LUIZ FERNANDO PINA DE CARVALHO

**Avaliação dos marcadores de estresse oxidativo em pacientes
com endometriose pélvica**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para a obtenção
do Título de Doutor em Medicina

Programa de Obstetrícia e Ginecologia
Orientador: Prof. Dr. Mauricio Simões Abrão

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Pina de Carvalho, Luiz Fernando

Avaliação dos marcadores de estresse oxidativo em pacientes com
endometriose pélvica / Luiz Fernando Pina de Carvalho. -- São Paulo, 2012.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientador: Mauricio Simões Abrão.

Descritores: 1.Endometriose 2.Estresse oxidativo 3.Marcadores biológicos
4.Toxicidade 5.Progressão da doença

USP/FM/DBD-382/12

DEDICATÓRIA

A minha mãe **Marizilda**, pelo incentivo.

Me mostrou que ciência e amor andam juntos e
que aprender vale a pena! A verdadeira professora.

Ao meu pai **Roberto** pelo apoio,
exemplo de honestidade, perseverança
e amor incondicional.

Aos meus irmãos **Tatiana, José e Roberta**
pela amizade, amor e companheirismo
para sempre

A minha amada **Vanessa** que abdicou de tudo e
enfrentou com companheirismo
essa etapa importante de minha vida

E por último, dedico essa tese ao meu amigo e professor **Maurício**, pelos
ensinamentos, exemplos de dedicação e de vida. Obrigado por todo apoio e por
acreditar no meu potencial.

AGRADECIMENTO

Ao Professor **Tommaso Falcone**, professor orientador e amigo da Cleveland Clinic pelos ensinamentos e correções na medida certa.

Ao Professor Doutor **Sérgio Podgaec**, por ajudar e opinar em momentos importantes desse projeto.

Ao Doutor **Midgley Gonzales** pela amizade e por me apresentar ao Professor Mauricio. Sua ajuda foi fundamental. Meus sinceros agradecimentos.

A Doutora **Marta Privato** pela importante ajuda na elaboração desse projeto.

Ao Professor Doutor **Edmund Chada Baracat** pela oportunidade de desenvolver essa tese na Universidade de São Paulo. Pelos comentários e observações que acrescentaram muito neste trabalho.

Ao Doutor **Luiz Flávio Cordeiro Fernandes** que sempre me apoiou. Obrigado Amigo.

Aos Amigos Doutores **Patrick Bellelis; Luciano Gibran; Leandro Mattos; João Dias Jr; Nicolau D 'Amico, Marco A Bassi** e a todos os colegas do grupo de endometriose da universidade de São Paulo pela amizade e apoio neste trabalho.

A CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela oportunidade e a concessão da bolsa para o desenvolvimento desse doutorado sanduiche.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

Lista de Abreviações e Siglas

Lista de Tabelas

Lista de Figuras e Gráficos

Resumo

Summary

I. INTRODUÇÃO	1
1. Endometriose	1
1.1. Definição	1
1.2. Diagnóstico	1
1.3. Patogênese	2
2. Estresse oxidativo	4
2.1. Radicais livres	4
2.2. Espécies reativas de oxigênio (EROs)	5
2.3 Estresse oxidativo, inflamação e o dano celular	6
2.4 Endometriose e estresse oxidativo: revisão sistemática	9
II. OBJETIVOS.....	13
III. PACIENTES E MÉTODOS	15
1. Local do estudo	16
2. Pacientes	16
2.1. Critérios de inclusão	17
2.2. Critérios de exclusão	17
3. Calculo Amostral	18
4. Avaliação dos sintomas clínicos	19
5. Estadiamento de endometriose de acordo com a American Society for Reproductive Medicine (ASRM).....	20
6. Métodos	21
6.1. Coleta das Amostras	21
6.2. Análises no fluido peritoneal	22

6.2.1. LPO/TBARS (Lipoperoxidação-Thiobarbituric Acid-ReactingSubstances)...	23
6.2.2. CTA (Capacidade Total Antioxidante)	23
6.2.3. EROs (Espécies Reativas de Oxigênio)	24
6.2.4. PC (Proteína Carbonly-Oxidação Proteica)	25
6.3. Análises no tecido endometriótico: 8-OHdG (8-hidroxi-2-deoxiguanosina) e OGG1 (8-oxo-guaninaglicosilase)	26
7. Análise estatística	28
IV. RESULTADOS	30
V. DISCUSSÃO	48
VI. CONCLUSÕES.....	56
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
VIII. ANEXOS	66
IX. MANUSCRITOS	70

Lista de Siglas

LISTA DE SIGLAS

8 OHdG - 8-hidroxi-2-deoxiguanosina

A - Pacientes com Endometriose em estágio I/II

ASRM - American Society of Reproductive Medicine

Anti-8-OHdG – Anticorpo Anti-8-hidroxi-2-deoxiguanosina

Anti-OGG1 – Anticorpo Anti-8-oxo-guaninaglicosilase

B - Pacientes com Endometriose em estágio III/IV

CAT - Capacidade Total Antioxidante

C - Pacientes sem sinais de endometriose a laparoscopia (grupo controle)

CS - Correlação de Spearman

EVA - Escala Visual Analógica de Dor

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

HCFMUSP - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

H-E - Hematoxilina – Eosina

K –Teste estatístico de *Kruskal –Wallisrank sum*

LPO - Lipoperoxidação

OGG1–Oxo Guaninaglicosilase

PC -Proteína Carbonly

ROC- *ReceiverOperatingCharacteristics Curve*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estadiamento da Endometriose proposto pela American Society for Reproductive Medicine (1996).....	21
Tabela 2: Características clínicas e demográficas das pacientes com e sem endometriose	31
Tabela 3: Mediana das concentrações no fluido peritoneal dos marcadores de estresse oxidativo em pacientes com e sem endometriose [Grupo (A e B) e Grupo C] respectivamente. Marcadores são expressos em: PC (nmol/ml); CAT (μmol Trolox); EROs (RLU); LPO (μmolMDA/L)	33
Tabela 4: Avaliação do 8 OHdG e do OGG1 no tecido com endometriose por imunoistoquímica. Resultados são apresentados em mediana e interquartis em pacientes com e sem endometriose [Grupo (A e B) e Grupo C] respectivamente. Os marcadores são expressos em porcentagem	34
Tabela 5: Resumo da correlação de Spearman entre marcadores do sistema pro oxidante e antioxidante.....	40
Tabela 6: Resumo das razões de chances (<i>Odds Ratio-Regressão logística univariável</i>) dos marcadores de estresse oxidativo para o desenvolvimento de qualquer estágio de endometriose e estádios avançados de endometriose	42

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1: Escala Visual Analógica de Dor utilizada para mensurar o grau de dor nas pacientes incluídas no estudo. O “0” corresponde a não dor e o “10” a dor máxima já sentida pela paciente.....19

Figura 2: Avaliação dos anticorpos anti-8-hidroxi-2-deoxiguanosina e anticorpo anti-8-oxo-guaninaglicosilase por reações de hematoxilina–eosina (H-E); Expressão dos anticorpos 8OHdG e OGG1 aparecem em marrom. **A-B-D:** Lâminas do grupo controle, correspondendo a tecido de tuba uterina normal (aumento de 10x; H-E; 8OHdG; OGG1) respectivamente. **C:** Biópsia de peritônio de parede pélvica - Estádio I ou II de endometriose (aumento de 10x; H-E) 35

Figura 2.1 - E-F: Biópsia de peritônio de parede pélvica - Estádio I/II de endometriose; (H-E; 8OHdG; OGG1) respectivamente. **G-I:** Biópsia de fundo de saco de Douglas com lesão de endometriose profunda - Estádio III/IV; (H-E; 8OHdG; OGG1) respectivamente..... 36

Figura 3: Avaliação por imunoistoquímica de 8 OHdG e OGG1(aumento de 10x) no tecido com endometriose profunda do reto-sigmoide (A-B) e no tecido com endometriose profunda infiltrando a parede pélvica (C-D) 37

Figura 4: Avaliação por imunoistoquímica do 8 OHdG (10x) em endometriose profunda de bexiga. Seta [A] aponta para o alto grau de lesão de DNA na glândula. Seta [B] evidencia o auto grau de lesão no estroma ao redor da glândula 38

Figura 5: Avaliação por imunohistoquímica do OGG1 (aumento de 10x) no tecido com endometriose profunda de bexiga marcada para 8 OhdG. Seta [A] aponta para o alto grau de reparo de DNA na glândula endométriotica. Seta [B] evidencia ausência de reparo de DNA no estroma endometriótico ao redor da glândula em estádios avançados de endometriose 39

Gráfico 1: *Boxplot* demonstrando as medianas e quartis nas medidas da oxidação proteica entre pacientes com e sem endometriose 32

Gráfico 2:Correlação de Spearman entre os marcadores 8 OHdG e OGG1 em pacientes com e sem endometriose pélvica 41

Gráfico 3:Curva ROC (*ReceiverOperatingCharacteristics*), representando acurácia do marcador 8 OHdG para o diagnóstico de endometriose e para o diagnóstico dos estádios avançados da doença (eixo “Y” corresponde à taxa de verdadeiros positivos (Sensibilidade); eixo “X” corresponde à taxa de falso positivo) 43

Gráfico 4:Curva ROC (*ReceiverOperatingCharacteristics*), representando acurácia do marcador OGG1 para o diagnóstico de endometriose e para o diagnóstico dos estádios avançados da doença (eixo “Y” corresponde à taxa de verdadeiros positivos (Sensibilidade); eixo “X” corresponde à taxa de falso positivo) 44

Gráfico 5:Curva ROC (*ReceiverOperatingCharacteristics*), representando acurácia do marcador PC para o diagnóstico de endometriose e para o diagnóstico dos estádios avançados da doença (eixo “Y” corresponde à taxa de verdadeiros positivos (Sensibilidade); eixo “X” corresponde à taxa de falso positivo) 44

Gráfico 6:Curva ROC (*ReceiverOperatingCharacteristics*), representando acurácia do marcador EROs para o diagnóstico de endometriose e para o diagnóstico dos estádios avançados da doença (eixo “Y” corresponde à taxa de verdadeiros positivos (Sensibilidade); eixo “X” corresponde à taxa de falso positivo) 45

Gráfico 7:Curva ROC (*ReceiverOperatingCharacteristics*), representando acurácia do marcador CAT para o diagnóstico de endometriose e para o diagnóstico dos estádios avançados da doença (eixo “Y” corresponde à taxa de verdadeiros positivos (Sensibilidade); eixo “X” corresponde à taxa de falso positivo) 45

Gráfico 8:Curva ROC (*ReceiverOperatingCharacteristics*), representando acurácia do marcador LPO para o diagnóstico de endometriose e para o diagnóstico dos estádios avançados da doença (eixo “Y” corresponde à taxa de verdadeiros positivos (Sensibilidade); eixo “X” corresponde à taxa de falso positivo) 46

Gráfico 9:Modelo preditivo de severidade de endometriose e grupo controle utilizando sensibilidade e especificidade dos marcadores de estresse oxidativo. Eixo “Y” corresponde à probabilidade de diagnosticar qualquer estágio de endometriose e o eixo “X” corresponde à probabilidade de diagnosticar estádios avançados de doença 47

Resumo

RESUMO

Pina de Carvalho LF. Avaliação dos marcadores de estresse oxidativo em pacientes com endometriose pélvica [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

Objetivo: Existem evidências crescentes na literatura da participação do estresse oxidativo na progressão e agressividade da endometriose. Nesse estudo prospectivo e controlado, foram medidos seis marcadores de estresse oxidativo com a finalidade de relacioná-los com a severidade e progressão da endometriose além de buscar um marcador diagnóstico para a doença. **Pacientes e Métodos:** Entre Julho de 2010 e Agosto de 2011, 62 pacientes consecutivas com diagnóstico histológico de endometriose foram identificadas como elegíveis para esse estudo. Após os critérios de exclusão, 44 pacientes foram alocadas em três grupos: Grupo A (estádios I/II da ASRM/1996), (n=14), grupo B (estádios III/IV da ASRM/1996), (n=16) e grupo controle (n=14). Os seguintes marcadores foram avaliados no fluido peritoneal e no tecido com endometriose: 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8-OHdG), 8-oxo-guaninaglicosilase (OGG1), proteína carbonil (PC), oxidação lipídica (LPO), espécies reativas de oxigênio (ROS); capacidade total antioxidante (TAC). **Resultados:** Observou-se elevação estatisticamente significativa do 8-OHdG e da PC. Notou-se diminuição significativa na expressão do reparo de DNA (OGG1) em estádios avançados de endometriose. ($p < 0.001$, $p = 0.001$, $p = 0.033$ respectivamente). Não notamos significância estatística entre os três grupos estudados nos marcadores ROS, CAT e LPO. Utilizando-se um modelo estatístico multivariável e as curvas *Receiver Operating Characteristics* (ROC) construiu-se um modelo preditivo de severidade de doença. A habilidade do modelo de distinguir

entre os grupos A, B e o grupo controle foi alta. O modelo foi capaz de diferenciar aproximadamente 9 em cada 10 pacientes incluídas (acerto/corrido foi de 87%).

Conclusão: O aumento da lesão no DNA e a diminuição da atividade enzimática de reparo de DNA podem estar relacionados com a progressão da endometriose. Nossos resultados indicam que marcadores oxidativos de agressão celular podem se tornar testes valiosos para se verificar a severidade da endometriose.

Palavras-chave: Endometriose, Estresse Oxidativo, Marcadores de lesão e reparo, 8-hidroxi-2-deoxiguanosina; Toxicidade Celular; Progressão da Endometriose.

Summary

SUMMARY

Carvalho LF; Evaluation of oxidative stress markers in patients with pelvic endometriosis [Thesis] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

Objective: There is increasing evidence that oxidative stress is one of the key factors for endometriosis progression. In this prospective controlled trial, we measured six different biomarkers of oxidative stress targeting protein, lipid and DNA to quantify the severity and progression of endometriosis and establish a diagnostic marker for the disease. **Methods:** 62 consecutive patients were identified to be enrolled in this study. After exclusion criteria, 44 patients were allocated in three groups: Group A (Stage I/II - ASRM/1996), (n=14), Group B (Stage III/IV – ASRM/1996), (n=16), and control group (n=14). Levels of 8 hydroxy- deoxyguanosine (8 OHdG), 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1), protein carbonyl (PC), lipid peroxidation (LPO), reactive oxygen species (ROS); total antioxidant capacity (TAC) were accessed in peritoneal fluid and tissue. **Results:** 8-OhdG and PC levels were found to be significantly higher in patients with endometriosis, in addition OGG1 expression was found to be significantly lower in patients with endometriosis ($p<0.001$, $p=0.001$, $p=0.033$ respectively); however, stages I/II, stages III/IV, and control group showed comparable levels of ROS, TAC and LPO. A predictive model was built using multivariable analyses and receiver operating characteristics curves. The ability to predict and distinguish between groups A, B and control patients was high. The model was corrected in proximally 9 out of 10 patients included (Model/Corrected ratio was 87%). **Conclusion:** Higher level of DNA damage and

lower expression of DNA repair activity may be related with endometriosis progression. Our results indicate that oxidative stress as a biomarker of cell injury might be a useful and reliable quantitative test of endometriosis severity

Keywords: Endometriosis; Oxidative Stress; DNA damage: 8-hydroxy-2-deoxyguanosine; Cell toxicity; Endometriosis progression

I. Introdução

I. INTRODUÇÃO

1. Endometriose

1.1. Definição

Endometriose é definida como a presença de tecido endometrial fora do útero. Este pode estar presente na pelve bem como nos ovários e no peritônio pélvico, podendo também estar localizado no intestino, ureter ou bexiga(Abrão et al 2010).É considerada uma doença ginecológica benigna que afeta aproximadamente 10% das mulheres em idade reprodutiva, porém em alguns casos pode ser agressiva e invasiva. As principais manifestações incluem dor pélvica e infertilidade(Carvalho et al. 2012, Olive andPritts 2002).

Os sintomas característicos das pacientes com endometriose são dismenorréia, algia pélvica acíclica crônica, infertilidade, dispareunia de profundidade, irregularidade menstrual, alterações intestinais e urinárias cíclicas durante o período menstrual(Abrão et al. 2009, Abrão et al. 2010, Podgaec et al. 2008).

1.2. Diagnóstico

O padrão “ouro” de diagnóstico da endometriose é a vídeo-laparoscopia, que torna possível a visibilizaçãodas lesões sugestivas da doença e a obtenção de amostra tecidual que confirme, pela análise histológica, essa suspeita. A classificação mais utilizada para a endometriose (estádios I-IV) foi idealizada pela*American Society for Reproductive Medicine* (Revised American Society for Reproductive Medicine, 1996), que divide a endometriose em quatro estádios. A gravidade progride com a quantidade e tamanho dos focos de doença e com a presença de aderências, sendo o estágio IV o mais avançado. A endometriose também pode ser classificada segundo

seu tipo histológico em bem diferenciada, estromal, indiferenciada e mista, sendo que a doença indiferenciada e mista estão associadas à maior intensidade da dor em pacientes com endometriose (ASRM 1997, Arruda et al. 2003; Abrão et al., 2003).

Existe uma fraca correlação entre a gravidade da doença e os sintomas clínicos. Esta heterogeneidade na apresentação clínica tem dificultado a identificação de marcadores de diagnóstico. Muitos relatos têm proposto que vários marcadores séricos, teciduais e do fluido peritoneal estejam potencialmente associados à endometriose (Yang et al. 2004). A dosagem de marcadores tumorais, particularmente CA-125, um antígeno derivado de carcinoma epitelial humano, é o mais extensivamente estudado e usado como marcador sérico de endometriose (Gagné et al. 2003). Entretanto, esse marcador tem utilidade diagnóstica limitada, pois além de ser pouco específico por estar presente em outras situações clínicas. O CA-125 apresenta valores alterados nos estádios mais avançados (III e IV) da endometriose, o que representa um problema no que diz respeito à investigação de estádios precoces da doença (Abrão et al. 1997, Barbieri et al. 1986, Ramos et al. 2012).

1.3. Patogênese

Muitas hipóteses têm sido propostas a fim de esclarecer o mecanismo etiopatológico da endometriose, permanecendo ainda em grande parte desconhecido. Também não está claro porque algumas pacientes permanecem em estádios iniciais da doença e outras desenvolvem estádios mais avançados (Abrão et al. 2003, Carvalho et al. 2011, Falcone and Mascha 2003, Giudice and Kao 2004, Ngo et al. 2009).

Entre as várias teorias etiopatogênicas para justificar o desenvolvimento da doença, destacam-se a teoria da metaplasia celômica, pela qual o mesotélio se transformaria em tecido endometrial e a teoria da menstruação retrógrada, que justifica a doença pela implantação das células endometriais, oriundas do refluxo do sangue menstrual, na cavidade abdominal (Sampson 1927) e peritoneal (Vinatier et al. 2001), através das tubas uterinas.

A implantação de células endometriais tem sido relacionada a vários fatores, tais como um ambiente receptivo que permitiria a implantação e proliferação de células endometriais ectópicas e uma resposta imunológica aberrante a estas células. Vários autores têm tentado esclarecer o papel do sistema imunológico na endometriose e várias anormalidades têm sido detectadas nesta associação (Christodoulakos et al. 2007), dentre elas as alterações na imunidade celular e humoral.

A endometriose é uma doença estrógeno dependente, porém o exato mecanismo pelo qual o estrógeno promove a endometriose é incerto e, a supressão deste tem respostas variáveis nas mulheres com esta patologia (Berkkanoglu and Arici 2003).

O número e a ativação de macrófagos peritoneais, a diminuição da citotoxicidade das células T e NK são alterações na imunidade celular, levando a uma diminuição na remoção das células endometriais ectópicas da cavidade peritoneal. Além disso, níveis aumentados de várias citocinas pró-inflamatórias e de fatores de crescimento produzidos por células do sistema imunológico provavelmente facilitem a implantação e o crescimento das células endometriais ectópicas, promovendo a proliferação, inflamação e angiogênese. Matarese et al.

2003 e Podgaec et al. 2007 identificaram um perfil predominante de citocinas séricas e do fluido peritoneal associado com respostas Th1 (TNF- α , IFN- γ , IL-2) e Th2 (IL-4, IL-10). Os resultados sugerem que a endometriose é uma doença que envolve um comportamento inflamatório com um claro componente Th2. Nessa direção, Fairbanks et al. 2009, avaliaram os níveis de IL-12 e IL-18 e compararam com o estágio, o local da doença e sua classificação histológica. Um aumento significativo de IL-12 foi encontrado quando estágios mais avançados da doença foram comparados com estágio inicial.

Nenhuma diferença significativa foi evidenciada para os níveis de IL-18, tanto no soro como no fluido peritoneal. Em estudo recente, os mesmos autores demonstraram que embora não existam diferenças em relação aos padrões de resposta imune Th1/Th2 e local das lesões endometrióticas, sintomas clínicos específicos podem estar associados a uma maior produção de citocinas específicas, com padrão de resposta imune Th1 podendo estar relacionado à endometriose profunda (Podgaec et al. 2010).

Além da contribuição do sistema imunológico para o desenvolvimento da endometriose, o estresse oxidativo vem também sendo considerado como potencial fator envolvido na fisiopatologia e progressão da endometriose. Esse processo relaciona um desequilíbrio entre a geração de espécies reativas de oxigênio e a capacidade de eliminação dos antioxidantes (Agarwal et al. 2005, Augoulea et al. 2009, Szczepanska et al. 2003).

2. Estresse Oxidativo

2.1. Radicais livres

As células são formadas por diferentes moléculas, que consistem em um ou mais átomos ligados quimicamente uns aos outros. Já os átomos são rodeados por elétrons pareados. Ocasionalmente os átomos perdem ou ganham um elétron, e ficam com elétrons não pareados. Chamamos esses átomos com elétrons não pareados de radicais livres. Os radicais livres são altamente instáveis e reativos, ávidos por ganhar ou perder um elétron de outras moléculas para se tornarem estáveis. Eles tornam-se instáveis quando adquirem elétrons provenientes de ácidos nucleicos, lipídeos, proteínas, ocasionando uma cascata de reações resultando em dano celular. Existem dois principais tipos de radicais livres: as espécies reativas de oxigênio (*ReactiveOxygenSpecies* – *ROS*) e as espécies reativas de nitrogênio (*ReactiveNitrogenSpecies* - *NOS*)(Pierce et al. 2004).

2.2. Espécies reativas de oxigênio (ROS)

Espécies reativas de oxigênio são constantemente produzidas durante as reações do metabolismo humano, normalmente produzidos no metabolismo aeróbico, como produto intermediário do metabolismo do oxigênio. O estresse oxidativo surge quando existe um desequilíbrio entre a produção dos radicais livres de oxigênio (ROS) e a capacidade de eliminação pelos sistemas protetores, também denominados de sistemas antioxidantes(Jackson et al. 2005).

Os três principais tipos de ROS são: radicais superóxido ($-O_2$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e os radicais hidroxila ($-OH$). As espécies reativas de oxigênio são altamente reativas e podem causar danos celulares, principalmente em lipídios da

membrana celular, proteínas e ácidos nucleicos (Agarwal et al. 2006, Ngo et al. 2009)O grupamento carbonil (aldeídos e cetonas) são produzidos nas cadeias laterais da proteína (principalmente nos aminoácidos prolina, arginina, lisina e treonina), quando elas foram oxidadas. O derivados protéicos carbonil podem ser gerados pela clivagem oxidativa de proteínas, conduzindo à formação de um peptídeo no qual o aminoácido N-terminal está bloqueado por um derivado α -cetoacil(Dalle-Donne et al. 2003). O grupamento carbonil pode ser introduzido nas proteínas por uma reação secundária de cadeias laterais nucleofílicas de resíduos de cistina, histidina e lisina, com aldeídos, por exemplo o malondealdeído, produzido durante a peroxidação lipídica. O teor de proteína carbonil é atualmente o indicador mais comumente usado de oxidação proteica, (Dalle-Donne et al. 2003) e o acúmulo de proteína carbonil tem sido observado em várias doenças tais como: doença de Alzheimer's, diabetes, doença inflamatória intestinal e artrite(Chevion et al. 2000).

