

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LÉON FACULTAD DE MEDICINA



MiOXSYS y medición de capacidad antioxidante de los espermatozoides

Por:

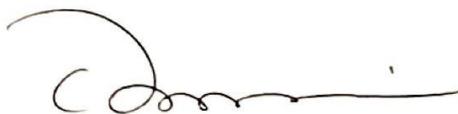
DRA. CRISTINA AIDÉ RAMÍREZ COLUNGA

Como requisito parcial para obtener el grado de
ESPECIALISTA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION

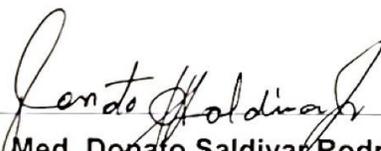
Febrero 2021

“MiOXSYS y medición de capacidad antioxidante de los espermatozoides”

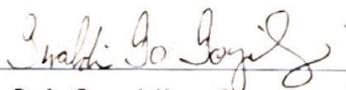
Aprobación de tesis:



Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez
Director de Tesis
Jefe del Centro Universitario de Medicina Reproductiva (CeUMER)
Subdirector de Estudios de Posgrado



Dr. Med. Donato Saldivar Rodríguez
Jefe de Departamento de Ginecología y Obstetricia



Dra. Sci. Geraldina Guerrero González
Coordinadora de Investigación
Departamento de Ginecología y Obstetricia

DEDICATORIA

Dedicado a lo desconocido, al mar de preguntas que falta por responder, sin ello no habría investigación...

Cristina Aidé Ramírez Colunga

AGRADECIMIENTOS

Con todo mi amor a mi abuelita, quien permanece en mí y sigo avanzando gracias a lo que construyo aquí, a mi madre, Blanca Alicia, a quien le debo todo, tu amor y tiempo dedicado se ven reflejados en mi trabajo. A mi segunda madre, Mague, quien me cuida y hace más ligero el camino.

A mi compañero de vida, Gustavo, el mejor amigo y apoyo que puedo tener.

A mis maestros, por ser el pilar y el generador de nuevos conocimientos.

A Dios, por ponerme siempre en el camino, y a todas las personas que contribuyeron de una forma u otra en la realización de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

CONTENIDO

PÁGINA

Índice de figuras.....	viii
Índice de tablas.....	ix
Índice de abreviaturas.....	x

CAPÍTULO 1

RESUMEN.....	1
--------------	---

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES.....	3
-------------------	---

CAPÍTULO 3

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	11
---------------------------------	----

CAPÍTULO 4

JUSTIFICACIÓN.....	12
--------------------	----

CAPÍTULO 5

HIPÓTESIS.....	13
5.1 Hipótesis de trabajo.....	13
5.2 Hipótesis nula.....	13

CAPÍTULO 6

OBJETIVOS.....	14
6.1 Objetivo primario.....	14
6.2 Objetivos secundarios.....	14

CAPÍTULO 7

MATERIAL Y MÉTODOS	15
--------------------------	----

CAPÍTULO 8

RESULTADOS.....	22
-----------------	----

CAPÍTULO 9

DISCUSIÓN.....	32
----------------	----

CAPÍTULO 10

CONCLUSIONES.....39

CAPÍTULO 11

REFERENCIAS..... 41

CAPÍTULO 12

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO..... 46

CAPÍTULO 13

ANEXOS..... 47

CAPÍTULO 14

ABSTRACT..... 49

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURAS	PÁGINA
Figura 1. Estrategia general del estudio.	18
Figura 2. Relación de tiempo en la medición del sORP.	25
Figura 3. Relación de sORPi con tasa de fertilización.	26
Figura 4. Análisis de sensibilidad entre el nivel del sORPi y la tasa de fertilización.	27
Figura 5. Relación de sORPf con tasa de fertilización.	28
Figura 6. Análisis de sensibilidad entre el nivel del sORPf y la tasa de fertilización.	28
Figura 7. Relación de sORPi con número de embriones Top Quality.	29
Figura 8. Relación de sORPf con número de embriones Top Quality.	30
Figura 9. QQ plot de los parámetros espermáticos.	31
Figura 10. Comparación de sORPi con el valor corte de sORP reportado.	38

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	PÁGINA
Tabla 1. Características de la población en estudio.	23
Tabla 2. Descripción de los parámetros espermáticos de las muestras incluidas en este estudio.	24
Tabla 3. Comparación de los valores estadísticos en cada uno de los parámetros espermáticos.	31

INDICE DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ASEBIR	Asociación para Estudio de la Biología de la Reproducción
βeta - hGC	Gonadotropina Coriónica Humana Fracción Beta
cAMP	Adenosina cíclica 3', 5'-monofosfato
CASA	Sistema Computarizado de Análisis Seminal
CeUMER	Centro Universitario de Medicina Reproductiva
EOR	Especies de Oxígeno Reactivas
FIV	Fertilización In Vitro
ICSI	Inyección Intracitoplasmática de espermatozoides
IMC	Índice de Masa Corporal
MDA	Malondialdehído
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
OMS	Organización Mundial de la Salud
pH	Potencial de Hidrógeno
PLA2	Fosfolipasa A2
SD	Desviación Estándar
sORP	Potencial de Oxidación-Reducción Estático
sORPf	Potencial de Oxidación-Reducción Estático Final
sORPi	Potencial de Oxidación-Reducción Estático Inicial
TAC	Capacidad Antioxidante Total
TRA	Técnicas de Reproducción Asistida

