula altamente reativo, que tem número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. É este não-emparelhamento de elétrons da última camada que confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas. Com isso, os radicais livres são formados em um cenário de reações de óxido-redução, isto é, ou cedem o elétron solitário, oxidando-se, ou recebe outro, reduzindo-se. Portanto, os radicais livres ou provocam ou resultam dessas reações de óxido-redução (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990; HALLIWELL, 1992; FERREIRA e MATSUABA, 1997).

É descrito que grande parte dos radicais livres são derivados do metabolismo do O_2 , denominados assim de espécies reativas do metabolismo do oxigênio (ERMO). As ERMO são encontradas em todos os sistemas biológicos. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbico, o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de H_2O . Durante esse processo são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido ($O_2^{\cdot -}$), hidro-peróxila (HO_2) e hidroxila (OH), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Normalmente, a redução completa do O_2 ocorre na mitocôndria, e a reatividade das ERMO é neutralizada com a entrada de quatro elétrons (COHEN, 1989; GALLARDO, 2007).

O radical OH é considerado a ERMO mais reativa em sistemas biológicos. A combinação extremamente rápida do OH com metais ou outros radicais no próprio sítio, onde foi produzido, confirma sua alta reatividade. Assim, se a OH for produzida próximo ao DNA e a este DNA estiver fixado um metal, poderão ocorrer modificações de bases purínicas e pirimidínicas, levando à inativação ou mutação do DNA. Além disso, a OH pode inativar várias proteínas, ao oxidar seus grupos sulfidrilas (-SH) a pontes dissulfeto (-SS). Também pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares (lipoperoxidação) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1986; GUTTERIDGE, 1988).

É descrito por AGARWAL e colaboradores que as ERMO afetam o processo reprodutivo. As ERMO alteram a maturação

do oocisto para fertilização no sistema genital feminino, prejudicando assim o desenvolvimento do embrião e o nascimento do feto.

É sabido que o estresse oxidativo pode causar a produção excessiva de ERMO e prejudicar o mecanismo de defesa antioxidante do esperma, sendo assim, o estresse oxidativo influencia negativamente no sistema reprodutivo, cursando com infertilidade dos gametas (AGARWAL e SALEH, 2002; RAJESH e MURALIDHARA, 2002).

Altos níveis de ERMO no sêmen estão correlacionados com a redução na motilidade do espermatozóide, efeito esse devido ao dano promovido no DNA nuclear do esperma. Além disso, as ERMO causam a depleção da produção de adenosina trifosfato (ATP), que cursa com fosforilação insuficiente, peroxidação lipídica, perda da motilidade e viabilidade espermática (AGARWAL e SALEH, 2002; DOKMECI, 2005).

As ERMO influenciam na interação do gameta masculino com o feminino, dificultando assim que o gameta feminino seja fecundado pelo gameta masculino, o espermatozóide (AGARWAL *et al.*, 2005b).

Experimentos consagrados na literatura realizados em animais demonstraram que o estresse oxidativo influencia a atividade testicular dos animais, causando a produção de substância pró-oxidativa, como a hidroxiperoxida, que interfere na atividade fisiológica do esperma. Além disso, o estresse oxidativo também causa a redução dos níveis de enzimas antioxidantes, como a catalase e a glutatona peroxidase (RAJESH e MURALIDHARA, 2002).

É evidenciado que a presença aumentada de óxido nítrico na ejaculação prejudica a microcirculação local e causa uma disfunção endotelial no parênquima do testículo e do epidídimo. É citado que a hiperprodução de óxido nítrico ocorre em distúrbios inflamatórios urogenitais, sendo assim, esse aumento da secreção de óxido nítrico cursa com efeitos tóxicos na sobrevivência do espermatozóide, visto que o óxido nítrico estimula a peroxidação lipídica na membrana celular do gameta masculino (SEMENOVA *et al.*, 2005).

No sistema reprodutivo feminino, a hiperprodução de óxido nítrico prejudica o crescimento folicular, a formação do corpo lúteo, a diferenciação do endométrio e o

desenvolvimento do embrião, interferindo assim na formação do novo ser vivo (AGARWAL *et al.*, 2005a).

Níveis elevados de xantina oxidase no esperma humano também contribui para a infertilidade masculina, sendo que esses níveis aumentados de xantina oxidase resultam no estresse oxidativo (SANOCKA *et al.*, 1997).

Análises laboratoriais têm se concentrado na investigação da peroxidação lipídica na membrana do esperma, com o intuito de analisar a integridade do espermatozóide após a ejaculação (SANOCKA e KURPISZ, 2004).

Antioxidantes

Em sistemas aeróbicos, é essencial o equilíbrio entre agentes óxido-redutores (como as ERMO) e o sistema de defesa antioxidante. As ERMO são geradas endogenamente como consequência direta do metabolismo do O₂ e também em situações fisiológicas, como a exposição da célula a xenobióticos que provocam a redução incompleta de O₂ (ROSS e MOLDEUS, 1991).