Sob condições normais, as células possuem um sistema de eliminação de radicais livres conhecidos como antioxidantes, que limitam a superprodução de ROS, e reparam os danos celulares. Esse sistema pode ser agrupado em categorias: (1) sistema enzimático (superóxido dismutase, catalase, glutathionaperoxidase) e não enzimático (vitaminas C e E, glutathiona); (2) sistema de incorporação dos radicais livres nas bases nitrogenadas, através das bases hidroxiladas do DNA e, (3) enzimas de reparo de DNA(Gupta et al. 2006, Ma et al. 2008).

2.3 Estresse oxidativo, inflamação e o dano celular

Três são os alvos das espécies reativas de oxigênio: lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. Muitos marcadores têm sido estudados relacionando estresse

oxidativo e endometriose, tais como a via de lipoperoxidação, LDL oxidada, malondialdeído (MDA), MDA modificada e F2-isoprotona (Verit et al. 2008).

Com o refluxo do sangue menstrual para a cavidade abdominal (teoria da menstruação retrógrada) ferro, o endométrio e células apoptóticas oriundas da descamação menstrual são transportados para dentro da cavidade peritoneal e podem induzir uma inflamação crônica e fatores pró-inflamatórios (como citocinas), recrutando e ativando células do sistema imunológico, principalmente de granulócitos e macrófagos. Estas células durante esses eventos produzem grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio. Os macrófagos peritoneais ativados, promoveriam aumento da produção de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio (Ngo et al. 2009) e consequentemente, estresse oxidativo, gerando peroxidação dos lipídios, de seus produtos de degradação e dos produtos formados pela sua interação com as lipoproteínas de baixa densidade e outras proteínas (Augoulea et al. 2009).

Os lipídios oxidados, ao se decomporem, gerariam produtos como o MDA e poderiam ser reconhecidos como corpos estranhos, desencadeando resposta antigênica com consequente produção de anticorpos (Halliwell and Gutteridge 1988). Esse processo cursaria com danos oxidativos às hemácias, às células endometriais e peritoneais, o que, por sua vez, estimularia o recrutamento e ativação de mais macrófagos, perpetuando os danos oxidativos na cavidade pélvica. (Van Langendonck et al. 2002) O MDA, por ser um produto estável, pode ser utilizado como medida cumulativa do processo de estresse oxidativo. (Halliwell and Gutteridge 1988), A dosagem de TBARS (*Thiobarbituric Acid-Reacting Substances*), pode ser usado como marcador indireto da lipoperoxidação. A medida de MDA através da

dosagem de TBARS estpadronizada e consagrada na literatura(Carvalho et al. 2012).

Apesar de os dados serem controversos, alguns autores evidenciaram aumento significativo das concentraes de perxidos lipdicos no fluido peritoneal de portadoras de endometriose plvica(Guichardant et al. 2004, Liu et al. 2001).

O excesso de radicais livres no retirados pelo sistema antioxidante podem atingir o ncleo celular e causar dano nas bases nitrogenadas, comprometendo a estabilidade genmica. Quando o excesso de hidroxila (-OH) atinge a base guanina, esta se transforma em uma base modificada denominada 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8-OHdG), que uma das principais modificaes na molcula de DNA produzidas pelas espcies reativas de oxignio. Pelo fato de que 8-OHdG pode parear com as bases citosina e adenina durante a sntese de DNA, 8-OHdG a principal modificao no DNA produzida pelo perxido de hidrognio(Shibutani et al. 1991) O aumento do 8-OHdG tem sido associado com a progresso de inmeras doenas, como a diabetes e ou cncer(Fuji et al. 2010, Isobe et al. 2010).

Um dos principais mecanismos de reparo das leses de DNA causadas pelo estresse oxidativo, tem como principal enzima a 8-oxo-guaninaglicosilase (OGG1), que remove a leso mutagnica 8-OHdG do DNA. (Guzik et al. 2003) Um polimorfismo frequentemente encontrado, resultando em uma substituio de serina em cistena na posio 326 da protena OGG1, tem sido associado em vrios estudos moleculares epidemiolgicos com o (Bravard et al. 2009, Karahalil et al. 2006)desenvolvimento do cncer. Quando a expresso e/ou a atividade da OGG1 est diminuda, resulta-se em maiores leses do DNA, podendo desencadear inmeras doenas.

Inúmeras doenças já foram relacionadas à presença das espécies reativas de oxigênio. Alguns exemplos bem documentados são: cânceres, doenças degenerativas do sistema nervoso e doenças cardiovasculares(Movahed et al. 2012, Raj et al. 2011, West et al. 2010).

2.4 Endometriose e estresse oxidativo: revisão sistemática

A endometriose é uma doença multifatorial associada a uma resposta inflamatória geral na cavidade peritoneal. Alguns autores sugeriram a possibilidade de a endometriose ser uma doença originada ou associada ao estresse oxidativo(Agarwal et al. 2006, Gupta et al. 2006, Gupta et al. 2008, Szczepanska et al. 2003). Na vigência da endometriose pélvica, eritrócitos, macrófagos, tecido endometrial em apoptose e restos celulares transplantados dentro da cavidade abdominal pelo refluxo menstrual, têm sido propostos como potenciais indutores do estresse oxidativo na endometriose(Szczepanska et al. 2003).ROS podem alterar as propriedades funcionais e morfológicas das células endoteliais, incluindo a permeabilidade e a expressão de moléculas de adesão, contribuindo assim para a propagação do processo inflamatório(Nagata 2005).

Realizamos revisão sistemática sobre o assunto com informações obtidas doMEDLINE no período de janeiro de 1990 a agosto de 2011(Carvalho et al. 2012, em anexo)utilizando os termos chaves “*oxidative stress; endometriose; radical livre*”. Foram identificados um total de 247 artigos. Apenas com as palavras do titulo, foram excluídos 194 citações. O resumo dos 53 manuscritos restantes foram lidos por inteiro para identificação dos estudos relevantes. Após a triagem e a leitura de textos completos foram identificados 19 manuscritos que mediram

biomarcadores de estresse oxidativo em pacientes com endometriose. A busca ativa por referências nos 19 incluídos não identificou novos manuscritos. (Anexo 1). Após a publicação da revisão sistemática submetida em dezembro de 2011 e aceita em julho de 2012, realizamos uma atualização até o mês de agosto de 2012. Ao atualizarmos estas informações, encontramos mais 27 artigos com as palavras chaves utilizadas. Após os critérios de inclusão e exclusão, selecionamos mais 3 artigos para serem lidos por completo. Dois foram excluídos, um por ser em polonês e o outro por comparar marcadores de estresse oxidativo em pacientes com câncer de ovário associado com endometriose. Finalmente incluímos o manuscrito publicado por Kobayashi et al em agosto de 2012(Kobayashi et al. 2012).

Um total de 22 diferentes marcadores de EO foram dosados e publicados na literatura em pacientes com endometriose. A tabela atualizada encontrada no anexo 1, resume todos os marcadores, ano de publicação dos manuscritos publicados até agosto de 2012 envolvendo estresse oxidativo e endometriose, além de demonstrar o tipo de amostra que foi utilizada e se os autores acharam significância estatística entre os grupos avaliados. Os 22 diferentes marcadores podem ser agrupados nas seguintes classes:

1. Marcadores de atividade enzimática.(Foyouzi et al. 2004, Jackson et al. 2005, Osborn et al. 2002, Ota et al. 2001, Verit et al. 2008)
2. Radicais livres. (Foyouzi et al. 2004, Ho et al. 1997, Leconte et al. 2011, Ngo et al. 2009, Ota et al. 2001, Wang et al. 1997, Yamaguchi et al. 2008)

3. Marcadores de lipoperoxidação(Jackson et al. 2005, Kao et al. 2005, Mier-Cabrera et al. 2008, Mier-Cabrera et al. 2011, Shanti et al. 1999, Sharma et al. 2010, Szczepanska et al. 2003, Verit et al. 2008, Yamaguchi et al. 2008)
4. Marcadores de lesão no DNA (Kao et al. 2005, Kobayashi et al. 2012, Matsuzaki and Schubert 2010, Slater et al. 2005, Yamaguchi et al. 2008)
5. Marcadores de oxidação proteica(Kobayashi et al. 2012, Lambrinoudaki et al. 2009, Slater et al. 2005)

A relação mais explorada na literatura envolvendo o tópico, endometriose e estresse oxidativo foi a classe da oxidação lipídica encontrada em 14 manuscritos. O segundo mais encontrado foi a dosagem de radia livre e em terceiro com 5 manuscritos foi a quantificação da atividade enzimática. Em um total de 39 marcadores medidos 26 foram encontrados significativamente aumentados em pacientes com endometriose comparados com o controle. (Anexo 2)

A literatura tem constantemente demonstrado evidências da participação do estresse oxidativo na fisiopatologia da endometriose, no entanto, não há um completo entendimento dos marcadores oxidativos que guiam a progressão da doença(Ngo et al. 2009). Os danos ao DNA causados pelo estresse oxidativo podem ser responsáveis pela destruição do tecido local, agressividade e invasão da endometriose(Wang et al. 1997, Ma et al. 2008).

Embora evidências demonstrem que o estresse oxidativo esteja aumentado no local dos implantes ectópicos de endométrio, ainda sabe-se pouco sobre o estresse oxidativo sistêmico em pacientes com endometriose(Szczepanska et al. 2003). Alguns estudos demonstraram um significativo aumento dos marcadores do estresse

oxidativo em amostras de fluído peritoneal, sangue e em tecido das mulheres com endometriose(Andrade et al. 2010, Matsuzaki and Schubert 2010, Szczepanska et al. 2003). Van Langendonck et al. 2002 evidenciaram uma associação positiva entre infertilidade relacionada à endometriose, avanço do estadiamento da doença e aumento dos níveis séricos de hidroperóxidos, sugerindo aumento da produção de espécies reativas em portadoras de endometriose.

Esses dados, associados à redução dos níveis séricos de vitamina E eglutinationa, sugerem a ocorrência de estresse oxidativo sistêmico em portadoras de infertilidade associada à endometriose. Outro estudo encontrou uma fraca associação entre a concentração sérica de TBARS (*Thiobarbituric Acid-Reacting Substances*) e endometriose, levando-se em consideração o índice de massa corpórea, tabagismo, terapia hormonal, vitamina E sérica, estradiol sérico e lipídeos totais séricos(Jackson et al. 2005).

Até o momento não existem manuscritos publicados estudando a associação entre a lesão tecidual oxidativa em pacientes com endometriose profunda. Assim, nosso trabalho avaliou um painel de marcadores oxidativos voltados para os principais alvos celulares (proteína, lipídio e DNA), e relacionou a agressão celular com a progressão da endometriose.

II. Objetivos

II. OBJETIVOS

Este estudo tem como objetivos:

- Principal:

a) Avaliaros níveis dos marcadores de estresse oxidativo de lesão (ROS, PC, LPO e 8-OHdG) e de reparo (OGG1 e capacidade total antioxidante - CTA) em pacientes com e sem endometriose.

- Complementares:

b) Avaliar os riscos para o desenvolvimento da endometriose de acordo com a lesão e o reparo do DNA;

c-) Avaliar a utilidade dos marcadores de estresse oxidativo para o diagnóstico da endometriose;

III. Pacientes e Métodos

III. PACIENTES E MÉTODOS

1. Local do estudo

O projeto foi desenvolvido na *Cleveland Clinic (Laboratory and Center for Reproductive Medicine)*, Cleveland, USA, sob supervisão do Prof. Dr. Rakesh Sharma.

2. Pacientes

Entre Julho de 2010 e Agosto de 2011, 44 pacientes atendidas consecutivamente no *Gynecology and Women's Health Institute at Cleveland Clinic* foram identificadas como elegíveis para esse estudo, sendo 30 pacientes com suspeita de endometriose e 14 sem suspeita de endometriose. As pacientes foram inicialmente avaliadas clinicamente e a partir da suspeita clínica de endometriose, foram submetidas a exames de imagem (ultra-som transvaginal) e a subsequente laparoscopia, quando foram estadiadas de acordo com a classificação da American Society for Reproductive Medicine (1996), sendo divididas em três grupos: grupo A: pacientes com endometriose em estádios I/II (n=14); grupo B: pacientes com endometriose em estádios III/IV (n=16) e grupo C: pacientes férteis sem sinais de endometriose a laparoscopia e pela histologia (n=14).

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética das duas instituições envolvidas: Cleveland Clinic (Cleveland, USA), sob nº 1-443 (Anexo 3).

2.1. Critérios de inclusão

Foram utilizados os seguintes critérios de inclusão para os grupos A e B:

- mulheres na menacme;
- diagnóstico de endometriose comprovada histologicamente para o grupo de pacientes portadoras de endometriose;
- ausência de doenças autoimunes, confirmada por anamnese, exame físico e por exames laboratoriais quando necessário;
- ausência de terapêutica hormonal (análogos do GnRH mensais, progestagênios e contraceptivos hormonais) nos últimos três meses que antecedem a coleta das amostras e ausência de uso de análogos do GnRH trimestrais nos últimos 6 meses que antecederam a coleta das amostras;
- ausência de sinais clínicos de moléstia inflamatória pélvica, tais como: febre, corrimento vaginal purulento;
- ausência de tabagismo;
- ausência ingestão de vitaminas nos últimos 3 meses.

Para o grupo C (grupo controle), consideramos os seguintes critérios de inclusão:

- pacientes férteis e com indicação de cirurgia laparoscópica sem sinais de endometriose durante o procedimento cirúrgico e a histologia (infertilidade foi definida como a tentativa de engravidar em casal possuindo vida sexual ativa [2 ou mais relações por semana] sem utilizar método contraceptivo por pelo menos um ano). Essas

indicações incluíram: laqueadura tubária; reanastomose tubária; miomectomia e histerectomia;

- ausência de doenças autoimunes, confirmada por anamnese, exame físico e por exames laboratoriais quando necessário;
- ausência de terapêutica hormonal (análogos do GnRH mensais, progestagênios e contraceptivos hormonais) nos últimos três meses que antecedem a coleta das amostras e ausência de uso de análogos do GnRH trimestrais nos últimos 6 meses que antecederam a coleta das amostras;
- ausência de sinais clínicos de moléstia inflamatória pélvica, tais como: febre, corrimento vaginal purulento;
- ausência de tabagismo;
- ausência ingestão de vitaminas nos últimos 3 meses.

3. Calculo Amostral

O cálculo amostral foi baseado nos achados por Kao et al 2005.(Kao et al. 2005) A média e o desvio padrão encontrados entre pacientes com e sem endometriose foi de 72 e 17 respectivamente. A estimativa do tamanho amostral derivou-se do teste-t e representou o número mínimo de indivíduos necessários para determinar a diferença estatisticamente significativa com um poder de 90%. O projeto propôs a inclusão de três grupos. Os níveis de significância foram determinados pelo teste de Bonferroni ajustado de 0,05 para permitir comparações múltiplas. Utilizamos uma potencia de 90% para o calculo amostral. Demonstrou-se

que seria possível observar uma diferença estatística se o tamanho da amostra por grupo fosse de pelo menos 14. O que forçaria um total de 42 sujeitos distribuídos nos três grupos avaliados.

4. Avaliação do quadro clínico

Todas as pacientes foram questionadas quanto a presença de seis sintomas relacionados ao quadro clínico de endometriose utilizando para os sintomas de dor a escala visual analógica de dor (EVA, Figura 1).

Figura 1: Escala Visual Analógica de Dor utilizada para mensurar o grau de dor nas pacientes incluídas no estudo. O “0” corresponde a não dor e o “10” a dor máxima já sentida pela paciente

Os seis sintomas foram divididos da seguinte maneira:

- a) dismenorréia: dor em cólica no período menstrual;
- b) dispareunia de profundidade: dor pélvica durante a relação sexual;
- c) dor pélvica acíclica: dor pélvica sem relação com o ciclo menstrual por pelo menos três meses;

d) infertilidade: dificuldade para engravidar em casal com vida sexual ativa (duas ou mais relações sexuais por semana) e sem utilizar método contraceptivo por pelo menos um ano;

e) alterações intestinais cíclicas: sintomas intestinais durante o período menstrual, incluindo aceleração ou diminuição do trânsito intestinal, dor à evacuação, puxo, tenesmo e/ou sangramento nas fezes;

f) alterações urinárias cíclicas: sintomas urinários durante o período menstrual, incluindo disúria, hematúria, polaciúria e/ou urgência miccional.

Informações adicionais foram obtidas nos prontuários das pacientes, tais como: características intra-operatórias da doença, idade, índice de massa corpórea, raça, status marital, cirurgia abdominal prévia.

5. Estadiamento de acordo com a *American Society for Reproductive Medicine* - 1996

As lesões de endometriose foram classificadas durante o procedimento cirúrgico pelos critérios da *American Society for Reproductive Medicine* (ASRM), revisado em 1996, em estádios de I-IV. A Classificação completa pode ser vista na Tabela 1.

Tabela 1. Estadiamento da endometriose proposto pela American Society for Reproductive Medicine (1996).

Estádio I (mínima): 1-5

Estádio III (moderada): 16-40

Estádio II (leve): 6-15

Estádio IV (severa): > 40

PERITÔNIO	ENDOMETRIOSE	< 1 cm	1-3 cm	> 3 cm
	Superficial	1	2	4
OVÁRIO	Profunda	2	4	6
	D superficial	1	2	4
	Profunda	4	16	20
	E superficial	1	2	4
OBLITERAÇÃO DO FUNDO DE SACO POSTERIOR	Profunda	4	16	20
		Parcial	Completa	
OVÁRIO			4	40
	ADERÊNCIAS	< 1/3 Envolvido	1/3 - 2/3 Envolvidos	> 2/3 Envolvidos
TROMPA	D Velamentosa	1	2	4
	Densa	4	8	16
	E Velamentosa	1	2	4
	Densa	4	8	16
TROMPA	D Velamentosa	1	2	4
	Densa	4*	8*	16
	E Velamentosa	1	2	4
	Densa	4*	8*	16

* Se as fímbrias tubárias estiverem totalmente envolvidas por aderências, mude o escore para 16. Estádio I (mínima: 1-5); estágio II (leve: 6-15); estágio III (moderada: 16-40), estágio IV (severa: >40).

Porcentagem de implantes:

Lesões vermelhas (claras, vermelhas, rosadas, em chama, vesículas): _____%

Lesões brancas (brancas, amareladas, marrons, defeitos de peritônio): _____%

Lesões pretas (pretas, depósitos de hemossiderina, azuis) _____%

Endometriose adicional: _____

Patologias associadas: _____

6. Métodos

6.1. Coleta das amostras

As amostras foram coletadas no momento da cirurgia laparoscópica no Centro de Reprodução e Endometriose da Cleveland Clinic, Cleveland – USA,

imediatamente após a punção venosa para a realização da anestesia. As amostras de fluido peritoneal foram aspiradas sob visualização direta durante a laparoscopia, para evitar a contaminação com sangue, sem a prévia injeção de fluidos na cavidade abdominal. Os fluidos aspirados com a presença de sangue foram excluídos do estudo. Após colhidas as amostras foram encaminhadas diretamente para o laboratório para o processamento. O marcador de EROs foi dosado em fluido peritoneal antes do congelamento. O restante da amostra de fluido peritoneal foi centrifugado e retirado o sobrenadante e congelado em -80°C até o dia da dosagem.

O tecido doente retirado durante a cirurgia foi encaminhado ao patologista para confirmação histológica, quando o patologista separou lâminas do tecido com endometriose para a reavaliação de dois pesquisadores Chales Biscott e Luiz Fernando Pina de Carvalho e subsequente preparação para a realização da imunoistoquímica.

6.2. Análises no fluido peritoneal

O fluido peritoneal colhido na cirurgia foi dividido em alíquotas de 1,5 ml cada. As espécies reativas de oxigênio (EROs) foram dosadas na amostra fresca. O restante da amostra colhida foi congelada em -80°C até o dia da dosagem. No dia da dosagem as alíquotas de fluido peritoneal congeladas foram colocadas em temperatura ambiente. Todas as marcadores foram dosados em duplicata.

Os protocolos de dosagem seguiram as seguintes etapas:

6.2.1. LPO/TBARS (Oxidação Lipídica/Thiobarbituric Acid-Reacting Substances)

A dosagem de *LPO/TBARS* foi feita através de técnica colorimétrica, usando a reação do ácido tiobarbitúrico (Szczepanska et al., 2003), de acordo com os seguintes passos: a) Alíquotas foram incubadas com 125 µL de sulfato de ferro (2,5nM) e com ascorbato de sódio por 1 h à 37°C. O controle da reação não continha os reagentes citados durante o período de incubação;b) adicionou-se 250 µl a 40% de ácido tricloroacético frio para a precipitação das proteínas; c) as amostras foram centrifugadas à 3000 rpm e 500 µl do sobrenadante foi separado; d) ao sobrenadante foi adicionado ácido tiobarbitúrico (250 µL; 2% em NaOH 0,2 M); e) os tubos foram então fervidos por exatamente 15 min, imediatamente as amostras foram colocadas em gelo; f) após resfriadas em gelo, a absorbância do produto foi medida a 534nm utilizando-se a leitora GEN5, EPOCH winoski, VT);aperoxidação lipídica foi expressa em µmolMDA/L de líquido peritoneal.

6.2.2. CTA (*Capacidade Total Antioxidante*)

A técnica de dosagem da capacidade total antioxidante foi previamente realizada e padronizada por Said et al. 2003. A técnica colorimétrica foi utilizada para medir a capacidade antioxidante das amostras, usando o kit comercial, *Antioxidant Assay Kit* da empresa Cayman Chemical com um filtro de 600nm. O experimento foi conduzido através das seguintes etapas: a) 20µL do fluido peritoneal foi adicionado a 10 µl de cromógeno reconstituído;b) acrescentado 10 µl de ABTS (6-ácido sulfônico-3-etilbenzotiazolina) diluído em 10 µL de tampão PBS; c) a solução de Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico) foi utilizada como padrão antioxidante para gerar a curva *standard*, (a curva standard

foi comparada com as amostras do fluído); d) 10µL de cromógeno foi adicionado aos padrões e às amostras; e) a absorbância inicial (A1) foi medida; f) 20 µl de H₂O₂ foram adicionados e foi medida a absorbância (A2) depois de 3 minutos; g) a diferença entre A2 e A1 (ΔA) foi calculada. O resultado da CAT foi expresso em micromolar Trolox equivalente (µmol Trolox). Por fim, foi aplicada a fórmula $CAT = \frac{\text{Concentração do padrão} (\Delta A \text{ pura} - \Delta A \text{ amostra})}{(\Delta A \text{ pura} - \Delta A \text{ padrão})}$.

6.2.3. EROs (*Espécies Reativas de Oxigênio*)

As espécies reativas de oxigênio foram quantificadas pela técnica de quimioluminescência usando uma sonda chamada luminol, que é extremamente sensível e reage com uma variedade de EROs. Os radicais livres se ligam ao luminol para produzir um sinal luminoso, o qual é então convertido em sinal elétrico (fóton) e medido por um instrumento chamado luminômetro. O experimento foi realizado em sala escura, em triplicata, de acordo com as seguintes etapas: a) 400µl do fluido peritoneal foi adicionado a 10 µl de sonda luminol (5mM). b-) Controle negativo constituiu-se de 400 µl de tampão PBS 1X + 10 µl de sonda luminol (5mM); c) os tubos foram agitados gentilmente; d) controle positivo foi constituiu-se de 400 µl de tampão PBS 1X + 10 µl de sonda luminol (5mM) + 50mg de H₂O₂ e) Em seguida, procedeu-se com a leitura das amostras no luminômetro. A quantidade de radicais livres produzidos é medida como o número de fótons/minuto (RLU/seg/x 10⁶).