CAPITULO I

RESUMEN

La infertilidad masculina, definida como la alteración de por lo menos uno de los parámetros del espermograma establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) ¹ ocupa hasta el 50% de las causas reconocibles de infertilidad. ² Los avances en el campo han logrado identificar influencias ambientales, fisiológicas y genéticas a nivel molecular, que generan un estrés oxidativo derivado del desequilibrio entre oxidantes y reductores que resulta nocivo para el espermatozoide. ³ El sistema MiOXSYS ha surgido como una alternativa de cuantificar el estrés oxidativo, el cual consiste en un análisis de semen mediante un electrodo que monitorea el potencial de oxidación-reducción (sORP) en el semen humano con alta especificidad. Lo que permite relacionar el estrés oxidativo con la calidad espermática, así como con las tasas de fertilización o el desarrollo embrionario.

Objetivo: Correlacionar los niveles de producción de radicales libres y la capacidad antioxidante celular en espermatozoides con las tasas de fertilización y

desarrollo embrionario en ciclos de Fertilización In Vitro (FIV) e Inyección Intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).

Material y Métodos: Se realizó un estudio prospectivo y comparativo, en el Hospital Universitario “Dr. José E. González” con pacientes sometidos a un procedimiento de alta complejidad como FIV o ICSI. Se midió el sORP al momento de la licuefacción del semen y al momento de realizar la FIV/ICSI y se correlacionó con los parámetros espermáticos, la tasa de fertilización y el desarrollo embrionario.

Resultados: No se encontró una relación significativa entre el potencial de oxidación-reducción (sORP) en el semen humano con la tasa de fertilización, ni con el grado de desarrollo embrionario. Sin embargo, se corroboró la relación negativa entre la concentración y motilidad, no siendo así para la morfología de los espermogramas realizados.

Conclusiones: El estrés oxidativo de los espermatozoides medido como el potencial de oxidación-reducción mediante el sistema MiOXSYS no se relaciona con las tasas de fertilización ni el desarrollo embrionario en técnicas de reproducción asistida. Por tanto, no es posible delimitar un valor de corte como parámetro de infertilidad. Se observó una relación entre el nivel alto de sORP con una cuenta y motilidad espermática baja.

Palabras clave: Estrés oxidativo, MiOXSYS, infertilidad masculina, desarrollo embrionario, fertilización.

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

La infertilidad, definida como la incapacidad de concebir después de 12 meses de relaciones sexuales sin protección ⁴, afecta a 8 millones de parejas en los Estados Unidos, de los cuales hasta el 50% tiene un factor contributivo masculino. ⁵ Globalmente, se estima que el 12% de los hombres en edad reproductiva en todo el mundo sufren de infertilidad. ² La infertilidad en estos es comúnmente causada por problemas en la expulsión del semen, ausencia o bajos niveles de espermatozoides, formas anormales, y problemas en su movimiento. ⁶

Recientemente los avances en el campo de la infertilidad han contribuido a nuestro conocimiento sobre las circunstancias que atribuyen al factor masculino. Se han reconocido influencias ambientales, fisiológicas y genéticas, a nivel molecular, sin embargo, el estrés oxidativo resultante del desequilibrio entre oxidantes y reductores parece ser un denominador común ³ que perjudica la función del esperma y no ha sido bien estudiado.

El estrés oxidativo se define como la alteración en el equilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (radicales libres) y las defensas antioxidantes ⁷. Las especies de oxígeno reactivo (EOR) son agentes oxidantes altamente reactivos que pueden, a niveles supra fisiológicos, tener un efecto tóxico potencial en la calidad y función del esperma. ³ El estrés oxidativo ha surgido como una de las principales causas de infertilidad inexplicable, ya que puede causar un incremento en la fragmentación de ADN espermático, disminución de motilidad, concentración y morfología anormal.⁸

Al igual que otros radicales libres, las EOR contienen electrones no apareados dados por la incompleta reducción del oxígeno molecular por lo cual exhiben una fuerte reactividad con otros compuestos. ⁹ Además, típicamente incitan una reacción en cadena exponiendo un tipo de actividad de círculo vicioso.