Sabe-se que, para proteger-se, a célula possui um sistema de defesa que pode atuar em duas linhas. Uma delas atua como detoxificadora do agente antes que ele cause lesão. Essa linha é constituída pela glutatona reduzida, superóxido-dismutase, catalase, glutatona-peroxidase e vitamina E. A outra linha de defesa tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico, pela glutatona-reductase e pela glutatona-peroxidase, entre outros. Com exceção da vitamina E, que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes está no meio intra-celular (HEBBEL, 1986; ROSS e MOLDEUS, 1991).

Experimentos recentes demonstram que o aumento na geração das ERMO causa a oxidação de lipídios na membrana do espermatozóide, resultando na infertilidade do gameta masculino. Após a oxidação, vitaminas antioxidantes são sintetizadas e secretadas, tendo assim uma função primordial na inibição da atividade das ERMO, protegendo assim a oxidação lipídica na membrana do espermatozóide (GU *et al.*, 2004; MOSTAFA *et al.*, 2006).

Estudos demonstram que o dano no DNA do esperma consiste uma das causas mais importantes da infertilidade masculina. Com isso, alguns espermatozóides com o DNA danificado podem escapar do mecanismo de fiscalização da integridade estrutural e funcional do esperma, que é mediada em grande escala pelas células de Sertoli e transmitir um dano incorreto de fertilização, resultando assim num possível aborto ou numa anormalidade fetal. Existem diversos fatores que podem danificar o DNA do esperma, como: estresse oxidativo, microelementos, substâncias tóxicas reprodutivas, emissão radioativa, entre outras (PRZEQL, 2006; SUN e ZHOU, 2006).

É descrito por Agarwal e Saleh que a utilização combinada da vitamina E e C promove um efeito contra a peroxidação lipídica, agindo assim como agentes antioxidantes, com isso, essas vitaminas podem ser utilizadas como coadjuvantes no tratamento da infertilidade humana.

A L-carnitina é um antioxidante enzimático natural, que é um fator necessário no processo de obtenção de energia celular no gameta masculino. Desse modo, a L-carnitina possui uma função primordial na maturação do espermatozóide do sistema reprodutivo masculino. Além disso, o plasma epididimal contém altos níveis de L-carnitina, que induz o início da motilidade do esperma. Com isso, os níveis de L-carnitina no lúmen do epidídimo é altamente proporcional ao movimento do gameta masculino, ou seja, quanto mais L-carnitina for secretada no lúmen do epidídimo, mais será induzida a motilidade do gameta. É descrito que a L-carnitina previne a formação de ERMO, que impede a formação de radicais livres, impedindo assim o estresse peroxidativo (DOKMECI, 2005).

A utilização de L-carnitina e seus derivados têm sido proposta atualmente como tratamento da infertilidade masculina (DOKMECI, 2005). Outras substâncias antioxidantes também são descritas, como a hidroxianisola e a hidroxitolueno (RAJESH e MURALIDHARA, 2002).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em virtude do aumento do número de casais inférteis, cresceu a importância do laboratório em investir nesse setor, proporcionando a pesquisa de novos exames e metodologias. A investigação da infertilidade do casal não é complexa quando é detectada através de uma rotina de exames com causas aparentes. Em algumas situações, entretanto, é necessário um conhecimento de cada uma das causas de infertilidade, e dos mecanismos das mesmas. Observa-se que o fator imunológico envolvido com a infertilidade não é um fator sem solução, e o prognóstico com relação à gravidez depende do nível de sensibilização do sistema imune, do fator genético, da classe de imunoglobulinas envolvidas com os auto-anticorpos, da reatividade local muco-espermatozóide, do número de espermatozoides afetados, entre outros. Concluindo, é importante destacar o papel do laboratório na investigação dos auto-anticorpos envolvidos com a infertilidade e com os abortos espontâneos, através de um trabalho conjunto com o clínico, visando a auxiliar na interpretação dos resultados dos exames.

Existem evidências de que as ERMO possam estar envolvidas em mais de 50 doenças ou eventos nosológicos.

Devemos salientar que as ERMO podem ser causa ou consequência de doenças humanas associadas ao estresse oxidativo. Por isso, antioxidantes naturais e sintéticos têm sido recomendados para o alívio dos sinais e sintomas dessas doenças e, mesmo, para bloquear sua evolução. No entanto, muito deve ser investigado acerca do benefício dos antioxidantes exógenos. É imperativo determinar o momento exato, a dose, a via de administração e qual antioxidante ideal para cada doença. Até o momento, não existem estudos que respondam com segurança essas indagações. Portanto, a utilização indiscriminada de medicamentos que contenham antioxidantes exógenos deve ser criteriosamente avaliada na terapêutica de doenças associadas ao estresse oxidativo. Contudo, avanços considerados no tratamento da infertilidade têm sido conseguidos com a fertilização *in vitro* e a inoculação intracitoplasmática de espermatozóide (ZINI e LIBMAN, 2006).

REFERÊNCIAS

AGARWAL, A e SALEH, R.A. **Role of oxidants in male infertility:** rationale, significance, and treatment. *Urol Clin North Am.* 2002; 29: 817-827.