6.2.4. Oxidação protéica (*grupamento carbonil*)

A oxidação protéica é medida pela reação entre 2,4-dinitrofenilidrazina (DNPH) e o grupamento carbonil. DNPH reage a proteína carbonil, formando a base de Schiff para produzir hidrazona, a qual pode ser quantificada por espectrofotometria. A dosagem da proteína carbonil seguiu as seguintes etapas: a) 200 µl de fluido peritoneal foi transferido para dois eppendorfs (A: amostra, C: controle); b) 800 µl de DNPH foi adicionado ao eppendorf A e 800 µl de HCl (2,5 M) ao eppendorf C; c) incubou-se os eppendorfs A e C em sala escura em temperatura ambiente por 1 h; d) agitou-se cada eppendorf rapidamente usando o vortex por 15 min; e) adicionou-se 1 ml de ácido tricloroacético (20%) e agitou-se; f) colocou-se os eppendorfs no gelo e incubou-se por 5 min; g) centrifugou-se os eppendorfs a 10.000 g por 10 min à 4°C; h) foi descartado o sobrenadante e o precipitado foi suspenso em 1 ml de ácido tricloroacético (10%) seguido por repouso em gelo por 5 min; i) centrifugou-se os eppendorfs a 10.000 g por 10 min à 4°C; j) repetiu-se a etapa h por duas vezes; k) após a última lavagem o precipitado de proteínas foi misturado em 500 µl de cloridrato de guanidina, sob agitação no vortex; l) centrifugou-se os eppendorfs a 10.000 g por 10 min à 4°C para remover quaisquer detritos que sobraram; m) foi transferido 220 µl do sobrenadante do eppendorf A e do eppendorf C para uma microplaca (96 poços); n) mediu-se a absorbância em comprimento de onda entre 360-385 nm, usando o leitor de placas; o) calculou-se a média das absorbâncias de cada amostra e controle; p) subtraiu-se a média da absorbância (controle) da absorbância (amostra) = absorbância correta (AC); q)

determinou-se a concentração do grupamento carbonil pela seguinte equação: proteína carbonil (nmol/ml) = [(AC)/(*0,011 μ M-1)](500 μ l/200 μ l).

6.3. Análises do tecido com endometriose: 8-OHdG (8-hidroxi-2-deoxiguanosina) e OGG1 (8-oxo-guaninaglicosilase):

A presença das proteínas (8-OHdG e OGG1) no tecido com endometriose foi avaliada pela técnica de imunoistoquímica. As amostras foram fixadas em formalina 10% tamponada por 18-24 horas, processadas e incorporadas em parafina usando técnica padronizada. O tecido parafinado foi cortado em micrótomo a uma espessura de 5 μ m e montado em lâmina de vidro.

A recuperação antigênica foi realizada através da incubação em tampão citrato, pH 6,0 por 10 min seguido de resfriamento gradual à temperatura ambiente por 20 min. Após 1 h de incubação em solução bloqueadora, as lâminas foram incubadas overnight a 4°C, com o anticorpo de monoclonal de ratoprímários específicos anti-8-OHdG (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine clone N45.1; Abcam *Laboratories*, Cambridge, MA) e o anticorpo de coelho anti-OGG1 (8-Oxoguanine glycosylase; HPA 027514, Sigma, St Louis, MO) nas diluições de 1:50 e 1:25 respectivamente. As reações foram realizadas de acordo com as instruções dos fabricantes. Nos controles negativo os anticorpos primários foram omitidos.

Depois de lavadas, as lâminas foram incubadas com anticorpos secundários biotinilados por 30 min em temperatura ambiente. As lâminas foram novamente lavadas e incubadas com estreptavidinaperoxidase (HRP; Vector *Laboratories*) por 30 min. em temperatura ambiente. Por último, a hibridização específica de anticorpos

foi evidenciada pela incubação por 10 min. com diamino benzidina (DAB) e tampão de substrato HRP. A solução substrato diamino benzidina gerou um precipitado marrom no local do antígeno-alvo reconhecido pelo anticorpo primário. Os núcleos foram contra-corados em azul com hematoxilina de Mayer (Merck). As lâminas secas foram em seguida imersas em solução de xileno e vedadas utilizando cola seladora.

As lâminas foram analisadas sob microscopia óptica. Todas as fotos analisadas foram tiradas com 10X de aumento utilizando o microscópio *Leica DMR microscope* (Heidelberg, Germany) equipado com múltiplas objetivas, RGB color filter, e com câmera digital *Q-Imaging CCD* (*Q-Imaging, Burnaby, BC, Canada*).

A medida da porcentagem positiva da reação antígeno anticorpo específica das proteínas 8-OHdG e do OGG1 foi feita de forma cega através de um sistema de análise computadorizada de imagem (*Image pro plus 6.2 media Cybernetics-Bethesda*). Foram considerados nesta análise os locais com a presença de glândula e estroma.

7. Análise estatística

Toda análise estatística foi realizada no programa R 2.12.2. Adotou-se um nível de significância de 5% como sendo estatisticamente significativo. Para otimizar a análise estatística, os estádios I e II da endometriose foram agrupados e considerados estádios iniciais da doença (Grupo A). Os estádios III e IV também

forma agrupados e considerados, como estágio avançado (Grupo B). As variáveis que demonstraram uma distribuição normal foram expressas em média (medida de tendência central) e desvio padrão (medida de dispersão). Demonstrou-se as variáveis de distribuições desviadas utilizando-se a mediana e os quartis.

As variáveis categóricas foram analisadas pelo teste de qui-quadrado e ANOVA. As variáveis quantitativas contínuas (não paramétrica), com o teste estatístico Mann-Whitney. Para as variáveis que demonstram diferença estatística, comparações *pairwise*(pareadas) foram feitas utilizando o teste ranqueado de *Wilcoxon's signed*. Utilizou-se o teste estatístico Kruskal-Wallis para avaliar a se existiu diferença entre os marcadores de estresse oxidativo no fluido peritoneal e no tecido nos três grupos incluídos nesta trabalho(Frank 2011).

Utilizou-se o ferramenta *Spearman's rankcorrelation* para determinar se existiu a correlação direta ou inversão dos marcadores de estresse oxidativo de ataque e de defesa na progressão da doença. Relações univariáveis de *Odds Ratio*(razão de chance) foram calculadas para cada biomarcadores de estresse oxidativo utilizando uma regressão logística proporcionais no pacote versão R 3,3-0. Curvas ROC (Receiver Operating Characteristics) foram construídas para cada marcador utilizando o pacote estatístico R *Package ROCR*. Construiu-se duas curva uma para marcador: qualquer estágio de doença e estágios avançados de endometriose(Tobias 2009).

Foi criado um modelo de regressão multi-variável afim de utilizar o modelo para a predição dos estágios da doença As variáveis foram introduzidas no modelo sequencialmente a partir dos índices de concordância dos modelos uni-variáveis, com concordâncias mais elevados sendo introduzido em primeiro lugar. A

capacidade do modelo de distinguir entre ausência de endometriose, estádios iniciais (I/II) de endometriose, e estádios avançados (III/IV) foram determinados pela inclusão de três variáveis significantes entre os três grupos.

IV. Resultados

IV. RESULTADOS

Entre julho de 2010 e março de 2011 44 pacientes que preenchiam os critérios de inclusão e exclusão foram analisadas, sendo 14 pacientes (Grupo A) com confirmação histológica de endometriose classificadas como estádios I/II (ASRM 1996); 16 pacientes (Grupo B) com confirmação histológica classificadas como estádios III/IV (ASRM 1996) e 14 pacientes do grupo controle (grupo C) sem endometriose visibilizada na laparoscopia.

As características clínicas e demográficas dos três grupos são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Características clínicas e demográficas das pacientes com e sem endometriose.

	Controle (n=14)	Estádio I/II (n=14)	Estádio III/IV (n=16)
Idade (Anos) *	41 ± 6,6	33 ± 5,74	33 ± 6,04
IMC (kg/m2)*	31 ± 7,48	27 ± 7	29,8 ± 12,76
Estado Civil (%)			
Casada	50	79	63
Solteira	36	14	31
Divorciada	14	7	6
Cirurgia Abdominal Anterior (%)			
0	43	36	13
1	50	36	44
2	0	7	25
>3	7	21	13
Grupo Étnico (%)			
Caucasiano	50	43	50
Hispanico	14	0	0
Afro-Americano	14	0	25
Não Hispanico	21	50	25
Other	0	7	0
EVA Dismenorréia (0-10) #	0 [0-0]	8 [5-10]	9 [5-10]
EVA Dispareunia (0-10) #	0 [0-0]	3 [0-6]	0 [0-7]
EVA Dor Pélvica Crônica (0-10) #	0 [0-0]	0 [0-5]	3 [0-7]
EVA Dor Cíclica para Urinar (0-10) #	0 [0-0]	0 [0-0]	0 [0-0]
EVA Dor Cíclica para Evacuar (0-10) #	0 [0-0]	0 [0-0]	0 [0-0]

EVA- Escala Visual Analógica de Dor. IMC - Índice de Massa Corporea

Mediana [1QT/3QT]

* Média ± DP

Foram medidos os níveis de PC, EROs, CAT, LPO, no fluido peritoneal. Encontramos aumento significativo na dosagem de oxidação proteica em pacientes com endometriose comparada com o grupo controle [$p=0.003$; controle 1.56 nmol/ml(1.26, 2.5) versus estágio I/II 3.29 nmol/ml (2.84, 4.54) e estágio III/IV 3.52 nmol/ml (2.13, 4.06)](Gráfico 1). No entanto não foi notado diferença estatística nas dosagens de EROs, CAT, LPO entre os grupos avaliados (A;B;C) [EROs $p=0.24$ Controle 17475 RLU (9638, 22514) versus estádios I/II 4719 (0, 11780), e estádios III/IV 2401.5 (0, 13914); CAT $p=0.84$, controle 1110 μ M Trolox equivalente (910, 1250) versus estádios I/II: 1030 μ M Trolox equivalente (940, 1250) e estádios III/IV 1200 μ M Trolox equivalente (1060, 1250); LPO $p=0.09$ controle 1.53 μ mol MDA/L (1.25, 1.64), estádios I/II 1.02 μ mol MDA/L (1,1.03), e estádios III/IV 3.02]. A tabela 3 resume os resultados dos marcadores dosados no fluido peritoneal.

Gráfico 1: *Boxplot* demonstrando as medianas e quartis nas medidas da oxidação proteica entre pacientes com e sem endometriose.

Tabela 3: Mediana das concentrações no fluido peritoneal dos marcadores de estresse oxidativo em pacientes com e sem endometriose [Grupo (A e B) e Grupo C] respectivamente. Marcadores são expressos em: PC (nmol/ml); CAT (μ mol Trolox); EROs (RLU); LPO (μ molMDA/L).

Marcador	Controle (N=14)	Estádio I/II (N=14)	Estádio III/IV (N=16)	p Valor
PC (nmol/ml)	1.56 [1.26, 2.5]	3.29 [2.84, 4.54]	3.52 [2.13, 4.06]	0.033 k*
CAT (μ mol Trolox)	1110 [910, 1250]	1030 [940, 1250]	1200 [1060, 1250]	0.84 k
EROs (RLU)	17475 [9638, 22514]	4719 [0, 11780]	2401.5 [0, 13914]	0.24 k
LPO (μ molMDA/L)	1.53 [1.25, 1.64]	1.02 [1, 1.03]	3.02 [1.87, 3.04]	0.09 k

K: Kruskal-Wallis rank sum test - * P < 0.05 Estatisticamente Significante - PC - Oxidação Proteica - CAT - Capacidade Total Antioxidante - EROs - Espécies Reativas de Oxigênio - LPO - Oxidação Lipídica

No tecido com endometriose foram avaliados os marcadores de lesão de DNA (8-OHdG) e a enzima específica de reparo de DNA chamada (OGG1). Notamos um aumento progressivo e estatisticamente significativo de lesão de DNA em estádios avançados de endometriose [$p < 0.001$; controle 2.38 (0.38, 3.29), estádios I/II 13.2 (9.43, 14.21) e estádios III/IV 17.68 (15.47, 29.44)]. Inversamente, encontramos um decréscimo significativamente aumentados na expressão do reparo do DNA com o progredir da doença comparada com pacientes [$p = 0.001$; controle 15.68 (14.5, 21.23), estágio I/II 9.16 (4.76, 13.08), estágio III/IV 4.25 (3.02, 7.88)].

Tabela 4: Avaliação do 8 OHdG e do OGG1 no tecido com endometriose por imunohistoquímica. Resultados são apresentados em mediana e interquartil em pacientes com e sem endometriose [Grupo (A e B) e Grupo C] respectivamente. Os marcadores são expressos em porcentagem.

Marcador	Controle (N=14)	Estádio I/II (N=14)	Estádio III/IV (N=16)	p Valor
8- OHdG (%)	2.38 [0.38, 3.29]	13.2 [9.43, 14.21]	17.68 [15.47, 29.44]	< 0.001* k
OGG1 (%)	15.68 [14.5, 21.23]	9.16 [4.76, 13.08]	4.25 [3.02, 7.88]	0.001* k

K: Kruskal-Wallis rank sum test - * P <0.05 Estatisticamente Significante - 8 OHdG - 8-hidroxi-2-deoxiguanosina - OGG1 - Oxo-guaninaglicosilase

Todas as lâminas incluídas neste estudo tinham a presença de glândula e estroma. A expressão da lesão de DNA e reparo de DNA foram comparados em múltiplas áreas do campo fotografado. Todos os figuras analisadas foram fotografadas em 10x de aumento. No intuito de comparar os marcadores de lesão e de reparo de DNA a mesma área foi fotografada para ambos os tecidos. Notamos que com a progressão da endometriose a lesão de DNA aumentou progressivamente enquanto ocorreu o inverso com o reparo.

A figura 2 demonstra os achados imunohistoquímica dos slides avaliados nos grupos com e sem endometriose. Interessantemente em estádios avançados da doença a glândula do tecido com endometriose apresentou alta positividade para reparo de DNA mas o estroma ao redor praticamente não houve reparo.

Figura 2: Avaliação dos anticorpos anti-8-hidroxi-2-deoxiguanosina e anticorpo anti-8-oxo-guaninaglicosilase por reações de hematoxilina–eosina (H-E); Expressão dos anticorpos 8OHdG e OGG1 aparecem em marrom. **A-B-D:** Lâminas do grupo controle, correspondendo a tecido de tuba uterina normal (aumento de 10x; H-E; 8OHdG; OGG1) respectivamente. **C:** Biópsia de peritônio de parede pélvica - Estádio I ou II de endometriose (aumento de 10x; H-E).

Figura 2.1 - E-F:Biópsia de peritônio de parede pélvica - Estádio I ou II de endometriose; (H-E; 8OHdG; OGG1) respectivamente. **G-I:**Biópsia de fundo de saco de Douglas com lesão de endometriose profunda - Estádio III ou IV; (H-E; 8OHdG; OGG1) respectivamente.

A figura 3 demonstra sítios de doença infiltrativa nas pacientes do grupo B (estádios III/IV). Notamos que nos estádios avançados da endometriose encontramos altos níveis de lesão de DNA tanto no estroma quanto na glândula de endometriose. Nas lâminas realizadas com o anticorpo de reparo de DNA notamos quase nenhuma reação na região estromal. Houve imunorreatividade para OGG1 no tecido glandular.

Figura 3: Avaliação por imunoistoquímica de 8 OHdG e OGG1 (aumento de 10x) no tecido com endometriose profunda do reto-sigmoide (A-B) e no tecido com endometriose profunda infiltrando a parede pélvica (C-D).

As figuras 4 e 5 demonstram a relação entre a lesão de DNA e de reparo de DNA em lesão infiltrativa de endometriose. A relação entre lesão/reparo foi inversamente proporcional ao estágio da doença.

Figura 4: Avaliação por imunohistoquímica do 8 OHdG (10x) no tecido com endometriose profunda de bexiga. Seta [A] aponta para o alto grau de lesão de DNA na glândula. Seta [B] evidencia o auto grau de lesão no estroma ao redor da glândula.

Figura 5: Avaliação por imunohistoquímica do OGG1 (aumento de 10x) no tecido com endometriose profunda de bexiga marcada para 8 OhdG. Seta [A] aponta para o alto grau de reparo de DNA na glândula do tecido com endometriose. Seta [B] evidencia ausência de reparo de DNA no estroma endometriótico ao redor da glândula em estádios avançados de endometriose.

Para correlacionar os marcadores do sistema oxidativo (pró oxidante) com o do sistema antioxidante, utilizamos a Correlação de Spearman (CS). A Tabela 5 mostra a correlação de Spearman entre os quadro marcadores do sistema pró oxidante (PC, EROs, LPO, 8-OHdG) e os dois marcadores do sistema antioxidante (CAT, OGG1).

Tabela 5: Resumo da correlação de Spearman entre marcadores do sistema pró oxidante e antioxidante.

Sistema Oxidante	Sistema Antioxidante	Correlação	Intervalo de Confiança (95%)	p Valor
PC	CAT	0.22	(-0.18,0.62)	0.28
PC	OGGI	0.05	(-0.41, 0.5)	0.84
LPO	CAT	-0.03	(-0.46,0.4)	0.88
LPO	OGGI	-0.02	(-0.49,0.44)	0.92
EROs	CAT	0.03	(-0.38,0.44)	0.88
EROs	OGGI	-0.02	(-0.47,0.43)	0.93
8 OHdG	CAT	0.06	(-0.38,0.5)	0.79
8 OHdG	OGGI	-0.47	(-0.76,-0.17)	0.003*

K: Kruskal-Wallis rank sum test - * P <0.05 Estatisticamente Significante - PC - Oxidação Proteica - CAT - Capacidade Total Antioxidante- EROs - Espécies Reativas de Oxigênio - LPO - Oxidação Lipídica - 8 OHdG - 8-hidroxi-2-deoxiguanosina- OGG1 - Oxo-guaninaglicosilase

Encontramos uma correlação de Spearman com diferença significativa entre os marcadores 8 OHdG e o OGG1. Não encontramos diferença estatística entre nenhuma outra correlação entre os marcadores de pró oxidantes e o sistema antioxidante. O achado da correlação pode ser melhor visualizado no gráfico 2, que demonstra o gradiente crescente da lesão de DNA com o progredir da endometriose comparando com o controle. O inverso pode ser visualizado no reparo de DNA onde nota-se um gradiente decrescente em estádios avançados da doença.

Gráfico 2: Correlação de Spearman entre os marcadores 8 OHdG e OGG1 em pacientes com e sem endometriose pélvica.

Existem evidências crescentes na literatura médica sobre o envolvimento do estresse oxidativo na progressão da endometriose. Para entender a relação entre os marcadores medidos nesse estudo e a progressão da endometriose calculamos as razões de chances para o desenvolvimento de endometriose utilizando a regressão logística univariável. O aumento do 8 OHdG provocou um aumento na chance para o desenvolvimento da endometriose de 51% comparado com o controle e uma chance significativa de 14% de desenvolver endometriose estágio III/IV. (OR 1.51, $p=0.0007$; OR 1.14, $p=0.004$ respectivamente). Associado ao maior risco, encontramos uma chance significativa menor de 20% relacionada ao marcador

OGG1 de desenvolver endometriose comparada com o controle e uma proteção significativa de 18% de desenvolver estádios avançados da doença. (OR 0.8, p=0.009; OR 0.82, p=0.011). O aumento da chance ligada ao marcador de oxidação proteica para o desenvolvimento de endometriose foi de 149% (OR 2.59 p=0.021). Não houve diferença estatística da oxidação proteica para o desenvolvimento de estádios avançados de endometriose. A tabela 6 resume as razões de chances ligadas a todos os marcadores dosados neste estudo.

Tabela 6: Resumo das razões de chances (*Odds Ratio*-Regressão logística univariável) dos marcadores de estresse oxidativo para o desenvolvimento de qualquer estágio de endometriose e estádios avançados da doença.

	ENDOMETRIOSE		ESTÁDIOS AVANÇADOS	
	Razão de Chance	p Valor	Razão de Chance	p Valor
8-OHdG	1.51	0.0007*	1.14	0.004*
OGGI	0.80	0.009*	0.82	0.011*
PC	2.49	0.021*	1.34	0.38
CAT	1.00	0.64	1.00	0.43
EROs	1.00	0.33	1.00	0.45
LPO	1.41	0.53	6.41	0.11

* P <0.05 Estatisticamente Significante - PC - Oxidação Proteica - CAT - Capacidade Total Antioxidante- EROs - Espécies Reativas de Oxigênio - LPO - Oxidação Lipídica - 8 OHdG - 8-hidroxi-2-deoxiguanosina- OGG1 - Oxo-guaninaglicosilase

Utilizamos os marcadores dosados neste estudo para calcular curvas *ROC* (*Receiver Operating Characteristics*). A curva ROC foi calculada para cada marcador utilizando a sensibilidade e especificidade no diagnóstico da endometriose. Dentre os seis marcadores, os mais sensíveis e específicos foram o 8 OHdG com uma área

abaixo da curva (AAC) de 86%, seguida pelo marcador OGG1 com 79,4% AAC e finalmente a oxidação proteica com AAC de 70%. Os marcadores CAT, EROs e LPO não se mostraram validos para o uso no diagnóstico de endometriose. O gráfico 3 demonstram as curvas ROC dos seis marcadores.

Gráfico 3 : Curva ROC (*Receiver Operating Characteristics*), representando acurácia do marcador 8 OHdG para o diagnóstico de endometriose e para o diagnóstico dos estádios avançados da doença (eixo “Y” corresponde à taxa de verdadeiros positivos (Sensibilidade); eixo “X” corresponde à taxa de falso positivo)

Gráfico 4:Curva ROC (*ReceiverOperatingCharacteristics*), representando acurácia do marcador OGG1 para o diagnóstico de endometriose e para o diagnóstico dos estádios avançados da doença (eixo “Y” corresponde à taxa de verdadeiros positivos (Sensibilidade); eixo “X” corresponde à taxa de falso positivo) .

Gráfico 5:Curva ROC (*ReceiverOperatingCharacteristics*), representando acurácia do marcador PC para o diagnóstico de endometriose e para o diagnóstico dos estádios avançados da doença (eixo “Y” corresponde à taxa de verdadeiros positivos (Sensibilidade); eixo “X” corresponde à taxa de falso positivo).

Gráfico 6: Curva ROC (*Receiver Operating Characteristics*), representando acurácia do marcador EROs para o diagnóstico de endometriose e para o diagnóstico dos estádios avançados da doença (eixo “Y” corresponde à taxa de verdadeiros positivos (Sensibilidade); eixo “X” corresponde à taxa de falso positivo).

Gráfico 7: Curva ROC (*Receiver Operating Characteristics*), representando acurácia do marcador CAT para o diagnóstico de endometriose e para o diagnóstico dos estádios avançados da doença (eixo “Y” corresponde à taxa de verdadeiros positivos (Sensibilidade); eixo “X” corresponde à taxa de falso positivo).

Gráfico 8: Curva ROC (*Receiver Operating Characteristics*), representando acurácia do marcador LPO para o diagnóstico de endometriose e para o diagnóstico dos estádios avançados da doença (eixo “Y” corresponde à taxa de verdadeiros positivos (Sensibilidade); eixo “X” corresponde à taxa de falso positivo).

O modelo preditivo da progressão da endometriose foi construído combinando os três melhores marcadores (maior sensibilidade e especificidade). Os marcadores foram colocados no modelo estatístico em ordem de maior concordância na seguinte ordem: 8 OHG; OGG1; PC. As linhas separam o gráfico em quadrantes correspondentes aos respectivos grupos: quadrante inferior-esquerdo corresponde ao grupo sem endometriose; quadrante superior-esquerdo corresponde aos estádios I/II de endometriose, e o quadrante superior-direito corresponde ao grupo de pacientes com endometriose nos estádios III/IV. O modelo foi capaz de distinguir entre pacientes e prever o estágio da endometriose em aproximadamente 9 em 10 casos na população estudada (concordância 0.87).

Gráfico 9: Modelo preditivo de severidade de endometriose e grupo controle utilizando sensibilidade e especificidade dos marcadores de estresse oxidativo. Eixo “Y” corresponde à probabilidade de diagnosticar qualquer estágio de endometriose e o eixo “X” corresponde à probabilidade de diagnosticar estádios avançados de doença.

IV. Discussão

Endometriose afeta 10% da população feminina em idade reprodutiva. Considerando a população mundial, estima-se que mais de 700 milhões de mulheres são afetadas pela doença.(Giudice 2010)Dentre todas as mulheres afetadas 40% delas vão desenvolver doença avançada e mais de 35% delas podem ser inférteis(Abrão et al. 2009).

De acordo com Arruda et al 2003, quanto mais jovem a paciente mais longo é o tempo necessário para o diagnóstico. A média de tempo entre o início dos sintomas e o diagnóstico correto de endometriose encontrado foi de 7 anos. Nas pacientes com menos de 12 anos de idade, a mediana encontrada foi de 12.1 anos(Arruda et al. 2003).

Os radicais livres de oxigênio estão sendo relacionados como um dos fatores chaves na progressão e agressividade da endometriose.A alta incidência/prevalência da endometriose, o impacto da doença na qualidade de vida das mulheres e as crescentes evidências sobre a participação do EO foram as principais motivações para estudarmos a relação dos radicais livres de oxigênio e a endometriose.

Nosso trabalho se iniciou em março de 2010 com a submissão do projeto ao comitê de ética. Após a aprovação, iniciamos a inclusão de pacientes elegíveis. Entre Julho de 2010 e Agosto de 2011, 44 pacientes consecutivas foram selecionadas. A inclusão consecutiva das pacientes evitou o viés de seleção inerentes ao desenho do nosso estudo. As pacientes eram identificadas prospectivamente através do prontuário eletrônico da Cleveland Clinic. Todas as pacientes foram operadas pelo mesmo cirurgião e as com confirmação de endometriose formaram o grupo A e B. As pacientes com confirmação de ausência de endometriose formaram o grupo C,

comprovado pela laparoscopia. O grupo das pacientes com endometriose foi formado por 30 pacientes, 14 em estágio I/II e 16 em estágio III/IV.

Considerando as características demográficas da população incluída (tabela 2), nota-se que nos três grupos a presença de sobrepeso, com as médias em um intervalo entre 27 a 31 (endometriose estágio I/II e grupo controle respectivamente). Porém não houve diferença estatísticas entre os grupos incluídos. Observa-se também uma diferença significativa da dor pélvica em pacientes com endometriose estágio III/IV.

A fim de comparar os níveis dos marcadores de stress oxidativo em pacientes com endometriose com pacientes controle, utilizamos 3 técnicas de laboratório diferentes. A quimioluminescência, espectrofotometria e a imunoistoquímica. A quimioluminescência utiliza a emissão de luz, resultante da ligação das espécies reativas de oxigênio com o probe (5-amino-2,3-dihydro 1,4, phthalazinedione) chamado luminol. A técnica permite a medida da taxa global de espécies reativas de oxigênio (intracelular e extracelular). A espectrofotometria calcula a absorção de irradiação de um determinado comprimento de onda, enquanto a imunoistoquímica baseia-se nas reações de antígeno e anticorpo específico encontrado em um tecido de interesse. Ambas as técnicas laboratórios estão validadas na literatura. A aplicação dos métodos já validados em marcadores nunca antes publicados no auxiliou a produzir resultados cientificamente consistentes (Agarwal and Allamaneni 2004).

Dos quatro marcadores medidos em fluido peritoneal em pacientes com endometriose apenas a oxidação proteica foi encontrada significativamente aumentada. Apesar de observarmos uma tendência de aumento das espécies reativas

de oxigênio em pacientes com endometriose, não encontramos significância estatística entre os grupos. Os marcadores avaliados em biópsiado tecido com endometriose demonstraram-se progressivamente aumentados em pacientes com endometriose. Interpretamos esses achados como sendo os marcadores em tecido menos vulneráveis as variações mensais. Os marcadores de estresse oxidativo no fluido peritoneal flutuam mais facilmente com o momento inflamatório que a doença se encontra, porém os marcadores de agressão tecidual teoricamente flutuam menos com o ciclo e o momento da doença, pode ser interpretado como um marcador de agressão crônica em estádios avançados da endometriose.

De forma inédita na literatura demonstramos, que o marcador OGG1 e de PC estão significativamente aumentadas em pacientes com endometriose comparadas com pacientes controles. O marcador 8 OhdG foi visto por 4 outros estudos (Kao et al. 2005, Matsuzaki and Schubert 2010, Slater et al. 2005, Yamaguchi et al. 2008). Nossos resultados concordam com Kao et al 2005, Yamaguchi et al 2008 e Matsuzaki et al 2009. Assim como os nossos resultados, esses três trabalhos científicos demonstraram aumento da lesão de DNA em pacientes com endometriose, comparadas com o controle. Apenas Slater et al 2005 não demonstraram esse achado.

O que nosso estudo também trouxe pela primeira vez na literatura foi a relação entre marcadores do sistema antioxidante e marcadores oxidativos. Através da utilização do índice de Spearman conseguimos comparar marcadores de ataque e defesa, ou seja comparamos LPO, EROs, PC, 8 OhdG com CAT e OGG1. A avaliação dos riscos através dos *odds ratios*, assim como o modelo preditivo avaliados no nosso trabalho também são inéditos.

Os resultados de lesão e reparo de DNA corroboram para a hipótese de que o estresse oxidativo pode participar na progressão da endometriose. Esses achados demonstraram que os radicais livres estão envolvidos na instabilidade celular e podem ser um dos fatores que contribui para a agressividade da endometriose(Ngô et al 2009).

A resposta natural do sistema antioxidante, frente a uma agressão oxidativa é aumentar a atividade das vias de reparo. O que observamos em pacientes com estádios avançados de endometriose foi exatamente o oposto. Pacientes com estádios avançados de doença apresentaram altas taxas de lesão oxidativa e não demonstraram uma resposta satisfatória do sistema antioxidante. Isso pode ser notado na relação entre a glândula e o estroma nos marcadores 8 OhdG e OGG1.

Notamos que nos estádios III/IV de endometriose a glândula assim como o estroma, apresentaram altas taxas de lesão oxidativa do DNA. Quando avaliamos no mesmo local a expressão do marcador de defesa de DNA (OGG1), notamos que a glândula possui um boa expressão de reparo mas o estroma ao redor em lesões endométriotica quase não expressa reparo. Optamos por não agrupar os casos de acordo com locais de doença já que os casos foram coletados consecutivamente e no final não teríamos dados suficientes para uma análise estatística. Pretendemos aprofundar nossa análise futuramente com novos casos que serão avaliados no Brasil.

A observação de que pacientes com estádios avançados de doença não possuem reparo no estroma ao redor da lesão de endometriose, corroboram para o entendimento da formação de fibrose e aderências causadas por estádios III/IV de endometriose. A observação das aderências encontrada durante a laparoscopia pode em parte, ser entendido pela instabilidade entre a estroma/glândula da expressão da

glicosilase de reparo de DNA. A falta da proteção antioxidante causaria quebra da membrana lipoprotéica e morte celular, ativando fator em cascata do sistema cicatricial.

Nosso estudo está de acordo com o publicado por Ngô et al 2009, onde o mesmo afirma que o desequilíbrio entre a produção de radicais livres de oxigênio e o sistema antioxidante estariam envolvidos na agressividade da endometriose. Em pacientes com endometriose, o processo inflamatório produz mais radicais livres que são constantemente produzidos levando a morte celular, cicatrização e aderências típicas da doença (Ngô et al. 2009).

Vários fatores podem estar envolvidos no desequilíbrio entre a produção de radicais livres e o sistema antioxidante em pacientes com endometriose. Algumas possíveis explicações seriam: 1-) elevada concentração de marcadores inflamatórios encontradas no fluido peritoneal em pacientes com endometriose (Podgaec et al. 2007); 2-) aumento da concentração de ferro pélvico oriundos da menstruação retrograda, que através da reação de *Fenton* aumentariam os níveis de radicais livres na cavidade peritoneal (Defrere et al. 2008); 3-) baixo consumo de frutas e vegetais como fontes de agentes antioxidantes (Parazzini et al. 2004). Nosso estudo evidenciou de forma inédita a diminuição da atividade OGG1 frente o aumento da agressão oxidativa.

A fim de transpor a limitação atual dos exames de imagem de estratificar e quantificar as pacientes quanto a gravidade da doença, construímos um modelo preditivo utilizando os marcadores de estresse oxidativos medidos no nosso trabalho. Os marcadores de maior sensibilidade e especificidade entraram de modelo em ordem decrescente, na seguinte ordem: 8OhdG, OGG1, PC. O modelo construído foi

altamente discriminatório, foi capaz de prever a presença ou a ausência de doença, assim como o estágio da doença corretamente em aproximadamente 9 em cada 10 casos (Índice de concordância de 87%).

Existem evidências crescentes na literatura para o envolvimento do EO como fator importante na progressão da endometriose, o que foi também demonstrado neste trabalho. Nossos marcadores que demonstraram resultados mais expressivos (8OhdG e OGG1) só foram avaliados por uma única técnica laboratorial.

Perspectivas

Futuros estudos avaliando marcadores de estresse oxidativo no endométrio tópico das portadoras de endometriose podem ser úteis na elucidação da fisiopatologia da endometriose. Adicionalmente, entendemos que a análise de um maior número de casos permitindo uma avaliação do comportamento destes marcadores de estresse oxidativo em diferentes fases do ciclo menstrual pode ser útil para este conhecimento.

Nossos resultados abrem também uma nova fronteira para o uso de novos marcadores para o diagnóstico precoce da endometriose. O diagnóstico precoce pode ajudar no diagnóstico precoce da endometriose.

Por fim, tratamentos específicos das alterações relacionadas ao estresse oxidativo podem representar no futuro uma excelente perspectiva para a melhoria da qualidade de vida de pacientes com essa doença. Sol, excesso de exercício físico e a alimentação inadequada são altas fontes de radicais livres de oxigênio e devem ser evitados. Nossos resultados encorajam a mudança do estilo de vida em pacientes com endometriose, porém mais estudos devem ser feitos para entender o real

impacto das mudanças comportamentais e o decréscimo dos radicais livres e o impacto na agressividade da doença.

V. Conclusões

Através dos nossos resultados podemos concluir que:

- pacientes com endometriose apresentam níveis aumentados de 8 OhdG, OGG1 e PC quando comparados com pacientes sem endometriose. Existe uma relação inversa entre dano e reparo de DNA com o aumento do estágio de endometriose
- Com o aumento de lesão ao DNA os riscos de desenvolver endometriose aumentaram 50%, quanto que o aumento do reparo de DNA oferece uma proteção é de 20%
- Encontramos um acurácia de 86%; 79%; 69% para o diagnóstico de endometriose com a utilização dos marcadores 8OhdG; OGG1; PC respectivamente. Concluimos que os marcadores de estresse oxidativo podem ser úteis para o diagnóstico minimamente invasivo de endometriose.

VI. Referências Bibliográficas

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrão MS, Dias JA,Jr, Bellelis P, Podgaec S, Bautzer CR and Gromatsky C. Endometriosis of the ureter and bladder are not associated diseases . *FertilSteril* 2009;**91**:1662-1667.

Abrão MS, Dias JA,Jr, Rodini GP, Podgaec S, Bassi MA and Averbach M. Endometriosis at several sites, cyclic bowel symptoms, and the likelihood of the appendix being affected . *FertilSteril* 2010;**94**:1099-1101.

Abrão MS, Goncalves MO, Ajossa S, Melis GB and Guerriero S. The sonographic diagnosis of deep endometriosis . *J Ultrasound Med* 2009;**28**:408-9; author reply 409-10.

Abrão MS, Neme RM, Carvalho FM, Aldrighi JM and Pinotti JA. Histological classification of endometriosis as a predictor of response to treatment .*Int J GynaecolObstet* 2003;**82**:31-40.

Abrão MS, Podgaec S, Filho BM, Ramos LO, Pinotti JA and de Oliveira RM. The use of biochemical markers in the diagnosis of pelvic endometriosis . *Hum Reprod* 1997;**12**:2523-2527.

Agarwal A and Allamaneni SSR. Oxidants and antioxidants in human fertility. *Middle East Fertility Society Journal* 2004;**9**:187-197.

Agarwal A, Gupta S and Sharma R. Oxidative stress and its implications in female infertility - a clinician's perspective. *Reprod Biomed Online* 2005;**11**:641-650.

Agarwal A, Gupta S and Sikka S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction .*CurrOpinObstetGynecol* 2006;**18**:325-332.

Andrade AZ, Rodrigues JK, Dib LA, Romao GS, Ferriani RA, Jordao Junior AA and Navarro PA. Serum markers of oxidative stress in infertile women with endometriosis] . *Rev Bras GinecolObstet* 2010;**32**:279-285.

Arruda MS, Petta CA, Abrão MS and Benetti-Pinto CL. Time elapsed from onset of symptoms to diagnosis of endometriosis in a cohort study of Brazilian women . *Hum Reprod* 2003;**18**:756-759.

Augoulea A, Mastorakos G, Lambrinoudaki I, Christodoulakos G and Creatsas G. The role of the oxidative-stress in the endometriosis-related infertility.*GynecolEndocrinol* 2009;**25**:75-81.

Barbieri RL, Niloff JM and Bast Jr. RC. Elevated serum concentrations of CA-125 in patients with advanced endometriosis.*FertilSteril* 1986;**45**:630-634.

Berkkanoglu M and Arici A. Immunology and endometriosis. *American Journal of Reproductive Immunology* 2003;**50**:48-59.

Berlett BS and Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 1997;**272**:20313-20316.

Bravard A, Vacher M, Moritz E, Vaslin L, Hall J, Epe B and Radicella JP. Oxidation status of human OGG1-S326C polymorphic variant determines cellular DNA repair capacity. *Cancer Res* 2009;**69**:3642-3649.

Carvalho L, Nataraj N, Rao J, Khetarpal S, Abrão MS and Agarwal A. Seven ways to preserve female fertility in patients with endometriosis. *Expert Review of Obstetrics and Gynecology* 2012;**7**:227-240.

Carvalho L, Podgaec S, Bellodi-Privato M, Falcone T and Abrão MS. Role of eutopic endometrium in pelvic endometriosis. *J Minim Invasive Gynecol* 2011;**18**:419-427.

Carvalho LFP, Samadder AN, Agarwal A, Fernandes LFC and Abrão MS. Oxidative stress biomarkers in patients with endometriosis: systematic review. *ArchGynecolObstet* 2012:1-8.

Chevion M, Berenshtein E and Stadtman ER. Human studies related to protein oxidation: Protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radic Res* 2000;**33**:S99-S108.

Christodoulakos G, Augoulea A, Lambrinoudaki I, Sioulas V and Creatsas G. Pathogenesis of endometriosis: The role of defective 'immunosurveillance'. *European Journal of Contraception and Reproductive Health Care* 2007;**12**:194-202.

Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A and Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 2003;**329**:23-38.

Defrere S, Lousse JC, Gonzalez-Ramos R, Colette S, Donnez J and Van Langendonckt A. Potential involvement of iron in the pathogenesis of peritoneal endometriosis. *Mol Hum Reprod* 2008;**14**:377-385.

Fairbanks F, Abrão MS, Podgaec S, Dias JA, Jr, de Oliveira RM and Rizzo LV. Interleukin-12 but not interleukin-18 is associated with severe endometriosis. *Fertil Steril* 2009;**91**:320-324.

Falcone T and Mascha E. The elusive diagnostic test for endometriosis. *Fertil Steril* 2003;**80**:886-888.

Foyouzi N, Berkkanoglu M, Arici A, Kwintkiewicz J, Izquierdo D and Duleba AJ. Effects of oxidants and antioxidants on proliferation of endometrial stromal cells. *Fertil Steril* 2004;**82 Suppl 3**:1019-1022.

Frank E Harrell Jr “RMS: Regression Modeling Strategies” R package version 3.3.0 2011

Fujii H, Kono K, Nakai K, Goto S, Komaba H, Hamada Y, Shinohara M, Kitazawa R, Kitazawa S and Fukagawa M. Oxidative and nitrosative stress and progression of diabetic nephropathy in type 2 diabetes . *Am J Nephrol* 2010;**31**:342-352.

Gagné D, Rivard M, Pagé M, Lépine M, Platon C, Shazand K, Hugo P and Gosselin D. Development of a nonsurgical diagnostic tool for endometriosis based on the detection of endometrial leukocyte subsets and serum CA-125 levels. *FertilSteril* 2003;**80**:876-885.

Giudice LC. Clinical practice. Endometriosis . *N Engl J Med* 2010;**362**:2389-2398.

Giudice LC and Kao LC. Endometriosis. *Lancet* 2004;**364**:1789-1799.

Guichardant M, Chantegrel B, Deshayes C, Doutheau A, Moliere P and Lagarde M. Specific markers of lipid peroxidation issued from n - 3 and n - 6 fatty acids. *BiochemSoc Trans* 2004;**32**:139-140.

Gupta S, Agarwal A, Krajcir N and Alvarez JG. Role of oxidative stress in endometriosis. *Reprod Biomed Online* 2006;**13**:126-134.

Gupta S, Goldberg JM, Aziz N, Goldberg E, Krajcir N and Agarwal A. Pathogenic mechanisms in endometriosis-associated infertility . *FertilSteril* 2008;**90**:247-257.

Guzik TJ, Korbout R and Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2003;**54**:469-487.

Halliwell B and Gutteridge JM. Free radicals and antioxidant protection: mechanisms and significance in toxicology and disease. *Hum Toxicol* 1988;**7**:7-13.

Ho HN, Wu MY, Chen SU, Chao KH, Chen CD and Yang YS. Total antioxidant status and nitric oxide do not increase in peritoneal fluids from women with endometriosis . *Hum Reprod* 1997;**12**:2810-2815.

Isobe C, Abe T and Terayama Y. Levels of reduced and oxidized coenzyme Q-10 and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in the cerebrospinal fluid of patients with living Parkinson's disease demonstrate that mitochondrial oxidative damage and/or oxidative DNA damage contributes to the neurodegenerative process . *NeurosciLett* 2010;**469**:159-163.

Jackson LW, Schisterman EF, Dey-Rao R, Browne R and Armstrong D. Oxidative stress and endometriosis. *Hum Reprod* 2005;**20**:2014-2020.

Kao SH, Huang HC, Hsieh RH, Chen SC, Tsai MC and Tzeng CR. Oxidative damage and mitochondrial DNA mutations with endometriosis . *Ann N Y AcadSci* 2005;**1042**:186-194.

Karahalil B, Kocabas NA and Ozcelik T. DNA repair gene polymorphisms and bladder cancer susceptibility in a Turkish population . *Anticancer Res* 2006;**26**:4955-4958.

Kobayashi H, Yamashita Y, Iwase A, Yoshikawa Y, Yasui H, Kawai Y, Uchida K, Uno N, Akatsuka S, Takahashi T *et al.* The ferroimmunomodulatory role of ectopic endometriotic stromal cells in ovarian endometriosis. *FertilSteril* 2012;**98**:415-422.e12.

Lambrinoudaki IV, Augoulea A, Christodoulakos GE, Economou EV, Kaparos G, Kontoravdis A, Papadias C and Creatsas G. Measurable serum markers of oxidative stress response in women with endometriosis. *FertilSteril* 2009;**91**:46-50.

Leconte M, Nicco C, Ngo C, Chereau C, Chouzenoux S, Marut W, Guibourdenche J, Arkwright S, Weill B, Chapron C *et al.* The mTOR/AKT inhibitor temsirolimus prevents deep infiltrating endometriosis in mice . *Am J Pathol* 2011;**179**:880-889.

Liu Y, Luo L and Zhao H. Levels of lipid peroxides and superoxide dismutase in peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Journal of Tongji Medical University* 2001;**21**:166-167.

Ma H, Wang J, Abdel-Rahman SZ, Boor PJ and Khan MF. Oxidative DNA damage and its repair in rat spleen following subchronic exposure to aniline . *ToxicolApplPharmacol* 2008;**233**:247-253.

Matarese G, De Placido G, Nikas Y and Alviggi C. Pathogenesis of endometriosis: Natural immunity dysfunction or autoimmune disease?. *Trends Mol Med* 2003;**9**:223-228.

Matsuzaki S and Schubert B. Oxidative stress status in normal ovarian cortex surrounding ovarian endometriosis. *FertilSteril* 2010;**93**:2431-2432.

Mier-Cabrera J, Genera-Garcia M, De la Jara-Diaz J, Perichart-Perera O, Vadillo-Ortega F and Hernandez-Guerrero C. Effect of vitamins C and E supplementation on peripheral oxidative stress markers and pregnancy rate in women with endometriosis . *Int J GynaecolObstet* 2008;**100**:252-256.

Mier-Cabrera J, Jimenez-Zamudio L, Garcia-Latorre E, Cruz-Orozco O and Hernandez-Guerrero C. Quantitative and qualitative peritoneal immune profiles, T-cell apoptosis and oxidative stress-associated characteristics in women with minimal and mild endometriosis . *BJOG* 2011;**118**:6-16.

Movahed A, Yu L, Thandapilly SJ, Louis XL and Netticadan T. Resveratrol protects adult cardiomyocytes against oxidative stress mediated cell injury. *Arch BiochemBiophys* 2012:.

Nagata M. Inflammatory cells and oxygen radicals. *Current Drug Targets: Inflammation and Allergy* 2005;**4**:503-504.

Ngo C, Chereau C, Nicco C, Weill B, Chapron C and Batteux F. Reactive oxygen species controls endometriosis progression. *Am J Pathol* 2009;**175**:225-234.

Olive DL and Pritts EA. The treatment of endometriosis: A review of the evidence. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2002;**955**:360-372.

Osborn BH, Haney AF, Misukonis MA and Weinberg JB. Inducible nitric oxide synthase expression by peritoneal macrophages in endometriosis-associated infertility. *FertilSteril* 2002;**77**:46-51.

Ota H, Igarashi S and Tanaka T. Xanthine oxidase in eutopic and ectopic endometrium in endometriosis and adenomyosis. *FertilSteril* 2001;**75**:785-790.

Parazzini F, Chiaffarino F, Surace M, Chatenoud L, Cipriani S, Chiantera V, Benzi G and Fedele L. Selected food intake and risk of endometriosis. *Hum Reprod* 2004;**19**:1755-1759.

Pierce JD, Cackler AB and Arnett MG. Why should you care about free radicals? . *RN* 2004;**67**:38-42; quiz 43.

Podgaec S, Abrão MS, Dias JA,Jr, Rizzo LV, de Oliveira RM and Baracat EC. Endometriosis: an inflammatory disease with a Th2 immune response component. *Hum Reprod* 2007;**22**:1373-1379.

Podgaec S, Dias Junior JA, Chapron C, Oliveira RM, Baracat EC and Abrão MS. Th1 and Th2 immune responses related to pelvic endometriosis. *Rev Assoc Med Bras* 2010;**56**:92-98.

Podgaec S, Goncalves MO, Klajner S and Abrão MS. Epigastric pain relating to menses can be a symptom of bowel endometriosis. *Sao Paulo Med J* 2008;**126**:242-244.

Raj L, Ide T, Gurkar AU, Foley M, Schenone M, Li X, Tolliday NJ, Golub TR, Carr SA, Shamji AF *et al*. Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS. *Nature* 2011;**475**:231-234.

Ramos IML, Podgaec S, Abrão MS, de Oliveira R and Baracat EC. Evaluation of CA-125 and soluble CD-23 in patients with pelvic endometriosis: A case-control study. *Rev Assoc Med Bras* 2012;**58**:26-32.

Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *FertilSteril* 1997;**67**:817-821.

Sampson JA. Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation. *Am J Pathol* 1927;**3**:93-110.43.

Shanti A, Santanam N, Morales AJ, Parthasarathy S and Murphy AA. Autoantibodies to markers of oxidative stress are elevated in women with endometriosis. *FertilSteril* 1999;**71**:1115-1118.

Sharma I, Dhaliwal LK, Saha SC, Sangwan S and Dhawan V. Role of 8-iso-prostaglandin F2alpha and 25-hydroxycholesterol in the pathophysiology of endometriosis. *FertilSteril* 2010;**94**:63-70.

Shibutani S, Takeshita M and Grollman AP. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature* 1991;**349**:431-434.

Slater M, Quagliotto G, Cooper M and Murphy CR. Endometriotic cells exhibit metaplastic change and oxidative DNA damage as well as decreased function, compared to normal endometrium. *J MolHistol* 2005;**36**:257-263.

Tobias Sing, Oliver Sander, NikoBeerenwinkel, Thomas Lengauer, "ROCR; Visualization the performance of scoring classifiers" package version 1.0.4 2009

Szczepanska M, Kozlik J, Skrzypczak J and Mikolajczyk M. Oxidative stress may be a piece in the endometriosis puzzle. *FertilSteril* 2003;**79**:1288-1293.

Van Langendonck A, Casanas-Roux F and Donnez J. Oxidative stress and peritoneal endometriosis. *FertilSteril* 2002;**77**:861-870.

Verit FF, Erel O and Celik N. Serum paraoxonase-1 activity in women with endometriosis and its relationship with the stage of the disease. *Hum Reprod* 2008;**23**:100-104.