AGARWAL, A.; GUPTA, S e SHARMA, R.K. **Role of oxidative stress in female reproduction.**

EFFECT THE FREE RADICALS AND OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY IN THE HUMAN INFERTILITY

ABSTRACT

A significant increase in the incidence of infertility has been described in the international literature, raising questions about its causes. Reactive oxygen species (ROS) formation have the ability to alter reversibly or irreversibly the cellular function in humans. Intention of our work calculate the effect of free radicals and antioxidant activity in human infertility. It has been proposed that the ROS alters the biochemistry and the physiology of the sperm. The damage to sperm DNA is one of the most important causes of infertility. Furthermore, the factors that would damage sperm DNA include oxidative stress, microelements, reproductive toxic substances and radioactive rays. On the other hand, the antioxidative mechanisms could protect the sperms from the damage produced by free radicals.

Keywords: Infertility. Free radicals. Antioxidant.

- Reprod Biol Endocrinol. 2005a; 14: 3-28.
- AGARWAL, A.; GUPTA, S e SHARMA, R.K. **Oxidative stress and its implications in female infertility – a clinician's perspective.** Reprod Biomed Online. 2005b; 11: 641-650.
- COHEN, M.V. **Free radicals ins ischemic and reperfusion muocardial injury: is this time for clinical trials?** Ann Intern Med. 1989; 111: 918-931.
- COPELAND, L.J.; JARREL, J.F e MCGREGOR, J.A. **Tratado de ginecologia.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 227, 258, 334, 335.
- DOKMECI, D. **Oxidative stress, male infertility and the role carnitines.** Folia Med (Plovdlv). 2005; 47: 26-30.
- FERREIRA, A.L.A e MATSUBARA, L.S. **Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo.** Rev Ass Méd Brasil. 1997; 43: 61-8.
- GALLARDO, J.M. Evaluation of antioxidant system in normas semen. **Rev Invest Clin.** 2007; 59: 42-47.
- GU, W.; SHANG, X e HUANG, Y. **Antioxidant vitamin and male reproduction.** Zhonghua Nan Ke Xue. 2004; 10: 627-629.
- GUTTERIDGE, J.M.C. **Lipid peroxidation: some problems and concepts.** In Halliwell B (ed): Oxygen radicals and tissue injury. Proceedings of a book lodge symposium; 1987 Apr 27-29; Bethesda (MLD): Upjohn/federation of American Societies for Experimental Biology. 1988; 9-19.
- HALBE, H.W. **Tratado de ginecologia.** 2. ed. São Paulo: Editora Roca, 1994. p. 1360-1387, 1539-1564.
- HALLIWELL B e GUTTERIDGE, J.M.C. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Arch Biochem Biophys.** 1986; 246:501-514.
- HALLIWELL B e GUTTERIDGE, J.M.C. **Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview.** Methods Enzymol. 1990; 186: 1-85.
- HALLIWELL B. **Reactive oxygen species and the central nervous system.** J. Neurochem. 1992; 59: 1.609-1.623.
- HEBBEL, R.P. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. **J Lab Clin Med.** 1986; 107: 401-404.
- MOSTAFA, T., ANIS, T. H., GHAZI, S. *et al.* **Reactive oxygen species and antioxidants relationship in the internal spermatic vein blood of infertile men with varicocele.** 2006; 8: 451-454.
- PREZEG, L. **Influence of DNA damage on fertilizing capacity of spermatozoa.** 2006; 63: 800-802.
- RAJESH, k.T e MURALIDHARA, K.M. **Oxidative stress response of rat testis to model prooxidants in vitro and its modulation.** Toxicol In Vitro. 2002; 16: 675-682.
- RIALE, J.W. Overstreet. Male Infertility. **Infertility and Reproductive Medicine Clinics of North America.** Philadelphia: W.B. Saunders Company, v.3, n°2, p.413-423, abr. 1992.
- ROSS D e MOLDEUS, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In **Vigo-Pelfrey C (ed): Membrane lipid oxidation.** 1 th ed. Boca Raton, CRC Press.1991; 151-170.
- SANOCKA, D e KURPISZ, M. Reactive oxygen species and sperm cells. **Reprod Biol Endocrinol.** 2004; 23: 2-12.
- SANOCKA, D.; MIESEL.; R *et al.* **Effect of reactive oxygen species and the activity of antioxidant systems on human semen; association with male infertility.** Int Androl. 1997; 20: 255-64.
- SEMENOVA, A.V.; TOMILOVA.; I.K *et al.* **The role of nitric oxide in fertility disorders in men.** Urologiia. 2005; 6: 31-36.
- SUN, J e ZHOU, A.F. **Damage to and protection of sperm DNA.** Zhonghua Nan Ke Xue. 2006; 639-642.
- STITES, D.P.; TERR, A.B.I.; PARSLOW, T.G. **Imunologia médica.** 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 478-480.
- ZINI, A e LIBMAN J. Sperm **DNA damage:** importante in the era of assisted reproduction. **Curr Opin Urol.** 2006; 16: 428-434.