Vinatier D, Orazi G, Cosson M and Dufour P. Theories of endometriosis. *Eur J ObstetGynecolReprodBiol* 2001;**96**:21-34.

Wang Y, Sharma RK, Falcone T, Goldberg J and Agarwal A. Importance of reactive oxygen species in the peritoneal fluid of women with endometriosis or idiopathic infertility. *FertilSteril* 1997;**68**:826-830.

West XZ, Malinin NL, Merkulova AA, Tischenko M, Kerr BA, Borden EC, Podrez EA, Salomon RG and Byzova TV. Oxidative stress induces angiogenesis by activating TLR2 with novel endogenous ligands. *Nature* 2010;**467**:972-976.

Yamaguchi K, Mandai M, Toyokuni S, Hamanishi J, Higuchi T, Takakura K and Fujii S. Contents of endometriotic cysts, especially the high concentration of free

iron, are a possible cause of carcinogenesis in the cysts through the iron-induced persistent oxidative stress. *Clin Cancer Res* 2008;**14**:32-40.

Yang WC, Chen HW, Au HK, Chang CW, Huang CT, Yen YH and Tzeng CR. Serum and endometrial markers . *Best Pract Res Clin ObstetGynaecol* 2004;**18**:305-318.

VIII. Anexos

Anexo 1:Revisão Sistemática atualizada dos trabalhos publicados na literatura envolvendo a dosagem de radicais livres e marcadores de estresse oxidativo em pacientes com e sem endometriose

Autor	Ano	Marcador	Amostra	Resultado
Wang et al	1997	ROS	Fluido Peritoneal	Não Significante
HO et al	1997	NO	Fluido Peritoneal	Não Significante
Shanti et al	1999	Ox-LDL	Sangue/FP	Não Significante
Ota et al	2001	Xanthine Oxidase	Tecido	Aumentado
Osborn et al	2002	NO/NOSynthase	Fluido Peritoneal	Aumentado
Szcpanska et al	2003	LPO	Fluido Peritoneal	Aumentado
Foyouzi et al	2004	H2O2/HX/OX	Tecido	Aumentado
Jackson et al	2005	8-F2-Iso/PON-1/TBARS	Sangue	Dimunido
Slater et al	2005	8-OHdG/P-Cadherin	Tecido	Não Significante
Kao et al	2006	LPO	Tecido	Aumentado
Yamagushi et al	2008	8-OHdg/Iron/LPO	Tecido	Aumentado
Cabrera et al	2008	MDA/LOOHs	Sangue/FP	Dimunido
Verit et al	2008	LOOH/PON-1	Sangue	Aumentado/Diminuido
Lambrinouadaki et al	2009	IMA/HSP70/HSP70b'	Sangue	NS/Aumentado
Sharma Indu et al	2009	25-OH-Chol/8-Iso-PG	Sangue/FP	Aumentado
Matsuzaki et al	2009	8-OHdG	Tecido	Aumentado
Ngo et al	2009	Superoxide Anion	Tecido	Aumentado
Mier-Cabrera	2011	MDA	Sangue/FP	Aumentado
Leconte et al	2011	NO/H2O2	Tecido	Aumentado/NS
Kobayashi	2012	HNEJ-2/8-OHdG	Tecido	Aumentado

Anexo 2: Marcadores de estresse oxidativo publicado na literatura, agrupados por classes.....

Atividade Enzimática	Radicais Livres	Oxidação Lipídica	Oxidação Protéica	Lesão de DNA
XO (Ota et al 2001) NOS2 (Osborn et al 2002) XO (Foyouzi et al 2004) PON-1 (Jackson et al 2005) PON-1 (Verit et al 2008)	NO (Ho et al 1997) ROS (Wong et al 1997) NO (Ota et al 2001) H2O2 (Foyouzi et al 2004) Freelron (Yamaguchi et al 2008) O2- (Ngo et al 2009) O2- (Leconte et al 2011) H2O2 (Leconte et al 2011) NO (Leconte et al 2011)	LPO (Shanti et al 1999) MDA (Shanti et al 1999) LPO (Shanti et al 1999) LPO (Szczepanka et al 2003) 8-F2-Iso (Jackson et al 2005) TBARS (Jackson et al 2005) LPO (Kao et al 2005) LOOH (Cabrera et al 2008) LPO (Yamaguchi et al 2008) 8-Iso-PGF2a (Sharma et al 2009) 25-OH-Chol (Sharma et al 2009) MDA (Mier et al 2011)	P-Cadherin (Slater et al 2005) IMA (Lambrinoudaki et al 2005) HSP70 (Lambrinoudaki et al 2005) HSP70b' (Lambrinoudaki et al 2005) HNEJ-2 (Kobayashi et al 2012)	8OHdG (Kao et al 2005) 8OHdG (Slater et al 2005) 8OHdG (Yamaguchi et al 2008) 8OHdG (Matsuzaki et al 2009) 8OHdG (Kobayashi et al 2012)

Anexo 3: Aprovação do Comitê de Ética (Cleveland Clinic - USA)

June 3, 2010

Luiz Fernando Carvalho, MD / A-81

RE: IRB # 10-443: EXEMPT: Oxidative Damage are Involved in
Endometriosis Progression

Dear Dr. Carvalho:

Your new study Exempt Research Application received on 6/2/2010, with Protocol dated 5/26/2010 has been reviewed on 6/3/2010 and was approved under the federal exemption Category #4: research involving the collection or study of existing data and the sources are public for research involving the collection or study of existing data and the information is recorded by the investigator in such a manner that subjects cannot be identified. You are approved to conduct this research effective without further continuing review.

Sincerely,

Daniel Beyer, M.S., MHA, CIP

Executive Director, IRB and Human Subject Protection Program

DB: lrd

THIS STUDY IS EXEMPT

IX. Manuscritos

Oxidative stress biomarkers in patients with endometriosis: systematic review

Luiz Fernando Pina Carvalho · Abhishek Neil Samadder ·
Ashok Agarwal · Luiz Flávio C. Fernandes ·
Mauricio S. Abrão

Received: 9 December 2011 / Accepted: 18 June 2012
© Springer-Verlag 2012

Abstract

Purpose Since the first description about oxygen toxicity made by Joseph Priestley, the oxidative stress has been enrolled as a key factor in the pathogenesis of endometriosis. Our aim was to review oxidative stress biomarkers measured in patients with endometriosis.

Methods Relevant studies were identified by searches of the MEDLINE database from 1990 to March 2011 using endometriosis, free radical and oxidative stress as mesh terms. We only included manuscripts in English, and review articles were excluded. In addition, free radical chemistry and oxidative stress history were discussed.

Results After inclusion and exclusion criteria, 19 articles were selected to be included in this systematic review. A total of 36 oxidative stress biomarkers (20 different markers) were measured in patients with endometriosis. Some of the markers were measured in more than one manuscript. They were arranged in five subgroups: Enzymatic activity ($n = 3$), Anions/free radicals ($n = 5$), Lipoperoxidation markers ($n = 7$), DNA Damage markers ($n = 1$), and Protein oxidation ($n = 4$). Of those 36 markers, 23 were found to be significantly higher in patients with endometriosis comparing with control patients.

Conclusion Oxidative stress plays an important role in the pathogenesis and progression of endometriosis.

Keywords 8-Hydroxy-2-deoxyguanosine · Cell toxicity · DNA damage · Endometriosis · Free radical · Oxidative stress

Introduction

“The same thing that makes you live can kill you in the end.” These famous words by Neil Young perfectly describe the bilateral role of oxygen in human body. Oxygen, being the molecule in air most responsible for life, was always a subject of interest of scientists. As early as in fifteenth century, Leonardo DaVinci noted that the same air that is capable of sustaining life also has the capacity to support combustion, suggesting its multifaceted properties [1].

Joseph Priestley first described oxygen toxicity in 1775. During his experiments that led him to discovery of “dephlogisticated air”, or oxygen, Priestley noted that pure oxygen produced by the plants supports combustion better than regular air. After his observation of combustion in pure oxygen, he profoundly communicated “we might live out too fast, and the animal powers be too soon exhausted, in this pure kind of air. A moralist, at least, may say that air which nature has provided for us is as good as we deserve”. However, he was not able to either explain why pure oxygen is harmful or provide any evidence to support his claim [2].

Priestley divulged his observation to Lavoisier, who understood its theoretical implications. Despite the limited knowledge of body’s biochemistry at the time, Lavoisier made a correct assumption about the chemical side of oxidative stress, explaining that “oils by adding oxygen, are convertible to vegetable oxides and acids according to their degrees of oxidation”; however, he was yet to

L. F. P. Carvalho (✉) · A. N. Samadder · A. Agarwal
Center for Reproductive Medicine, Obstetrics and Gynecology
and Women’s Health Institute, Cleveland Clinic,
9500 Euclid Ave, Cleveland, Ohio 44195, USA
e-mail: luizcarvalho.dr@me.com

L. F. P. Carvalho · L. F. C. Fernandes · M. S. Abrão
Department of Obstetrics and Gynecology, São Paulo
University, São Paulo, Brazil

demonstrate the effects of oxygen toxicity in animal models [3].

In 1878, Paul Bert established the toxicity of oxygen in high-pressure environment, by showing that sparrows exposed to atmospheric air at 15–20 atmospheres developed convulsions and died. Bert concluded that high-pressure oxygen releases a poison, but was not able to reproduce the symptoms by injecting the blood of “infected” animals into normal animals. [4, 5] Following Bert, Lorrain Smith demonstrated that moderately high atmospheric pressure results in lung inflammation and very high pressure results in Central Nervous System irritations, but yet she was unable to explain the phenomenon [4].

In the late 1800s, Moses Gomberg made a breakthrough that changed our perception of biochemical processes in the human body. He was able to isolate the first organic free radical, triphenylmethyl. Gomberg’s discovery allowed the understanding of a wide range of chemical reactions, including oxygen reactions within the human body, clarifying the nature of oxidative stress—free radical damage [6].

Existence of free radicals is expected in cells at any given time, due to their formation in normal oxidative metabolism; however, the disturbance of the elegant balance between free radicals and anti-oxidants causes oxidative stress. A state of oxidative stress can be induced by a number of factors, including chemical agents and radiation. Radiation-induced damage and oxidative stress are closely tied, mainly because irradiated cells produce damaging reactive oxygen species (ROS). In 1954, Gerschman et al. studied free radical formation as the common basis of action between x-ray irradiation and oxygen poisoning. The study demonstrated that antioxidants decrease the damage from x-ray irradiation [7]. On the contrary, study by Spitz et al. showed that cytoplasmic irradiation could result in damage to nuclear DNA; experiments with free radical scavengers have shown that DNA damage is dependent on ROS generation [8]. Thus, it can be proposed that the formation of free radicals account for the damage done by ionizing radiation.

Oxidative stress and endometriosis

According to Samson’s theory, iron, apoptotic endometrial tissue, and desquamated menstrual cells are transported into the peritoneal cavity after retrograde menstruation. This mechanism can induce a chronic inflammation and proinflammatory cytokines factors recruiting and activating immune cells, especially granulocytes and macrophages. These cells during these events produce many ROS and maybe are involved in endometriosis pathophysiology [9–11].

Oxidative stress has been proposed for many studies as a potential factor involved in the pathogenic and progression of the disease [9, 10, 12–14]. In patients with endometriosis oxidative stress may be responsible for local destruction of the tissue and for disease aggressiveness. This study will attempt to correlate and understand the relationship between oxidative stress biomarkers levels measured in patients with endometriosis.

Chemistry behind oxidative stress biomarkers measured in patients with endometriosis

Reactive oxygen species (ROS) are the unavoidable side products of aerobic respiration. Ground-state oxygen triplet is biradical with its two outermost valence electrons occupying separate orbitals with parallel spins and to oxidize a neutral atom or molecule it would need a donor of two electrons with parallel spins that fit into oxygen’s free electron orbitals. Fortunately, pairs of electrons typically have opposite spins, thus limiting the ability of oxygen triplets to form ROS. However, the formation of ROS by oxygen triplet can also happen in a different manner: by energy transfer or by electron transfer reactions. The former leads to the formation of singlet oxygen, whereas the latter results in the sequential reduction to superoxide, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical [15].

In the human body, cells’ ROS activity is a natural part of a cell’s metabolism and is reproduced by intracellular organelles. For example, in mitochondrion during the transportation of electrons in electron transport chain, premature reduction of oxygen happens and results in the formation superoxide ($\cdot\text{O}_2$). Not highly reactive by itself, superoxide results in an inactivation of some enzymes. In its protonated form, as perhydroxyl radical, it results in lipid peroxidation. Furthermore, it can release Fe^{3+} from iron-sulfur proteins and ferritin, propagating the progression of Haber and Weiss reaction [16, 17].

Due to the fact that reactions of superoxide (SOD) with non-radicals are spin forbidden, superoxide would mostly react with itself or with other biological radicals, such as nitric oxide or metals; however, dismutation of superoxide occurs rapidly, resulting production of O_2 and H_2O_2 by the following two-step enzymatic half-reactions:

The aforementioned reaction prevents the formation of other toxic radicals, making SOD enzyme family one of the key anti-oxidants in human body. The physiological importance of SODs is illustrated by the severe

pathologies evident in mice genetically engineered to lack these enzymes. Mice lacking SOD₂ die several days after birth, amid massive oxidative stress [18].

The Haber and Weiss reaction is an essential part of oxidative damage in cells. It is responsible for decomposition of hydrogen peroxide to highly reactive hydroxyl radicals, hydroxyl anions, and hydroperoxides. The reaction was described for the first time in 1930s by the German chemist Fritz Harber and his student Joseph Weiss based on the reaction developed in the late nineteenth century by Henry John Horstman Fenton. The reaction is catalyzed by iron and it is a catalytic cycle. The first step (1) of the reaction involves reduction of ferric ion to ferrous. The second step is the Fenton reaction, which decomposes the hydrogen peroxide into hydroxyl radical and hydroxyl anions [19].

1. $\text{Fe}^{3+} + \cdot\text{O}_2^- \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2$
2. $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$

Review methods

This review was done to evaluate the role of oxidative stress in patients with endometriosis. Relevant studies were identified by searches of the MEDLINE database from 1990 to August 2011. Electronic database searches were conducted in MEDLINE, using endometriosis and oxidative stress as a key word to retrieve relevant studies over the past 20 years. We only included manuscripts in English. Review articles and repeated manuscripts were excluded. A manual search of references was done for additional articles retrieval. Mesh terms included oxidative stress, endometriosis, and free radical. Some of the electronic search strategies of MEDLINE are available in the Appendix.

Combining all our MEDLINE findings and references retrieved, we start our review with 247 articles. Based on title, we excluded 194 citations. Abstracts of the remaining ($n = 53$) studies were examined, and, if relevant, were

Fig. 1 Flow chart showing the methods for the review

selected to read unabridged. Of these, using the inclusions criteria, 19 papers that measured markers of oxidative stress in patients with endometriosis were selected to be part of this review (Fig. 1). We also described oxidative stress history and free radical chemistry in the markers measured in patients with endometriosis.

Study selection

Our inclusion criteria were original articles that have measured markers of oxidative stress in patients with endometriosis. The retrieved articles were reviewed by two independent authors included in this manuscript. We only included papers that were published in English. Studies considered in this review were manuscripts that measured markers of OS in blood, tissue, and peritoneal fluid. A total of 21 papers were selected as eligible articles. Finally, after the exclusion criteria, informed on Fig. 1, 19 were selected to be part of this systematic review.

Data extraction

From studies that we included in this review, we extracted the following information: sample used, phase of the cycle measured, technique used to measure, number of patients involved, in which stage of endometriosis were the patients included, which group of patients were used as a control group.

Biomarkers measured in Endometriosis patients

Between 1997 and 2011 we found 19 manuscripts that measure markers of oxidative stress in endometriosis patients. A total of 36 oxidative stress markers (20 different markers) were measured in patients with endometriosis. They were arranged in five subgroups. All markers are showed in Table 1.

1. Enzymatic activity [20–24]
2. Free radical/anions [11, 20, 22, 25–28]
3. Markers of lipoperoxidation [10, 23, 24, 27, 29–33]
4. DNA damage markers [27, 30, 34, 35]
5. Oxidation of protein [34, 36]

The oxidation of lipids was extensively studied with 14 manuscripts between 1990 and 2011; the second one was measurement of free radical and anions with nine markers, followed by five manuscripts quantifying enzymatic activity and with four manuscripts each looking at DNA damage markers, and protein modification by oxidative stress.

From all 19 manuscripts included in this systematic review, a total of 36 markers of oxidative stress markers were measured and 23 markers were found to be significantly higher in patients with endometriosis; in addition, only in 13 markers were not significant between patients with endometriosis and control patients. (Table 2)

Jackson et al., in 2005, evaluated the association between oxidative stress and endometriosis. In their study, women aged between 18 and 40 years who were

Table 1 Summary of the methods used in manuscripts included in this systematic review

Enzymatic activity	Free radical/anions	Lipoperoxidation markers	DNA damage markers	Protein oxidation
XO (Ota et al. [20])	NO (Ho et al. [25])	LPO (Shanti et al. [29])	8OHdG (Kao et al. [30])	P-Cadherin (Slater et al. [34])
NOS2 (Osborn et al. [21])	ROS (Wang et al. [26])	MDA (Shanti et al. [29])	8OHdG (Slater et al. [34])	IMA (Lambrinoudaki et al. [36])
XO (Foyouzi et al. [22])	NO (Ota et al. [20])	LPO (Shanti et al. [29])	8OHdG (Yamaguchi et al. [27])	HSP70 (Lambrinoudaki et al. [36])
PON-1 (Jackson et al. [23])	H ₂ O ₂ (Foyouzi et al. [22])	LPO (Szczepanska et al. [10])	8OHdG (Matsuzaki et al. [35])	HSP70b' (Lambrinoudaki et al. [36])
PON-1 (Verit et al. [24])	FreeIron (Yamaguchi et al. [27])	8-F2-Iso (Jackson et al. [23])		
	O ₂ ⁻ (Ngo et al. [11])	TBARS (Jackson et al. [23])		
	O ₂ ⁻ (Leconte et al. [28])	LPO (Kao et al. [12])		
	H ₂ O ₂ (Leconte et al. [28])	LOOH (Cabrera et al. [31])		
	NO (Leconte et al. [28])	LPO (Yamaguchi et al. [27])		
		8-Iso-PGF2a (Sharma et al. [32])		
		25-OH-Chol (Sharma et al. [32])		
		MDA (Mier et al. [33])		

Table 2 Summary of oxidative stress markers measured in patients with endometriosis

Authors	Year	Markers	Samples	Endometriosis/stage (ASRM)	Control	Significance
Ho et al.	1997	Nitric oxide	Peritoneal fluid	I–II (<i>N</i> = 12) and III–IV (<i>N</i> = 12)	No pelvic pathologic (<i>N</i> = 10)	No significance
Wang et al.	1997	ROS	Peritoneal fluid	(I <i>N</i> = 9) (II <i>N</i> = 4 > (III <i>N</i> = 1 > < IV <i>N</i> = 1)	Tubal ligation (<i>N</i> = 13) infertility (<i>N</i> = 11)	No significance
Shanti et al.	1999	Oxidized LDL(Ox-LDL)	Blood/peritoneal fluid	Endometriosis–no stage (<i>N</i> = 40)	Tubal Ligation (<i>N</i> = 21)	No significance
	1999	Lipid peroxide	Blood/peritoneal fluid			No significance
	1999	Malondialdehyde modified LDL	Blood/peritoneal fluid			No significance
Ota et al.	2001	Xanthine oxidase	Tissue	Endometriosis–no stage	No Pelvic Pathologic (<i>N</i> = 44)	No significance
Osborn et al.	2002	Nitric oxide	Peritoneal fluid	(I <i>N</i> = 2) (II <i>N</i> = 4 > (III <i>N</i> = 3 > (IV <i>N</i> = 4)	No Pelvic Pathologic (<i>N</i> = 10)	Higher
	2002	Nitric oxide synthase 2	Peritoneal fluid/macrophages			Higher
Szczepanska et al.	2003	Lipid peroxides	Peritoneal fluid	I (<i>N</i> = 29)	Linfertility (<i>N</i> = 15) and Fertile (<i>N</i> = 24)	Higher
Foyouzi et al.	2004	H ₂ O ₂	Tissue	Endometriosis–no stage	No pelvic pathologic	Induced proliferation
	2004	Hypoxanthine/xanthineoxidase (HX/OX)	Tissue		No pelvic pathologic	Induced proliferation
Jackson et al.	2005	8-F2-Isoprostane	Blood	Endometriosis–no stage (<i>N</i> = 32)	Tubal ligation (<i>N</i> = 23) infertility (<i>N</i> = 30)	Lower
	2005	PON-1 (paraoxonase-1)	Blood			Lower
	2005	TBARS	Blood			No significance
Kao et al.	2005	8-OHdG (8-hydroxy-2-deoxyguanosine)	Tissue	Endometriosis–no stage (<i>N</i> = 38/ <i>N</i> = 46)	Topic endometrium normal (<i>N</i> = 5)	Higher
	2005	Lipid peroxides	Tissue		Topic endometrium normal (<i>N</i> = 10)	Higher
Slater M et al.	2005	8-OHdG (8-hydroxy-2-deoxyguanosine)	Tissue	Endometriosis–no stage (<i>N</i> = 16)	Topic endometrium normal (<i>N</i> = 5)	No significance
	2005	P Cadherin	Tissue			No significance
Mier-Cabrera et al.	2008	Lipid hydroperoxides(LOOHs)	Blood/peritoneal fluid	I–I (<i>N</i> = 18)	Placebo group (<i>N</i> = 16)	Lower/after vit
	2008	Malondialdehyde (MDA)	Blood/peritoneal fluid			Lower/after vit
Verit et al.	2008	LOOH (Lipid hydroperoxide)	Blood	I–II (<i>N</i> = 24) III–IV (<i>N</i> = 23)	No pelvic pathologic (<i>N</i> = 40)	Higher
	2008	PON-1 (paraoxonase-1)	Blood			Lower
Yamaguchi et al.	2008	8-OHdG (8-hydroxy-2-deoxyguanosine)	Ovarian Cysts/tissue	Endometriosis–no stage (<i>N</i> = 21)	13 nonendometriotic/4 C cell (<i>N</i> = 15)	Higher
	2008	Free iron	Ovarian cysts			Higher
	2008	Lipid peroxides	Tissue			Higher

Table 2 continued

Authors	Year	Markers	Samples	Endometriosis/stage (ASRM)	Control	Significance
V. Lambrinoudaki et al.	2009	Ischemia-modified albumin (IMA)	Blood	I–II (<i>N</i> = 13) III–IV (<i>N</i> = 32)	No pelvic pathologic (<i>N</i> = 21)	No significance
	2009	Heat shock protein 70 (HSP70)	Blood			No significance
	2009	Heat shock protein 70b' (HSP70b')	Blood			Higher
Matsuzaki et al.	2009	8-OHdG (8-hydroxy-2-deoxyguanosine)	Ovarian cysts	Endometriosis–no stage	7 Dermoid cysts/serous cysts	Higher
Ngo et al.	2009	Superoxide anion	Tissue	Endometriosis–no stage	No pelvic pathologic	Higher
Sharma Indu et al.	2009	25-Hydroxycholesterol (25-OH-Chol)	Blood	(I <i>N</i> = 2) (II <i>N</i> = 4 > (III <i>N</i> = 3 > (IV <i>N</i> = 4)	Tubal ligation (<i>N</i> = 1)/unexplained infertility (<i>N</i> = 14)	Higher
	2009	8-iso-prostaglandin F2 α (8-iso-PGF2 α)	Peritoneal fluid			Higher
	2009	8-iso-prostaglandin F2 α (8-iso-PGF2 α)	Urine			Higher
	2009	25-Hydroxycholesterol (25-OH-Chol)	Peritoneal fluid			Higher
Leconte et al.	2011	Superoxide anions	Tissue	Deep endometriosis and eutopic endometrium	Tubal factor/infertility/ovarian cyst/myoma (<i>N</i> = 12)	Higher
	2011	H ₂ O ₂	Tissue			No significance
	2011	NO	Tissue			Higher
Mier-Cabrera et al.	2011	Malondialdehyde	Peritoneal fluid	I–II (<i>N</i> = 32)	Tubal ligation (<i>N</i> = 30)	Higher

undergoing laparoscopy were contacted to participate (*n* = 100); 84 were eligible and agreed to be interviewed; 78 provided blood specimens. Four markers of oxidative stress and antioxidant status were measured in serum for 61 women. They found that 32 women had visually confirmed endometriosis at laparoscopy while 52 did not, including 22 undergoing tubal ligation and 30 with idiopathic infertility. There was a weak association between thiobarbituric acid-reactive substances (nmol/ml) and endometriosis, after adjusting for age, body mass index, current smoking, hormone use in the past 12 months, gravidity, serum vitamin E, serum estradiol, and total serum lipids (β = 1.18; 95 % CI 0.04, 2.39) [23].

Van Langendonck et al. in 2002 found that there was a positive correlation between the prevention of endometriosis induction in rabbits with increasing antioxidants. They also observed and increase in ROS release by macrophages, increased peritoneal levels of oxidized low-density lipoproteins and their by-products, altered expression of endometrial pro-oxidant and antioxidant enzymes, and consumption of peritoneal fluid vitamin E. Retrograde menstruation is likely to carry highly pro-oxidant factors, such as heme and iron, into the peritoneal cavity, as well as apoptotic endometrial cells, which are well-known inducers of oxidative stress. Reactive oxygen species may be involved in endometriosis-associated infertility and may play a role in

the regulation of the expression of genes encoding immunoregulators, cytokines, and cell adhesion molecules implicated in the pathogenesis of endometriosis [9].

There is increasing evidence that oxidative stress is related to the progression of endometriosis. Two important manuscripts correlated the ROS (reactive oxygen species) with the progression of endometriosis. The first one was published by Ngo et al. in 2009. Using biopsy from patients with and without endometriosis, the authors found that high endogenous oxidative stress biomarkers and less detoxification were associated with the MAP kinase ERK1/2 activation and cellular proliferation. According Ngo et al. the same cellular activation pathway is observed in tumor cells. The authors concluded that the progression of endometriosis is more likely to be linked to a pseudotumoral disease than a menstrual regurgitation. [11].

Two years later, the same group published a manuscript using a mice model of deep infiltration endometriosis. Leconte et al. (2011) studied the effect of oxidative stress biomarkers on a proliferative pathway PI3KmTOR/AKT. The authors showed for the first time that deep infiltration endometriosis is related to an increase of OS and the higher levels of ROS induced the activation of mTOR/AKT pathway [28].

Szczepańska et al., in 2003, assessed the total antioxidant potential of women with endometriosis-associated

infertility, women with idiopathic infertility, and fertility controls. In their study, peritoneal fluid samples were analyzed for superoxide dismutase activity and total antioxidant status measured by spectrophotometry, glutathione peroxidase activity on enzyme-linked immunosorbent assay, and lipid peroxides levels on colorimetric. They found that the activity of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and total antioxidant status was lowest and lipid peroxide level was highest among infertile patients with endometriosis. Women with idiopathic infertility, in contrast, had the highest superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and total antioxidant status activity, and the lowest lipid peroxide level. Low total antioxidant status and low activity of antioxidant enzymes in the peritoneal fluid of infertile women with endometriosis probably do not influence fertility in these women, but these factors may play a role in the development of the disease [9, 10].

Conclusion

This systematic review was conducted to synthesize all articles that measured biomarkers in endometriosis patients. From all 19 manuscripts included in this review, 11 manuscripts found significantly higher levels of oxidative stress biomarkers in patients with endometriosis comparing with control patients. Lipoperoxidation markers were the first one among the number of manuscripts published in the literature (Table 2).

Oxidative stress plays an important role in the development and progression of endometriosis. This study is the first to describe the chemistry behind oxidative stress biomarkers measured in patients with endometriosis and attempts to show the importance of considering oxidative stress as a new approach in studying the pathogenesis of the disease.

Mesh terms

((“oxidative stress” [MeSH Terms] OR (“oxidative” [All Fields] AND “stress” [All Fields]) OR “oxidative stress” [All Fields]) AND (“endometriosis” [MeSH Terms] OR “endometriosis” [All Fields])) AND (English [lang] AND (“1990/01/01” [PDAT]: “2011/10/24” [PDAT])).

(“endometriosis” [MeSH Terms] OR “endometriosis” [All Fields]) AND (“free radicals” [MeSH Terms] OR (“free” [All Fields] AND “radicals” [All Fields]) OR “free radicals” [All Fields] OR (“free” [All Fields] AND “radical” [All Fields]) OR “free radical” [All Fields]).

Acknowledgments Luiz Carvalho was supported by a Brazilian government research grant from “Coordination for the improvement of higher-level personnel” (CAPES).

Conflict of interest None.

References

1. Davies KJ, Pryor WA (2005) The evolution of free radical biology and medicine: a 20-year history. *Free Radic Biol Med* 39(10):1263–1264. doi:[10.1016/j.freeradbiomed.2005.09.001](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.09.001)
2. Priestley J, Hey W (1772) Observations on different kinds of air. In: Joseph priestley LLDFRS *Philosophical Transactions* (1683–1775), vol 62, pp 147–264
3. Weissmann G (2010) Free radicals can kill you: lavoisier’s oxygen revolution. *FASEB J off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 24(3):649–652. doi:[10.1096/fj.10-0301ufm](https://doi.org/10.1096/fj.10-0301ufm)
4. Binger CA, Faulkner JM, Moore RL (1927) Oxygen poisoning in mammals. *J Exp Med* 45(5):849–864
5. Kellogg RH (1978) “La pression barometrique”: paul bert’s hypoxia theory and its critics. *Respir Physiol* 34(1):1–28
6. Davies KJ, Pryor WA (2005) The evolution of free radical biology and medicine: a 20-year history. *Free Radic Biol Med* 39(10):1263–1264. doi:[10.1016/j.freeradbiomed.2005.09.001](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.09.001)
7. Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO (1954) Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science (New York, N.Y.)* 119(3097): 623–626
8. Spitz DR, Azzam EI, Li JJ, Gius D (2004) Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: a unifying concept in stress response biology. *Cancer Metastasis Rev* 23(3–4):311–322. doi:[10.1023/B:CANC.0000031769.14728.bc](https://doi.org/10.1023/B:CANC.0000031769.14728.bc)
9. Van Langendonck A, Casanas-Roux F, Donnez J (2002) Oxidative stress and peritoneal endometriosis. *Fertil Steril* 77(5): 861–870
10. Szczepanska M, Kozlik J, Skrzypczak J, Mikolajczyk M (2003) Oxidative stress may be a piece in the endometriosis puzzle. *Fertil Steril* 79(6):1288–1293
11. Ngo C, Chereau C, Nicco C, Weill B, Chapron C, Batteux F (2009) Reactive oxygen species controls endometriosis progression. *Am J Pathol* 175(1):225–234. doi:[10.2353/ajpath.2009.080804](https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080804)
12. Kao LC, Germeyer A, Tulac S, Lobo S, Yang JP, Taylor RN, Giudice LC (2003) Expression profiling of endometrium from women with endometriosis reveals candidate genes for disease-based implantation failure and infertility. *Endocrinology* 144(7): 2870–2881
13. Erdem M, Harma M, Harma IM, Arikan I, Barut A (2011) Comparative study of oxidative stress in maternal blood with that of cord blood and maternal milk. *Arch Gynecol Obstet*. doi:[10.1007/s00404-011-1993-8](https://doi.org/10.1007/s00404-011-1993-8)
14. Ozkan Y, Yardim-Akaydin S, Erdem A, Simsek B (2011) Variability of total thiol compounds, oxidative and nitrosative stress in uncomplicated pregnant women and nonpregnant women. *Arch Gynecol Obstet*. doi:[10.1007/s00404-011-2150-0](https://doi.org/10.1007/s00404-011-2150-0)
15. Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55:373–399. doi:[10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701](https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701)
16. Liochev SI (1999) The mechanism of “fenton-like” reactions and their importance for biological systems. A biologist’s view. *Met Ions Biol Syst* 36:1–39
17. Kehler JP (2000) The haber-weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 149(1):43–50
18. Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, Epstein CJ (1995) Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet* 11(4):376–381. doi:[10.1038/ng1295-376](https://doi.org/10.1038/ng1295-376)
19. Koppenol WH (2001) The haber-weiss cycle—70 years later. *Redox Rep Commun Free Radic Res* 6(4):229–234
20. Ota H, Igarashi S, Tanaka T (2001) Xanthine oxidase in eutopic and ectopic endometrium in endometriosis and adenomyosis. *Fertil Steril* 75(4):785–790

21. Osborn BH, Haney AF, Misukonis MA, Weinberg JB (2002) Inducible nitric oxide synthase expression by peritoneal macrophages in endometriosis-associated infertility. *Fertil Steril* 77(1):46–51
22. Foyouzi N, Berkkanoglu M, Arici A, Kwintkiewicz J, Izquierdo D, Duleba AJ (2004) Effects of oxidants and antioxidants on proliferation of endometrial stromal cells. *Fertil Steril* 82(Suppl 3):1019–1022. doi:[10.1016/j.fertnstert.2004.02.133](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.02.133)
23. Jackson LW, Schisterman EF, Dey-Rao R, Browne R, Armstrong D (2005). Oxidative stress and endometriosis. *Human Reproduction* (Oxford, England) 20(7): 2014–2020. doi:[10.1093/humrep/dei001](https://doi.org/10.1093/humrep/dei001)
24. Verit FF, Erel O, Celik N (2008). Serum paraoxonase-1 activity in women with endometriosis and its relationship with the stage of the disease. *Human Reproduction* (Oxford, England) 23(1):100–104. doi:[10.1093/humrep/dem340](https://doi.org/10.1093/humrep/dem340)
25. Ho HN, Wu MY, Chen SU, Chao KH, Chen CD, Yang YS (1997) Total antioxidant status and nitric oxide do not increase in peritoneal fluids from women with endometriosis. *Human Reproduction* (Oxford, England) 12(12): 2810–2815
26. Wang Y, Sharma RK, Falcone T, Goldberg J, Agarwal A (1997) Importance of reactive oxygen species in the peritoneal fluid of women with endometriosis or idiopathic infertility. *Fertil Steril* 68(5):826–830
27. Yamaguchi K, Mandai M, Toyokuni S, Hamanishi J, Higuchi T, Takakura K, Fujii S (2008) Contents of endometriotic cysts, especially the high concentration of free iron, are a possible cause of carcinogenesis in the cysts through the iron-induced persistent oxidative stress. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 14(1):32–40. doi:[10.1158/1078-0432.CCR-07-1614](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1614)
28. Leconte M, Nicco C, Ngo C, Chereau C, Chouzenoux S, Marut W, Batteux F (2011) The mTOR/AKT inhibitor temsirolimus prevents deep infiltrating endometriosis in mice. *Am J Pathol* 179(2):880–889. doi:[10.1016/j.ajpath.2011.04.020](https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.04.020)
29. Shanti A, Santanam N, Morales AJ, Parthasarathy S, Murphy AA (1999) Autoantibodies to markers of oxidative stress are elevated in women with endometriosis. *Fertil Steril* 71(6):1115–1118
30. Kao SH, Huang HC, Hsieh RH, Chen SC, Tsai MC, Tzeng CR (2005) Oxidative damage and mitochondrial DNA mutations with endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 1042:186–194. doi:[10.1196/annals.1338.021](https://doi.org/10.1196/annals.1338.021)
31. Mier-Cabrera J, Genera-Garcia M, De la Jara-Diaz J, Perichart-Perera O, Vadillo-Ortega F, Hernandez-Guerrero C (2008) Effect of vitamins C and E supplementation on peripheral oxidative stress markers and pregnancy rate in women with endometriosis. *Int J Gynaecol Obstet Off Organ Int Federation Gynaecol Obstet* 100(3):252–256. doi:[10.1016/j.ijgo.2007.08.018](https://doi.org/10.1016/j.ijgo.2007.08.018)
32. Sharma I, Dhaliwal LK, Saha SC, Sangwan S, Dhawan V (2010) Role of 8-iso-prostaglandin F2alpha and 25-hydroxycholesterol in the pathophysiology of endometriosis. *Fertil Steril* 94(1):63–70. doi:[10.1016/j.fertnstert.2009.01.141](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.01.141)
33. Mier-Cabrera J, Jimenez-Zamudio L, Garcia-Latorre E, Cruz-Orozco O, Hernandez-Guerrero C (2011) Quantitative and qualitative peritoneal immune profiles T-cell apoptosis and oxidative stress-associated characteristics in women with minimal and mild endometriosis. *BJOG Int J Obstet Gynaecol* 118(1):6–16. doi:[10.1111/j.1471-0528.2010.02777.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2010.02777.x); [10.1111/j.1471-0528.2010.02777.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2010.02777.x)
34. Slater M, Quagliotto G, Cooper M, Murphy CR (2005) Endometriotic cells exhibit metaplastic change and oxidative DNA damage as well as decreased function, compared to normal endometrium. *J Mol Histol* 36(4):257–263. doi:[10.1007/s10735-005-3802-9](https://doi.org/10.1007/s10735-005-3802-9)
35. Matsuzaki S, Schubert B (2010) Oxidative stress status in normal ovarian cortex surrounding ovarian endometriosis. *Fertil Steril* 93(7):2431–2432. doi:[10.1016/j.fertnstert.2009.08.068](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.08.068)
36. Lambrinoudaki IV, Augoulea A, Christodoulakos GE, Economou EV, Kaparos G, Kontoravdis A, Creatsas G (2009) Measurable serum markers of oxidative stress response in women with endometriosis. *Fertil Steril* 91(1):46–50. doi:[10.1016/j.fertnstert.2007.11.021](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.11.021)

Mapping histological levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in female reproductive organs

Luiz Fernando Pina Carvalho · Mauricio Simões Abrão · Charles Biscotti · Rakesh Sharma · Ashok Agarwal · Tommaso Falcone

Received: 9 July 2012 / Accepted: 2 October 2012
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2012

Abstract Oxidative stress is associated with many disease states including gynecologic disease. This process can damage lipids, proteins and DNA. The present study highlights the role of oxidative stress induced DNA damage as measured by 8-hydroxy-2-deoxyguanosine in development of benign gynecological conditions (BGC). Our aim was to map, the oxidative DNA damage on female reproductive organs and highlight the higher amount found in a variety of benign gynecologic disorders. Seventeen biopsy specimens from female pelvic organs were divided in two groups: healthy organs tissue and BGC tissue. Healthy organs biopsy tissue included the cervix, tubes, uterus, peritoneum, and topic endometrium in secretory phase. Benign gynecological biopsy tissue included hydrosalpinges, leiomyoma, adenomyosis and tubal cysts. Immunohistochemical staining showed significantly higher levels of DNA damage between BGC and healthy organs [19.36 % (6.20; 32.51)

vs. 4.61 % (0.63; 8.53); $P < 0.0344$]. Our results highlight the involvement of oxidative stress DNA damage in female benign pelvic disease. Hydrosalpinges, leiomyoma, and adenomyosis exhibit the highest amounts of oxidative DNA damage in the pelvic cavity.

Keywords Oxidative stress · DNA damage · Histological mapping · Pelvic organs · Adenomyosis

Introduction

An imbalance between pro-oxidant and antioxidant system generates oxidative stress, which constantly damages lipids, proteins, and DNA. The most reactive oxygen species is the hydroxyl radical ($\text{OH}^\bullet$). The $\text{OH}^\bullet$ attacks nucleobases of DNA strand, such as guanine by electron abstraction, resulting in 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) (Ma et al. 2008; Valavanidis et al. 2009). In recent years, the role of 8-OHdG has been examined as potential biomarker involved in cancer risk, degenerative disease, autoimmune disease, ischemic tissue damage, and aging process (Pandey and Rizvi 2010; Sova et al. 2010; Miranda et al. 2011).

Sampson's theory published in 1927 showed that retrograde menstruation brings large amount of bloods and iron to pelvic peritoneal cavity. This large amount of Iron mediates the production of oxidative stress biomarkers and free radicals according to Fenton's reaction, and could be the main mechanism to explain the distribution of oxidative DNA damage in female pelvic organs, in addition to the severe pelvic pain (Roth et al. 2011); however it is unclear why most of the women who have retrograde menstruation, do not develop any benign gynecological disease, specially endometriosis (Defrere et al. 2008; Kobayashi et al. 2009; Sampson 1927; Yamaguchi et al. 2008).

L. F. P. Carvalho (✉) · R. Sharma · A. Agarwal · T. Falcone
Center for Reproductive Medicine, Obstetrics and Gynecology
and Women's Health Institute, Glickman Urology and Kidney
Institute, 9500 Euclid Avenue, Desk A19.1,
Cleveland, OH 44195, USA
e-mail: luizcarvalho.dr@me.com

R. Sharma
e-mail: Sharmar@ccf.org

L. F. P. Carvalho · M. S. Abrão
Department of Obstetrics and Gynecology,
São Paulo University, São Paulo, Brazil

C. Biscotti
Pathology and Lab Medicine, Anatomic Pathology,
Cleveland Clinic, Cleveland, OH 44195, USA

R. Sharma · A. Agarwal
Glickman Urology and Kidney Institute, Cleveland Clinic,
Cleveland, OH 44195, USA

There is some evidence showing oxidative stress DNA mutations and their relation with ovarian cancer, however there are no studies in the literature mapping the indices of oxidative DNA damage in healthy pelvic organs and benign gynecological conditions (BGC), despite the high incidence of endometriosis and fibroids. (Gallegos-Arreola et al. 2012) Our primary aim was to map the DNA damage caused by oxidative stress in healthy organs and benign diseases of female pelvic. Biopsy tissue obtained from normal tubes, normal uterus, normal cervix, normal peritoneum, and normal eutopic endometrium during secretory phase was compared with some benign gynecologic conditions to include pelvic pathologies such as hydrosalpinges, adenomyosis, leiomyoma and tubal cysts.

Materials and methods

Seventeen biopsy tissues from female pelvic organs were divided in two groups: healthy organs biopsies (HOB) and BGC. The BGC group included: one benign ovary cyst biopsy, one adenomyosis biopsy, two fibroids biopsies, one tube with hydrosalpinges, and one benign tubal cyst biopsy. The HOB group includes three normal myometrium biopsy, three normal tubes biopsy, three normal cervix biopsy (endocervix tissue; ectocervix tissue and transformation zone), one normal peritoneum biopsy, and one normal eutopic endometrium biopsy from secretory phase. The indications for laparoscopic surgery included the following: tubal ligation; robotic tubal reanastomose; hysterectomy for bleeding disorder; fibroids, hydrosalpinges and pelvic pain.

Table 1 Demographic characteristics

	HO	BCG
Age (years)	43 (7.77)	43.2 (6.90)
BMI (kg/m ²)	32.6 (9.08)	28.5 (4.24)
Marital status (%)		
Married	55	100
Single	27	0
Divorced	180	0
Abdominal surgery (%)		
0	64	60
1	27	40
2	9	0
Ethnicity group (%)		
Caucasian	36	60
Asian/Pacific	20	20
African-American	9	0
Not Hispanic	36	20
Hispanic	0	0

Fig. 1 Formalin/PFA-fixed paraffin-embedded sections stained for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine antibody [N45.1]. Level of 8 OHdG appears as brown nuclear staining. **a** Fibroids (15.69 %) versus **b** normal myometrium (4.38 %), **c** adenomyosis (35.88 %) versus **d** secretory endometrium (13.49 %), **e** hydrosalpinge (8.45 %) versus **f** normal tubes (0.09 %), **g** tubal cyst (8.18 %) versus **h** normal tubes (0.0 %). All are at $\times 10$ magnification

Demographic characteristics can be seen at Table 1. All tissues were obtained by biopsy during laparoscopic surgery. Women with history of smoking, signs of past or present pelvic inflammatory disease, and autoimmune disease were excluded. This study was approved by the Cleveland Clinic Institutional Review Board.

Immunohistochemistry (IHC) staining was performed on paraffin sections ($5\ \mu$) with mouse monoclonal antibodies specific against 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) clone N45.1 (Abcam Laboratories, Cambridge, MA, USA). IHC was conducted as previously described (Matsuzaki and Schubert 2010) using indirect methods and the blocking step. Briefly, deparaffinized and rehydrated tissue sections were incubated for 120 min at 37 °C with the primary antibody (8 OHdG, N45.1 Clone) at 1:50 dilution. Slides were incubated in secondary antibody (horse anti-MS; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) at 1:200 dilutions for 30 min at 37 °C. Finally, substrate (diaminobenzidine, DAB) for peroxidase was added. For positive control, adenocarcinoma slides were used and slides without primary antibody were used as negative control respectively. All pictures fields were taken on the microscope, Leica DMR (Heidelberg, Germany) upright equipped with a 10 $\times$ objective, RGB color filter, and a QImaging CCD digital camera (Q-Imaging, Burnaby, BC, Canada). All slides pictures were taken under 10 $\times$ magnification. Slides were scored in a blind fashion by the pathologist (C. B.); in addition, percentage of immunostaining in each slide was done by a blind fashion using computerized image analysis system.

Images were processed and analyzed for positive immunostained areas using automated and customized algorithms/scripts written for Image Pro Plus 6.2 (Media Cybernetics-Bethesda, MD, USA) "Brown" pixels representing 8-OHdG staining were segmented by extracting the phase channel from the YIQ color space, applying a spectral filter to equalize staining intensity, and setting the threshold with a fixed grayscale value. The resultant binary mask was then "added" to a mask created from a color-cube based segmentation of brown color indices based on a profile generated from more than 100 images. Summing the pixels in the final segmented mask provided the total area of immunostaining in the image. Since total tissue area varied from image to image, tissue areas were delineated in a semi-automated fashion and reported along with immunostained areas for normalization. Finally, for validation purposes, segmented immunostained regions were pseudo

Fig. 2 Adenomyosis ($\times 20$) level of 8 OHdG in the glands and stroma. Formalin/PFA-fixed paraffin-embedded sections stained for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine antibody [N45.1]. Arrow **a** shows glands, while arrow **b** shows stroma with high levels of DNA damage

Health) software was used for data analysis. Student's *t* test was used to compare quantitative data presented, and the corresponding 95 % confidence intervals (CI) were calculated comparing the two groups. $P < 0.05$ was considered to be significant.

Results

In this study we detected 8-OHdG, the marker of DNA Damage, in fourteen of seventeen tissue patients. Three tissues included in the HO groups were negative for 8-OHdG (endocervix, transformation zone and one normal tube biopsy). Immunoassay scores ranged from 0 to 34.45 (pixel/immunostain). Significant differences in DNA damage measures were seen between healthy tissue [4.61 % (0.63; 8.53) immunostain/slide] and BGC [19.36 % (6.20; 32.51) immunostain/slide] ($P < 0.03$). The distribution of the staining for each organ is showed in the Fig. 1.

Adenomyosis and fibroids were the two conditions with higher positive immunoassayed areas comparing with healthy tissue. The percentage of DNA damage in adenomyosis tissue was 35-fold higher (35.88 % immunostain/slide) compared

Fig. 3 Mapping female cervix using 8 OHdG primary antibodies. **a** H-E staining of squamocolumnar junction ($\times 10$). **b** 8OHdG staining of squamocolumnar junction. **c** Immunohistochemistry of glandular endocervix tissue. **d** Immunohistochemistry ectocervix at $\times 10$ magnification

Fig. 4 Mapping 8-OHdG levels in female pelvic organs

with normal cervix (0 % immunostain/slide), normal tubes (0.09 % immunostain/slide), and normal uterus (0.062 % immunostain/slide). The percentage of DNA damage in fibroid tissue was 15 times higher (15.69 % immunostain/slide) compared with normal cervix (0 % immunostain/slide), normal tubes (0.09 % immunostain/slide), and normal uterus (0.062 % immunostain/slide) (Figs. 1, 2, 3)

Discussion

The present study demonstrates an important finding that oxidative stress induced DNA damage as measured by 8-OHdG may be involved in the development of BGCs. The percentage of DNA damage in all disease groups was higher compared with normal tissue. Oxidative stress is involved in the pathogenesis of many diseases. (Valavanidis et al. 2009; Sova et al. 2010) Our data confirms this finding that oxidative stress may also be involved in pathogenesis on benign gynecology conditions (Fig. 4).

According to Matsuzaki et al. (2009), oxidative DNA damage is higher than healthy tissue surrounding endometriotic lesion. This finding raises an important issue that DNA structure in normal myometrium tissue around fibroids and adenomyosis may be also compromised. The clinical manifestations of this DNA damage may relate to abnormal organ function. For example in patients with adenomyosis the reproductive outcomes such as implantation rate might be compromised (Matsuzaki and Schubert 2010; Carvalho et al. 2011).

According to Sampson's theory, retrograde menstruation brings large amount of blood into the pelvic cavity. The higher concentrations of iron are transformed into free radicals by Fenton reaction; however, it seems that the DNA

from healthy pelvic organs tissue is not being affected (Kobayashi et al. 2009; Sampson 1927).

One of our study limitations is the small number of patients in each pelvic organs tissue; however, our objective was to highlight the fact that oxidative damage could be one of the explanations for development of pelvic disease. There is a possibility is that oxidative stress is the result rather than the cause of the particular gynecologic disease. Our results encourage future research to look at the potential pathways in BGCs.

Conclusion

The present short communication demonstrates a possible involvement of oxidative stress DNA damage in the physiopathology of female benign pelvic disease. Larger clinical trials are required to confirm this observation. Hydrosalpinges and adenomyosis exhibit the highest amounts of oxidative DNA Damage in the pelvic cavity.

Conflict of interest None of the authors have conflict of interest.

References

- Carvalho L, Podgaec S, Bellodi-Privato M, Falcone T, Abrao MS (2011) Role of eutopic endometrium in pelvic endometriosis. *J Minim Invasive Gynecol* 18(4):419–427
- Defrere S, Lousse JC, Gonzalez-Ramos R, Colette S, Donnez J, Van Langendonck A (2008) Potential involvement of iron in the pathogenesis of peritoneal endometriosis. *Mol Hum Reprod* 14(7):377–385
- Gallegos-Arreola MP, Valencia-Rodriguez LE, Puebla-Perez AM, Figuera LE, Zuniga-Gonzalez GM (2012) The TP53 16-bp duplication polymorphism is enriched in endometriosis patients. *Gynecol Obstet Invest* 73(2):118–123

- 218 Kobayashi H, Yamada Y, Kanayama S, Furukawa N, Noguchi T, 238
 219 Haruta S, Yoshida S, Sakata M, Sado T, Oi H (2009) The role of 239
 220 iron in the pathogenesis of endometriosis. *Gynecol Endocrinol* 240
 221 *Off J Int Soc Gynecol Endocrinol* 25(1):39–52
 222 Ma H, Wang J, Abdel-Rahman SZ, Boor PJ, Khan MF (2008) Oxidative 241
 223 DNA damage and its repair in rat spleen following subchronic 242
 224 exposure to aniline. *Toxicol Appl Pharmacol* 233(2):247–253 243
 225 Matsuzaki S, Schubert B (2010) Oxidative stress status in normal 244
 226 ovarian cortex surrounding ovarian endometriosis. *Fertil Steril* 245
 227 93(7):2431–2432 246
 228 Miranda SR, Noguti J, Carvalho JG, Oshima CT, Ribeiro DA (2011) 247
 229 Oxidative DNA damage is a preliminary step during rat tongue 248
 230 carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. *J Mol Histol* 249
 231 42(2):181–186 250
 232 Pandey KB, Rizvi SI (2010) Markers of oxidative stress in erythrocytes 251
 233 and plasma during aging in humans. *Oxid Med Cell Longev* 252
 234 3(1):2–12 253
 235 Roth RS, Punch M, Bachman JE (2011) Psychological factors in 254
 236 chronic pelvic pain due to endometriosis: a comparative study.
 237 *Gynecol Obstet Invest* 72(1):15–19
- Sampson JA (1927) Metastatic or embolic endometriosis, due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the venous circulation. *Am J Pathol* 3(2):93–110.43
- Sova H, Jukkola-Vuorinen A, Puistola U, Kauppila S, Karihtala P (2010) 8-hydroxydeoxyguanosine: a new potential independent prognostic factor in breast cancer. *Br J Cancer* 102(6):1018–1023
- Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C (2009) 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): a critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Health Part C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 27(2):120–139
- Yamaguchi K, Mandai M, Toyokuni S, Hamanishi J, Higuchi T, Takakura K, Fujii S (2008) Contents of endometriotic cysts, especially the high concentration of free iron, are a possible cause of carcinogenesis in the cysts through the iron-induced persistent oxidative stress. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 14(1):32–40

Title: Oxidative Cell Injury as a Predictor of Endometriosis Progression

Running title: Oxidative Cell Injury in Endometriosis Progression

Luiz Fernando Pina Carvalho, M.D.^{1,2} - luizcarvalho.dr@me.com

Mauricio Simões Abrão, M.D.² - msabrao@me.com

Charles Biscotti, MD.³ - biscotc@ccf.org

Rakesh Sharma, PhD.,^{1,4} - sharmar@ccf.org

Benjamin Nutter.⁵ - nutterB@ccf.org

Tommaso Falcone, M.D.¹ - falcont@ccf.org

¹Center for Reproductive Medicine, Obstetrics and Gynecology and Women's Health Institute, Cleveland Clinic, Cleveland Ohio ²Department of Obstetrics and Gynecology, São Paulo University, São Paulo, Brazil, ³Pathology & Lab Medicine, Anatomic Pathology, ⁴Glickman Urology and Kidney Institute, Cleveland Clinic, Cleveland Ohio, 44195,USA, ⁵Institute of Quantitative Health Sciences, Cleveland Clinic, Cleveland Ohio.

Disclosure: None of the authors have conflict of interest

Corresponding Author:

Rakesh Sharma, PhD.,

Center for Reproductive Medicine, Obstetrics and Gynecology and Women's Health Institute, Cleveland Clinic, Cleveland, Ohio 44195, USA.

9500 Euclid Avenue, Cleveland, Ohio

Tel: 216-444-4350

Email: sharmar@ccf.org

Abstract

Background: There is increasing evidence that oxidative stress is one of the key factors for endometriosis progression. In this prospective controlled trial, we measured six different biomarkers of oxidative stress targeting protein, lipid and DNA to quantify the severity and progression of endometriosis and establish a diagnostic marker for the disease. **Methods:** 62 consecutive patients were identified to be enrolled in this study. After exclusion criteria, 44 patients were allocated to three groups: Stage I/II (n=14), Stage III/IV (n=16), and a control group (n=14). Levels of 8 hydroxy-deoxyguanosine (8-OHdG), 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1), protein carbonyl (PC), lipid peroxidation (LPO), reactive oxygen species (ROS) and total antioxidant capacity (TAC) were accessed in peritoneal fluid and tissue. **Results:** Significantly higher levels of 8-OHdG and PC were seen in patients with endometriosis, in addition OGG1 expression was found to be significantly lower in patients with endometriosis ($p<0.001$, $p=0.001$, $p=0.033$ respectively); ROS, TAC and LPO were similar in stages I/II, stages III/IV and control group. A predictive model was built using multivariable analyses and receiver operating characteristics curves. The ability to predict and distinguish between patients without endometriosis, Stage I/II endometriosis, and Stage III/IV was very high. This model was highly discriminatory and had a concordance index of 0.87. **Conclusion:** In this cohort, higher DNA damage and lower DNA repair activity was related with endometriosis progression. Our results indicate that oxidative stress as a biomarker of cell injury can be used as a reliable quantitative test of endometriosis severity

Keywords: Endometriosis; Oxidative Stress; DNA damage: 8-hydroxy-2-deoxyguanosine; Cell toxicity; Endometriosis progression

Introduction

Endometriosis is defined as the presence of endometrial tissue outside the uterine cavity, it remains one of the most important causes of pelvic pain and infertility in reproductive age.¹ It is considered as a benign gynecological condition, however, in some cases, it can significantly decrease quality of life being both invasive and aggressive.^{2,3} It is estimated that endometriosis affects over 70 million women around the world; more than 35% of these women may have an advanced stage of endometriosis.^{4,5}

According to American Society for Reproductive Medicine guidelines, endometriosis has four stages: minimal (I), mild (II), moderate (III), and severe (IV).⁶ Unfortunately, it remains poorly understood as to how and why endometriosis progresses and becomes a very aggressive and destructive disease. Although endometriosis shares many features with malignancies, it is estimated that less than 1% of all endometriosis are associated with cancer.⁷

The most recent literature suggests that oxidative stress may be a potential factor involved in the pathogenesis, establishment and progression of the endometriosis.⁸ Oxidative stress occurs when the production of reactive oxygen species (ROS) (pro-oxidants) overwhelms the body's natural ability to neutralize them with the available antioxidant system. As a result, constant damage to lipids, proteins of the cellular membrane, and DNA occurs.^{9-10,11} Oxidative stress has been involved in several human diseases, such as cardiovascular (atherosclerosis, heart failure), cancer and neurodegenerative diseases etc.¹²⁻¹⁴

Reactive oxygen species (ROS) represent a broad category of molecules that indicate the collection of radicals and non-radical oxygen derivatives. While free radicals such as superoxide anion ($O_2^{\bullet -}$), hypochlorite ion, hydroxyl radical ($OH^{\bullet}$) are some of the more commonly known free oxygen radicals, free nitrogen radicals such as nitric oxide ($NO^{\bullet}$), nitric dioxide ($NO_2^{\bullet}$), peroxynitrite ($ONOO^-$) also comprise free oxygen radicals. Hydrogen peroxide

1 although not a free radical *per se*, it is a very powerful oxidizing agent. Therefore
2 it is included as a free radical. Evidence suggests that OS induced by ROS such
3 as superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), hydroxyl radicals ($OH^{\cdot}$) and a range of lipid peroxy
4 radicals produced in vascular cells is involved in the pathogenesis of a wide
5 range of diseases of the reproductive system such as varicocele, endometriosis
6 and infection.^{11,15-18}

7 Oxygen metabolism produces many free radicals, such as superoxide
8 anion ($O_2^{\cdot-}$), hydroxyl radicals ($\cdot OH$), hydroperoxyl ($HO_2^{\cdot-}$). When the hydroxyls
9 radical reach the DNA they cause a base oxidation product 8-hydroxy-2-
10 deoxyguanosine (8-OHdG) modifying the structural properties of DNA bases and
11 thus damage the DNA.¹⁹⁻²¹ This marker has been used to estimate the
12 progression of many diseases and in the promotion of carcinogens.^{22,23}

13 There are three types of defense against formation of ROS: 1)
14 enzymatic inactivation. In order to access the first line of oxidative stress defense
15 we evaluated the concentration of total antioxidant capacity or TAC. It is the
16 measurement of both enzymatic (e.g., superoxide dismutase, catalase etc.) and
17 nonenzymatic ascorbate, urate, vitamin E) antioxidants²⁴ 2) incorporation of
18 damaged bases into DNA, by enzymes that hydrolyze oxidized nucleotides; and
19 3) repair of oxidative damage in DNA.^{19,25,26} 8-oxoguanine glycosylase 1
20 (OGG1) can be used to estimate the DNA repair; when there is lower activity
21 there is less defense against ROS.¹⁹

22 Reactive oxygen species accumulation leads to cellular injury, such as
23 damage to DNA, protein and lipid peroxidation (LPO). Lipid peroxidation (LPO) is
24 a marker of lipid degradation. The cell membrane is comprised of lipid bilayer
25 with embedded proteins. The measurement of the degradation of lipids (LPO)
26 such as malondialdehyde (MDA) levels has been used as a marker of cell
27 membrane injury.²⁷

28 We performed a systematic review that found a total of 20 different
29 biomarkers that were measured and reported in patients with endometriosis. We
30 selected a pool of six biomarkers of oxidative stress, each a measure of oxidative
31 cell targets and protector of the antioxidant system; in addition, Protein Carbonyl

(PC) and OGG1 were chosen as novel markers as they have not been reported in patients with endometriosis in the literature.¹⁵

Four markers of oxidative stress damage (ROS, PC, LPO, 8-OhdG) and two markers of antioxidant system (TAC, OGG1) were selected. Using these biomarkers, the study was conducted to examine the association between oxidative stress and progression of endometriosis. This study also aimed to determine which of these markers could be used as a diagnostic and quantitative test of severity of endometriosis.

Materials and Methods

The Cleveland Clinic Institutional Review Board approved this study. Between July 2010 and August 2011 a total of 62 consecutive patients were identified to be enrolled in this study. The study group included women of reproductive age who underwent laparoscopy intervention for pelvic pain. These patients were identified prospectively from the electronic medical record before surgery. Patients were excluded if they were smokers or were on hormonal therapy of any type. The control group consisted of fertile patients without endometriosis who underwent laparoscopy for other reasons (tubal ligations; laparoscopy sterilization reversal; benign ovarian cyst) and had no visible endometriosis at laparoscopy. At the time of the laparoscopy, peritoneal fluid and endometriosis tissue were collected.

Peritoneal fluid (PF) was aspirated during laparoscopy under direct vision to avoid blood contamination. Peritoneal fluid was excluded from the analysis if 1) it was contaminated with blood, 2) samples were collected from women who were on hormonal therapy for at least three months before the surgery, 3) women displayed any sign of pelvic infection at a laparoscopic or other inflammatory disease and 4) if they were smokers.

From 62 eligible patients, 18 were excluded by the following reasons: (i) 4 patients had visually diagnosed with endometriosis; however, it was not confirmed histologically; (ii) 10 patients were current smokers or were currently using hormonal therapy; and (iii) 4 had blood contamination. Finally, 44 patients were selected to be part of this study. After the exclusion criteria, the patient population was divided into three groups: stage I/II, stage III/IV, and control group. Endometriosis patients were classified according to the severity of the disease during the laparoscopy procedure, irrespective of the phase of the cycle using the revised four stages of American Society of Reproductive Medicine scoring system (ASRM 1997). Endometriosis was confirmed in all cases by a pathologist experienced in endometriosis (B.C).⁶ We compared the BMI and age in the control and study group.

Peritoneal fluid (PF) concentrations of ROS was determined using the chemiluminescence assay; concentrations of LPO, PC and TAC were determined by colorimetric assay. We measured 8 OHdG and OGG1 in tissue biopsies using immunohistochemistry technique. Peritoneal fluid was immediately transported to the laboratory, centrifuged at 2000x g for 10 minutes, and then divided into aliquots. Fresh peritoneal fluid was used to measure ROS; the remaining fluid was frozen at -80°C for measurement of LPO, concentrations of PC, and total antioxidant capacity (TAC). All biopsies were reviewed by two different authors (B.C; C.L) and if glands and stroma were found, the tissue was selected for evaluation by immunohistochemistry. The endometriosis tissue biopsy included: Uterosacral ligament, pelvic sidewall, bladder, endometrioma, vagina and rectosigmoid lesions. Normally glands and stroma are absent in the female pelvic organs. Therefore understanding the levels of oxidative stress biomarkers in the pelvic in a normal environment allows us to compare the ectopic endometrial oxidative markers in endometriosis tissue with a healthy tissue. Control group included biopsies from normal tubes, normal uterus (myometrium) and normal peritoneum from patients confirmed without endometriosis at laparoscopy. Tissue was stained using 8 hydroxy-deoxyguanosine (8 OHdG) and 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1).

Measurement of Reactive Oxygen Species

Fresh peritoneal fluid was used to measure ROS in patients with endometriosis and control patients. ROS measured by chemiluminescence assay using luminol as a probe (5mmol/l; 5-amino-2, 3 dehydro-1,4 phthalazinedione; Sigma chemical CO. St Louis, MO, USA) prepared in dimethyl sulphoxide; Sigma chemicals). All peritoneal fluid samples were measured in duplicate. The assay consisted of 400 µl of fresh clear peritoneal fluid (centrifuged) and 10 µl of luminol. Blank (400 µl of PBS only), negative (400 µl of PBS+10 µl of luminol) and positive controls (400 µl of PBS+10 µl of luminol and 50 µl of hydrogen

peroxide) were also included. Results were expressed as relative light units (RLU).²⁸

Measurement of Lipid peroxidation

Samples were thawed at a room temperature. Concentration of LPO in peritoneal fluid was assessed using thiobarbituric acid method and measuring the color absorbance by plate reader (Gen5, EPOCH, Winooski, VT).²⁸

In order to measure LPO, plate reader was set up for 534nm. Briefly, ferrous sulfate and sodium ascorbate were used (Sigma). Peritoneal fluid was incubated 125 μ L each ferrous sulfate (2.5 mM) and sodium ascorbate (12.5 mmol/L) for a 1 h in a 37°C water bath. Control samples did not contain ferrous sulfate and sodium ascorbate during the incubation period. To precipitate the proteins, 250 μ L 40% ice-cold trichloroacetic acid was added and centrifuged at 300g for 10 minutes. After carefully aspirating the clear supernatant, 250 μ L of 2% thiobarbituric acid (0.2 mol of NaOH) was added. For development of the color, tubes were boiled at the same time for exactly 15 min, and immediately placed on ice to stop the reaction. Malonaldehyde (MDA) standard concentrations were plotted and lipid peroxidation concentration was expressed as μ molMDA/L of peritoneal fluid.

Measurement of Protein Carbonyl

Protein Carbonyl (PC) was measured in peritoneal fluid using a commercially available protein carbonyl assay kit (Cat # 10005020; Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan). 2,4- dinitrophenylhydrazine (DNPH) reacts with protein carbonyls, forming a Schiff base to produce the corresponding hydrazone, which can be analyzed spectrophotometrically. A plate reader (Gen5, EPOCH, Winooski, VT) was set up to measure absorbance at 370 nm. All reagents were brought at room temperature before beginning the assay. 200 μ L of PF was aliquoted in duplicate sample (S) and the other as control (C). 800 μ L

DNPH was added to the (S) tube and 800 μ L of HCL to the (C) tube. After the addition of 1ml of 20% of trichloroacetic acid (TCA), the tubes were vortexed and placed on ice for five minutes, and centrifuged at 5000 rpm for 10 minutes. The same steps were repeated with 1ml of 10% of TCA. The supernatant was discarded and 1 ml ethanol: ethyl acetate (1:1) was added to the pellet. Ethanol: ethyl acetate (1:1) step were repeated three times. After the final wash, the pellet was resuspended in 500 μ L of guanidine hydrochloride by vortexing. 220 μ L aliquots were added to the 96 well plate and absorbance was measured at 370nm. Protein carbonyl levels were calculated as:

$$PC = [(CA)/(*0.011 \mu M^{-1})](500 \mu l/200 \mu l).$$

Protein carbonyl results were expressed as an nmol/ml.

Measurement of total antioxidant capacity

A commercial available kit was used to assess the total antioxidant capacity (Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan). Briefly, at room temperature, 20 μ L microliters of peritoneal fluid were added to 1 mL of reconstituted chromogen, ABTS-metmyoglobin (10 mL of vial with 10 mL of PBS buffer, provided in the kit). Trolox (6-hydroxy-2, 5,7,8 -tetramethylchroman-2 carboxylic acid) 20 μ L were used as standard and 20 μ L of dH₂O was used as a blank. 1 mL of chromogen was added to standard, blank and the sample. With spectrophotometer adjusted at 570 nm, initial absorbance (A_1) was measured. 200 μ L of H₂O₂ (provided in the kit) was added and absorbance (A_2) was measured exactly after five minutes. The difference between A_2 and A_1 (ΔA) was calculated. The final results were calculated using the equation:

$$TAC \text{ levels} = \frac{\text{Concentration of the standard} (\Delta A \text{ Blank} - \Delta A \text{ sample})}{\Delta A \text{ Blank} - \Delta A \text{ standard}}$$

1 The result was expressed as micromolar Trolox equivalent (μM).

3 **Measurement of 8 OHdG and OGG1**

5 Immunohistochemistry (IHC) was done to assess the levels of DNA
6 damage marker, 8 OHdG and DNA repair marker using anti-8-oxoguanine DNA-
7 glycosylase antibody, using primary mouse monoclonal antibodies specific
8 against 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine clone N45.1 (Abcam Laboratories,
9 Cambridge, MA). OGG1 immunostaining was assessed using primary antibody
10 rabbit anti-OGG1 (HPA 027514, Sigma, St Louis, MO).

11 Briefly, for the 8-OHdG staining, deparaffinized and rehydrated tissue
12 sections were incubated for 120 minutes at 37°C with the primary antibody (8-
13 OHdG N45.1 Clone) at 1:50 dilution. Slides were incubated in secondary antibody
14 (horse anti-MS; Vector Laboratories, Burlingame, CA) at 1:200 dilutions for 30
15 min at 37°C. Finally, sections were stained with diaminobenzidine (DAB). For
16 positive control, adenocarcinoma slides were used and slides without primary
17 antibody were used as negative control.

18 For the OGG1 staining, deparaffinized and rehydrated, the slides were
19 incubated in 3.0% hydrogen peroxide in water for 30 min, rinsed thoroughly in
20 running tap water for 30 minutes. After washing in PBS (Sigma, St Louis MO),
21 sections were incubated with the primary antibody rabbit anti-OGG1 (HPA
22 027514, Sigma, St Louis, MO), 1:25 diluted in 3.0% normal goat serum/PBS
23 (Vector Laboratories, Burlingame, CA). After X4 PBS washing, the slides were
24 incubated with secondary biotinylated anti-rabbit IgG, (Vector Laboratories,
25 Burlingame, CA) diluted 1:200 in PBS and 1.5% normal goat serum. Slides were
26 rinsed with PBS (0.2%), and applied ABC reagent. (Vectastain Elite Peroxidase,
27 #PK-6100, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Finally the slides were
28 incubated with DAB for 10 minutes at room temperature, and the appropriate
29 color development was finally performed.

30 All images were taken on upright Leica DMR microscope (Heidelberg,
31 Germany) equipped with a 10X objective, RGB color filter, and a Q-Imaging CCD

digital camera (Q-Imaging, Burnaby, BC, Canada). All slides pictures were taken at 10x magnification. Slides were identified in a blind fashion by the pathologist (C.B.); in addition, the percentage of immunostaining in each slide was done in a blind fashion using computerized image analysis system.

Images were processed and analyzed for positive immunostained areas using automated and customized algorithms/ scripts written for Image Pro Plus 6.2 (Media Cybernetics-Bethesda, MD). "Brown" pixels representing 8-OHdG and OGG1 staining were segmented by extracting the phase channel from the YIQ color space, applying a spectral filter to equalize staining intensity, and setting the threshold with a fixed gray scale value.

The resultant binary mask was "added" to a mask created from a color-cube based segmentation of brown color indices resulted from a profile generated from more than 100 images. When adding the pixels in the final segmented mask it was possible to find the total area of immunostaining in the image. Since total tissue area varied from image to image, tissue areas were delineated in a semi-automated fashion and reported along with immunostained areas for normalization. Finally, for validation purposes, segmented immunostained regions were pseudo colored and superimposed upon the original for each image analyzed.

Statistical Analysis

All analysis was performed using R 2.12.2 statistical software. Significance was determined at $p\text{-value} \leq 0.05$. Significant differences in pairwise comparisons were identified by applying a Bonferroni correction with $p\text{-values} \leq 0.0125$ indicating statistical significance. According to the power analysis, it was expected that a statistically significant difference could be observed using 90% of power if the per-group sample size was at least 14.

Comparisons across the three groups (stages I/II, stages III/IV, and Control) were performed using Kruskal-Wallis analysis of ranks. Pairwise comparisons for variables showing an overall difference were made by

1 Wilcoxon's signed rank test. All data were expressed as means $\pm$ SD of all
2 patients' samples. Variables are summarized using median and quartiles for lab
3 values.

4 Spearman's rank analysis was used to determine correlation between
5 oxidative stress biomarkers increasing risk for endometriosis. Univariable odds
6 ratios were calculated for each oxidative stress biomarker using a proportional
7 odds logistic regression in the R package version 3.3-0. Receiver Operating
8 Characteristic (ROC) curves for each variable were created using the R package
9 ROCR; each figure provides the ROC curve for detecting any endometriosis and
10 detecting advanced stage of endometriosis. Logistic regression was used to
11 calculate the odds ratio (OR) for presence of (any stage) endometriosis as well
12 as advanced stage III/IV of endometriosis.

13 A multivariable predictive model was used to identify the changes to
14 use the biomarkers to predict stages III/IV of endometriosis. In order to provide
15 more flexibility in modeling, the missing data were multiply imputed using the
16 mice 3 package. Variables were entered into the model sequentially based on
17 the concordance indices from the univariable models, with higher concordances
18 being entered first. The ability of this model to distinguish between no
19 endometriosis, stages I/II endometriosis, and stages III/IV endometriosis is
20 illustrated in figures that plot the predicted probability of stage III/IV
21 endometriosis against the predicted probability of advanced endometriosis.

Results

Between July 2010 and March 2011, 62 consecutive patients were eligible for this study. After the exclusion criteria, 44 patients were enrolled to be part of the study population. Of the 44 patients, 30 had histological confirmation of endometriosis. At the time of laparoscopy, 14 patients had no endometriosis and were used as a control group. The mean BMI in the groups were 27 ± 7.00 (stage I/II); 29.8 ± 12.76 (stage III/IV); 31 ± 7.48 (control). The mean ages for the stage I/II, Stage III/IV and control group were 33.1 ± 5.74 ; 33.0 ± 6.04 ; and 41.7 ± 6.62 respectively.

In the peritoneal fluid, levels of PC, ROS, TAC, and LPO were measured. Protein Carbonyl levels were found to be significantly higher in patients with endometriosis ($p=0.033$), however, levels of ROS, TAC and LPO were comparable between stages I/II, stages III/IV, and control group [ROS levels in control 17475 RLU (9638, 22514) versus stage I/II 4719 (0, 11780), and stage III/IV 2401.5 (0, 13914) with $p=0.24$; TAC levels in control were 1110 μM Trolox equivalent (910, 1250) versus stage I/II: 1030 μM Trolox equivalent (940, 1250) and stage III/IV 1200 μM Trolox equivalent (1060, 1250) with $p=0.84$; LPO values in control 1.53 μmol MDA/L (1.25, 1.64), stage I/II 1.02 μmol MDA/L (1, 1.03), and stage III/IV 3.02 (1.87, 3.04) with $p=0.09$ (**Table 1**).

On tissue biopsy, a marker of DNA damage (8 OHdG) and a DNA repair glycosylase (OGG1) were evaluated. Higher DNA damage was significantly related with advancing stage of endometriosis (8 OHdG $p<0.001$; control 2.38 (0.38, 3.29) versus stages I/II 13.2 (9.43, 14.21) and stages III/IV 17.68 (15.47, 29.44), on the other hand a significantly lower expression in OGG1 expression was found in stage III/IV when compared with stage I/II, thus lower expression in stage I/II comparing with control. (OGG1; control 15.68 (14.5, 21.23) versus stages I/II 9.16 (4.76, 13.08); versus stages III/IV 4.25 (3.02, 7.88; $p=0.001$) (**Table 1**). Spearman's correlation between 8 OHdG and OGG1 ($r = 0.47$ (-0.76, -0.17); $p<0.003$) and a scatterplot is shown in **Figure 1**; **Figure 2**.

All endometriosis diagnostic slides/tissue included had presence of glands and stroma. 8-OHdG and OGG1 were analyzed in multiple areas of the tissue. The exact area was photographed in order to quantify the DNA damage and DNA repair markers (**Figure 3**). As the disease progressed, the staining of DNA damage constantly progressed as well, and both glands and stroma had higher expression of DNA damage. Interestingly, in advanced stages of endometriosis, the glands had higher expression of OGG1, and the stroma around the endometrial glands had almost negligible DNA repair expression. (**Figure 4**).

Using univariable odds ratio proportional logistic regression parameters, patients with higher levels of 8 OhdG had 51% higher chance to present with any stage of endometriosis (OR 1.51; $p=0.0007$), and 14% higher chance to have advanced stage of endometriosis (OR 1.14; $p=0.004$). On the other hand, OGG1 showed 20% less probability of having any stage of endometriosis (OR 0.8; $p=0.009$) and 18% less probability of having an advanced stage of endometriosis (OR 0.82 $p=0.011$). The probability of having any stage of endometriosis was 149% higher when oxidation of protein, as demonstrated by levels of protein carbonyl, was present (OR 2.49 $p=0.021$) without increasing the risk of stages III/IV. There were no significantly different on OR in the remaining oxidative stress biomarkers (**Table 2**).

Predicting endometriosis progression with oxidative stress biomarkers

Receiver Operating Characteristics (ROC curves) were calculated for each biomarker as showed in **Figure 5**. The vertical axis (Y) represents a true positive rate (Sensitivity) and the horizontal axis (X), the false positive rate (1-specificity). 8 OhdG had the highest discrimination ability with 86% of its area under the curve (AUC), followed by the ROC curve (79.4%) of OGG1, and ROC of approximately 70% of protein carbonyl. ROS, LPO, TAC had a lower discrimination ability with AUC of 64.7%, 54.5%, and 53.8% respectively.

A prediction endometriosis model was built by combining the three highest biomarkers of sensitivity and specificity. Variables were entered into the model sequentially based on concordance indices, with the higher concordance OhdG being entered first, followed by OGG1, and finally PC. Lines were drawn at 0.5 on both axes, separating the plotting area into likely diagnosis groups: the lower left quadrant corresponds to patients likely to be diagnosed as not having endometriosis; the upper left quadrant corresponds to stage I/II endometriosis; and the upper right quadrant corresponds to stage III/IV endometriosis. The ability of our model to predict and to distinguish between patients without endometriosis, patients with endometriosis stage I/II and stage III/IV. We used a multichotomous logistic regression model. After bootstrap validation, the model demonstrated a highly discriminatory rate, with a concordance index of 0.87 (Figure 6).

Discussion

Endometriosis is thought to be a progressive disease in some patients, although in some patients it may stay the same or regress (3). It is not clear what are the most important molecular events that allow the disease to progress in some women but not in others. Immediately following the surgery, we classified our patients according the revised ASRM classification (score based system). Revised classification encompasses a mixture of different categories or phenotypes of endometriosis including superficial endometriosis, endometrioma and deeply infiltrating endometriosis. The histological classification of superficial endometriosis, endometrioma and deeply infiltrating endometriosis which is defined as >0.05 mm in depth into the tissue is now being used in the literature. However to the best of our knowledge there are no guidelines or validation for these three phenotypes. While this classification may provide useful information, we did not classify our subjects according to the histological findings, rather we used the surgery ASRM validated score system.

The results of this study suggest that oxidative stress plays an important role on endometriosis progression. Higher DNA damage and lower DNA repair in advanced stages of endometriosis indicate that instability of cells with higher oxidation may be involved in progression of endometriosis. Higher sensitivity and specificity of the 8 OhdG, OGG1 and protein carbonyl were used to build ROC curves reaching an AUC of 86%, 79.5% and 70% respectively. By using the prediction model, approximately 9 of 10 patients with endometriosis, could be stratified based on whether patients have early stage or advanced stage of endometriosis. The model, with a concordance index of 0.87, was highly discriminatory. The results suggest that these oxidative stress biomarkers are reliable quantitative indicators of endometriosis severity.

Earlier studies reported a significantly higher amount of oxidative stress in peritoneal fluid, blood and endometriotic tissue from women with endometriosis.^{9,10,21,25,29-33} One of the important and sensitive indicators of DNA

1 damage and a well-validated biomarker, resulting from oxidative stress, is the
2 DNA guanine base oxidation product 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG),
3 which was also studied in other publications.^{9,19,21,34}

4 The findings of our study are in concordance with Matsuzaki et al 2009
5 and Yamaguchi et al 2008, which stated that patients with endometriosis have
6 higher amounts of 8 OHdG-DNA damage compared with controls. Using high
7 performance liquid chromatography-electrochemical technique, Kao et al 2005
8 also showed higher levels of 8-OhdG in patients with endometriosis. There has
9 been increasing evidence that DNA from endometriosis tissue is affected by
10 oxidative stress.^{9,21,34}

11 Under normal circumstances, higher DNA damage is corrected with
12 increasing DNA repair enzymatic activity; however it was not what we found in
13 the stroma of patients with advanced stage of endometriosis, where higher DNA
14 damage was correlated with a lower DNA repair activity. Measuring the specific
15 8-oxoguanine DNA-Glycosylase (OGG1) activities we found that there is a
16 decrease of DNA repair system activity in the stroma cells. Higher DNA damage
17 and lower DNA repair in the stroma of patients with advanced stage of
18 endometriosis, could lead to a damage in a surrounding tissue and promote the
19 destruction and scarring typically found in those patients.

20 Reactive Oxygen Species (ROS) are constantly produced during
21 normal metabolic processes in all living species.³⁵ The results of this study
22 suggest an increase in DNA damage and a proportional decrease of DNA repair
23 with progression of endometriosis; thus showing that OS is involved in local
24 tissue destruction and boosts the endometriosis to progress. We also found
25 higher levels of protein carbonyls in patients with endometriosis when compared
26 with control patients. The carbonyls groups have some important advantages in
27 early formation and stability. These are necessary characteristics of a marker to
28 be considering as a good diagnostic test.³⁶

29 This study is in agreement with Ngô et al 2009, who showed that the
30 imbalance between the production of free radical and the antioxidant system are
31 involved in some way for disease aggressiveness. In patients with endometriosis,

1 free radical and consequently DNA damage accumulation will ultimately lead to
2 cellular injury. Our study is the first one to demonstrate the correlation between
3 DNA damage and DNA repair, associated with a progression of the disease.

4 Many factors could be involved in the imbalance of production of
5 reactive oxygen species and antioxidant system in patients with endometriosis,
6 such as: elevation of inflammatory biomarkers ³⁷; low consumption of fruit and
7 vegetables, sources of antioxidant ^{38,39}; huge amount of iron coming from
8 retrograde menstruation ⁴⁰; and female infertility. ⁴¹ Among all factors that could
9 increase the production of reactive oxygen species in patients with endometriosis
10 this study describes lower repair of oxidative DNA damage activity as a major
11 contributing factor.

12 Although we have demonstrated that lower activity of DNA repair
13 pathway might be involved in progression of endometriosis, this study has the
14 limitation of using only immunohistochemistry to assess levels of OGG1. Using
15 additional laboratory techniques in future studies are critical to help understand
16 the base excision repair (BER) pathway and the role of endometriosis
17 physiopathology. Our prediction model needs to be validated in another cohort of
18 patients in order, to be used in a clinical settings. Phase of the cycle is important
19 as this can influence the outcome. Unfortunately, we were not able to schedule
20 all surgeries in a specific phase of the menstrual cycle. This is a major limitation.
21 More publications are needed in order to better understand the correlation
22 between markers of oxidative stress and the phase of the menstrual cycle in
23 patients with endometriosis.

24 In conclusion, this study strongly supports the hypothesis that oxidative
25 stress is a major contributor in endometriosis progression. In this study we have
26 demonstrated higher amounts of oxidative stress in patients with endometriosis,
27 providing strong rationale for future studies to adopt a clinical antioxidant protocol
28 and use new laboratory techniques that may be helpful in delaying endometriosis
29 progression.

30

Legend

Figure 1: The box represents Median, upper quartile (75%), lower quartile (25%), highest observation, and lowest observation. The outliers are also represented in the graph. Box plots with Spearman correlation between 8-OHdG and OGG1 ($r = 0.47$ ($-0.76, -0.17$); $p < 0.003$).

Figure 2: Scatterplot showing the correlation between OGG1 and 8 OHdG

Figure 3: Formalin/PFA-fixed paraffin-embedded sections stained for H-E; immunostained for 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine antibody [N45.1]; and immunostained for 8-oxoguanine DNA glycosylase. Expression of 8-OhdG and OGG1 appears as brown nuclear staining. **A-C:** Normal Tubes tissue Control Group Slides. 10x H-E/8-OHdG/ OGG1 respectively. **D-F:** Peritoneum pelvic sidewall endometriosis tissue ASRM/Stage I/II (10x) H-E/8-OHdG/ OGG1 respectively. **G-I:** Cul-de-Sac endometriosis biopsy ASRM/Stage III/IV 10x H-E/8-OHdG/ OGG1 respectively.

Figure 4: Advanced stage of endometriosis showing glands and stroma with higher 8-OHdG positive immunostaining. Advanced stage of endometriosis showed glands with higher expression of OGG1. Stroma does not appear to have DNA repair. A: Utero-Sacro ligament showing 8-OHdG immunostaining. 10x) B: Utero Sacro ligament showing OGG1stain (10x) C: Bladder 8- OhdG – OGG1 (10x) D: Bladder OGG1 E: Rectal Lesion 8-OHdG (10x) F: Rectal Lesion OGG1 (10x) G: Pelvic side wall 8-OhdG (10x) H: Pelvic side wall 8-OHdG (10x) I: Pelvic side wall OGG1 (10x)

Figure 5: Receiver operating characteristic (ROC) of all biomarkers for detecting endometriosis. The vertical axis (Y) is representing a true positive rate (Sensitivity), and the horizontal axis (Y), the false positive rate (1-specificity).

Figure 6: Prediction of severity of endometriosis model - Lines are drawn at 0.5 on both axes, separating the plotting area into likely diagnosis groups: the lower left quadrant corresponds to patients likely to be diagnosed as not having endometriosis; the upper left quadrant corresponding to stages I/II endometriosis; and the upper right quadrant corresponding to stages III/IV endometriosis.

Acknowledgment

Luiz Fernando Pina Carvalho was supported by a Brazilian government research grant from “Coordination for the improvement of higher-level personnel” (CAPES). Part of this manuscript data was presented at WSE 11th World Congress on Endometriosis – September 4 – 7, Montpellier France 2011.

The authors would like to thank Denise Hatala for her help with the immunohistochemistry protocol in this manuscript.

References

1. Carvalho L, Podgaec S, Bellodi-Privato M, Falcone T, Abrao MS. Role of eutopic endometrium in pelvic endometriosis *J Minim Invasive Gynecol*. 2011;18(4):419-427.
2. Falcone T, Lebovic DI. Clinical management of endometriosis *Obstet Gynecol*. 2011;118(3):691-705.
3. Bassi MA, Podgaec S, Dias Junior JA, Sobrado CW, D Amico Filho N. Bowel endometriosis: A benign disease?] *Rev Assoc Med Bras*. 2009;55(5):611-616.
4. Giudice LC. Clinical practice. endometriosis *N Engl J Med*. 2010;362(25):2389-2398.
5. The National Women's Health Information Council. Understanding endometriosis: Past, present and future. . 2005.
6. Revised american society for reproductive medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril*. 1997;67(5):817-821.
7. Bedaiwy MA, Hussein MR, Biscotti C, Falcone T. Pelvic endometriosis is rarely associated with ovarian borderline tumours, cytologic and architectural atypia: A clinicopathologic study *Pathol Oncol Res*. 2009;15(1):81-88.
8. Ngo C, Chereau C, Nicco C, Weill B, Chapron C, Batteux F. Reactive oxygen species controls endometriosis progression. *Am J Pathol*. 2009;175(1):225-234.

- 1 9. Kao SH, Huang HC, Hsieh RH, Chen SC, Tsai MC, Tzeng CR. Oxidative
2 damage and mitochondrial DNA mutations with endometriosis *Ann N Y Acad Sci*.
3 2005;1042:186-194.
- 4 10. Szczepanska M, Kozlik J, Skrzypczak J, Mikolajczyk M. Oxidative stress may
5 be a piece in the endometriosis puzzle. *Fertil Steril*. 2003;79(6):1288-1293.
- 6 11. Gupta S, Agarwal A, Krajcir N, Alvarez JG. Role of oxidative stress in
7 endometriosis. *Reprod Biomed Online*. 2006;13(1):126-134.
- 8 12. Watt J, Ewart M-, Greig FH, Oldroyd KG, Wadsworth RM, Kennedy S. The
9 effect of reactive oxygen species on whole blood aggregation and the endothelial
10 cell-platelet interaction in patients with coronary heart disease. *Thromb Res*.
11 2012;130(2):210-215.
- 12 13. Galea E, Launay N, Portero-Otin M, et al. Oxidative stress underlying axonal
13 degeneration in adrenoleukodystrophy: A paradigm for multifactorial
14 neurodegenerative diseases? *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of*
15 *Disease*. 2012;1822(9):1475-1488.
- 16 14. Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT. Urinary 8-OHdG: A marker of oxidative
17 stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics *Clin*
18 *Chim Acta*. 2004;339(1-2):1-9.

- 1 15. Carvalho LFP, Samadder AN, Agarwal A, Fernandes LFC, Abrão MS.
2 Oxidative stress biomarkers in patients with endometriosis: Systematic review.
3 *Arch Gynecol Obstet.* 2012;1-8.
- 4 16. Hendin BN, Kolettis PN, Sharma RK, Thomas Jr. AJ, Agarwal A. Varicocele
5 is associated with elevated spermatozoal reactive oxygen species production
6 and diminished seminal plasma antioxidant capacity. *J Urol.* 1999;161(6):1831-
7 1834.
- 8 17. Sharma RK, Pasqualotto FF, Nelson DR, Thomas Jr. AJ, Agarwal A. The
9 reactive oxygen species - total antioxidant capacity score is a new measure of
10 oxidative stress to predict male infertility. *Human Reproduction.*
11 1999;14(11):2801-2807.
- 12 18. Shekarriz M, Thomas Jr. AJ, Agarwal A. Effects of time and sperm
13 concentration on reactive oxygen species formation in human semen. *Arch*
14 *Androl.* 1995;34(2):69-75.
- 15 19. Ma H, Wang J, Abdel-Rahman SZ, Boor PJ, Khan MF. Oxidative DNA
16 damage and its repair in rat spleen following subchronic exposure to aniline
17 *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008;233(2):247-253.
- 18 20. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2' -deoxyguanosine (8-
19 OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis *J Environ Sci*
20 *Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2009;27(2):120-139.

- 1 21. Matsuzaki S, Schubert B. Oxidative stress status in normal ovarian cortex
2 surrounding ovarian endometriosis. *Fertil Steril*. 2010;93(7):2431-2432.
- 3 22. Fujii H, Kono K, Nakai K, et al. Oxidative and nitrosative stress and
4 progression of diabetic nephropathy in type 2 diabetes *Am J Nephrol*.
5 2010;31(4):342-352.
- 6 23. Isobe C, Abe T, Terayama Y. Levels of reduced and oxidized coenzyme Q-
7 10 and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in the cerebrospinal fluid of patients with
8 living parkinson's disease demonstrate that mitochondrial oxidative damage
9 and/or oxidative DNA damage contributes to the neurodegenerative process
10 *Neurosci Lett*. 2010;469(1):159-163.
- 11 24. Mahfouz R, Sharma R, Sharma D, Sabanegh E, Agarwal A. Diagnostic value
12 of the total antioxidant capacity (TAC) in human seminal plasma. *Fertil Steril*.
13 2009;91(3):805-811.
- 14 25. Van Langendonckt A, Casanas-Roux F, Donnez J. Oxidative stress and
15 peritoneal endometriosis. *Fertil Steril*. 2002;77(5):861-870.
- 16 26. Oner-Iyidogan Y, Kocak H, Gurdol F, Korkmaz D, Buyru F. Indices of
17 oxidative stress in eutopic and ectopic endometria of women with endometriosis
18 *Gynecol Obstet Invest*. 2004;57(4):214-217.

- 1 27. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic
2 indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology*
3 *and Medicine*. 1990;9(6):515-540.
- 4 28. Bedaiwy MA, Goldberg JM, Falcone T, et al. Relationship between oxidative
5 stress and embryotoxicity of hydrosalpingeal fluid *Hum Reprod*. 2002;17(3):601-
6 604.
- 7 29. Jackson LW, Schisterman EF, Dey-Rao R, Browne R, Armstrong D.
8 Oxidative stress and endometriosis. *Hum Reprod*. 2005;20(7):2014-2020.
- 9 30. Verit FF, Erel O, Celik N. Serum paraoxonase-1 activity in women with
10 endometriosis and its relationship with the stage of the disease. *Hum Reprod*.
11 2008;23(1):100-104.
- 12 31. Shanti A, Santanam N, Morales AJ, Parthasarathy S, Murphy AA.
13 Autoantibodies to markers of oxidative stress are elevated in women with
14 endometriosis *Fertil Steril*. 1999;71(6):1115-1118.
- 15 32. Foyouzi N, Berkkanoglu M, Arici A, Kwintkiewicz J, Izquierdo D, Duleba AJ.
16 Effects of oxidants and antioxidants on proliferation of endometrial stromal cells
17 *Fertil Steril*. 2004;82 Suppl 3:1019-1022.
- 18 33. Leconte M, Nicco C, Ngo C, et al. The mTOR/AKT inhibitor temsirolimus
19 prevents deep infiltrating endometriosis in mice *Am J Pathol*. 2011;179(2):880-
20 889.

- 1 34. Yamaguchi K, Mandai M, Toyokuni S, et al. Contents of endometriotic cysts,
2 especially the high concentration of free iron, are a possible cause of
3 carcinogenesis in the cysts through the iron-induced persistent oxidative stress.
4 *Clin Cancer Res.* 2008;14(1):32-40.
- 5 35. Poljsak B, Milisav I, Lampe T, Ostan I. Reproductive benefit of oxidative
6 damage: An oxidative stress "malevolence"? *Oxid Med Cell Longev.*
7 2011;2011:760978.
- 8 36. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl
9 groups as biomarkers of oxidative stress *Clin Chim Acta.* 2003;329(1-2):23-38.
- 10 37. Podgaec S, Abrao MS, Dias JA,Jr, Rizzo LV, de Oliveira RM, Baracat EC.
11 Endometriosis: An inflammatory disease with a Th2 immune response
12 component *Hum Reprod.* 2007;22(5):1373-1379.
- 13 38. Parazzini F, Chiaffarino F, Surace M, et al. Selected food intake and risk of
14 endometriosis *Hum Reprod.* 2004;19(8):1755-1759.
- 15 39. Mier-Cabrera J, Aburto-Soto T, Burrola-Mendez S, et al. Women with
16 endometriosis improved their peripheral antioxidant markers after the application
17 of a high antioxidant diet *Reprod Biol Endocrinol.* 2009;7:54.
- 18 40. Defrere S, Lousse JC, Gonzalez-Ramos R, Colette S, Donnez J, Van
19 Langendonckt A. Potential involvement of iron in the pathogenesis of peritoneal
20 endometriosis. *Mol Hum Reprod.* 2008;14(7):377-385.

- 1 41. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female
- 2 reproduction. *Reprod Biol Endocrinol*. 2005;3:28.

3

8-OHdG

OGG1

PC

ROS

LPO

TAC

Table 1: Summary of oxidative cell injury biomarkers measured in control; minimal and mild endometriosis (Stage I/II); and in moderate and severe endometriosis (Stage III/IV).

Factor	Control (n=14)	Stage I/II (n=14)	Stage III/IV (n=16)	
				p-value
8- OhdG (%)	2.38 [0.38, 3.29]	13.2 [9.43, 14.21]	17.68 [15.47, 29.44]	< 0.001
OGG1 (%)	15.68 [14.5, 21.23]	9.16 [4.76, 13.08]	4.25 [3.02, 7.88]	0.001
PC (nmol/ml)	1.56 [1.26, 2.5]	3.29 [2.84, 4.54]	3.52 [2.13, 4.06]	0.033
TAC (μmol Trolox)	1110 [910, 1250]	1030 [940, 1250]	1200 [1060, 1250]	0.84
ROS (RLU)	17475 [9638, 22514]	4719 [0, 11780]	2401.5 [0, 13914]	0.24
LPO (μmolMDA/L)	1.53 [1.25, 1.64]	1.02 [1, 1.03]	3.02 [1.87, 3.04]	0.09

Values are median and 25th and 75th percentile - P<0.05 considered significant by Kruskal-Wallis rank sum test.

Factor	Control vs Stage I/II	Control vs Stage III/IV	Stage I/II vs Stage III/IV
8- OhdG (%)	<0.001	<0.001	0.04
OGG1 (%)	0.023	<0.001	0.075
PC (nmol/ml)	0.017	0.055	0.63

Pairwise Comparisons of Lab Values Between Groups

Table 2: Univariate Odds ratios calculated for each oxidative stress biomarker showing the increased risk of presence of endometriosis and advanced stage of endometriosis.

Factor	Endometriosis		Stage III/IV Endometriosis	
	Odds Ratio	p-value	Odds Ratio	p-value
8- OHdG	1.51	0.0007	1.14	0.004
OGG1	0.80	0.009	0.82	0.011
PC	2.49	0.021	1.34	0.38
TAC	1.00	0.64	1.00	0.43
ROS	1.00	0.33	1.00	0.45
LPO	1.41	0.53	6.41	0.011

Univariate Odds ratio was calculated using a proportional odds logistic regression. - P <0.05 was considered significant using Wilcoxon's signed rank test.