En circunstancias fisiológicas normales, como todas las demás células vivas, los espermatozoides requieren oxígeno para sobrevivir, por lo tanto, éstas EOR se forman como producto del metabolismo del oxígeno natural que actúan como moléculas de señalización vitales, es decir, se requieren a niveles bajos para llevar a cabo la capacitación de los espermatozoides, la hiperactivación, la reacción acrosómica y la fusión con los ovocitos ¹⁰. Sin embargo, una variedad de exposiciones ambientales y procesos patológicos pueden dar niveles excesivos de EOR y se han asociado con entidades patológicas como la enfermedad

neurodegenerativa, la enfermedad vascular, el cáncer ¹¹ y la que es motivo de nuestro estudio, la infertilidad.⁸

Se ha observado que los espermatozoides son especialmente susceptibles al daño causado por un exceso de EOR, ya que sus membranas plasmáticas contienen grandes cantidades de ácidos grasos poliinsaturados, ¹² lo que favorece la peroxidación lipídica de las membranas plasmáticas, produciendo una alteración de la función de los espermatozoides y su capacidad de fertilización ¹³, además su citoplasma contiene concentraciones muy bajas de enzimas antioxidantes, las cuales no pueden proteger a la membrana plasmática que rodea el acrosoma y la cola, lo que obliga a los espermatozoides a depender solo de la protección proporcionada por el plasma seminal, ³ en base a esta fisiopatología general se cree que los niveles excesivos de EOR alteran la función normal del espermatozoide y su vitalidad.

Agarwal y col. ¹⁴ en el 2006 con el objetivo de determinar los patrones anormales de producción de EOR en pacientes con factor de infertilidad masculino y de definir valores de referencia de EOR en dichos pacientes, realizaron un estudio retrospectivo, donde analizaron pacientes con infertilidad con parámetros normales y anormales del semen, así como en donadores sanos. Encontraron que los donadores sanos presentaron una concentración espermática, motilidad y morfología significativamente más elevada en comparación con los pacientes con infertilidad. El análisis indicó una asociación significativa entre la infertilidad y las EOR. Los valores de corte de EOR fueron de 1.2 a 1.4, por lo tanto, concluyen que

las EOR son un marcador independiente de infertilidad, sin importar si estos pacientes tienen o no parámetros de semen normales.

De manera análoga, el Ácido Desoxirribonucleico (ADN) espermático, es esencial para la fertilización exitosa y el desarrollo del embrión.^{13, 15}

A través del tiempo se ha demostrado que los espermatozoides de hombres infértiles contienen varias alteraciones nucleares. En 1998, Aitken RJ y col. evaluaron espermatozoides humanos expuestos a niveles crecientes de estrés oxidativo mediante la generación de oxidantes endógenos con Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) para la generación de oxidantes endógenos, o mediante la exposición directa al peróxido de hidrógeno. Encontrando a bajos niveles de estrés oxidativo una reducción significativa en la fragmentación del ADN espermático, en cambio a medida que aumentaba el estrés oxidativo, los espermatozoides exhibieron niveles significativamente elevados de daño al ADN. Las tasas de fecundación aumentaron a medida que aumentó el nivel de estrés oxidativo; solo en los niveles más elevados de estrés, se observaron tasas extremadamente altas de fragmentación del ADN, pérdida de la capacidad de movimiento del espermatozoide y en la fusión con el ovocito.¹⁶

En el 2001, Zini y cols. correlacionaron de manera prospectiva los niveles de desnaturalización y fragmentación del ADN espermático con los parámetros estándar del semen en pacientes con infertilidad conocida y en pacientes sanos; Reportando que los niveles de desnaturalización y fragmentación del ADN

espermático fueron significativamente más altos en los sujetos infértiles en comparación con los controles fértiles. Se documentó una correlación negativa de los valores de desnaturalización y fragmentación con los parámetros espermáticos estándar, siendo la más fuerte con la motilidad espermática. Los autores concluyeron que la infertilidad está asociada con una mala integridad del ADN espermático.¹⁷

En el 2004, Mohamed y cols, examinaron el papel de la apoptosis y las EOR en la inducción de daños en el ADN en espermatozoides eyaculados, compararon un grupo de pacientes con infertilidad conocida contra un grupo de donantes de semen sano, encontrando mayor tasa de apoptosis y niveles de EOR en los pacientes con infertilidad, así mismo lograron correlacionar las EOR con la apoptosis y el índice de fragmentación del ADN, lo que sugiere fuertemente que el daño al ADN puede ser inducido por el asalto oxidativo, posiblemente causado por las altas frecuencias de roturas de ADN de cadena simple y doble.¹³

Aunque la evidencia presentada sugiere que las EOR y la extensión del daño al ADN están estrechamente relacionadas con la función del espermatozoide y por ende con la infertilidad masculina, los estudios realizados hasta ahora contienen una alta variabilidad intraindividual e inter observador, además se han realizado de forma inconsistente entre laboratorios. Por lo anterior, existe la necesidad de pruebas más avanzadas que puedan evaluar con precisión la calidad del espermatozoide y determinar la etiología del varón infértil. Los métodos utilizados hasta ahora abarcan ensayos de uso común para medir estrés oxidativo solo con

biomarcadores. Ejemplos de tales ensayos incluyen quimioluminiscencia para EOR, capacidad antioxidante total (TAC) para antioxidantes y la determinación de malondialdehído (MDA) para daños post hoc debido a la peroxidación lipídica.¹⁰ Sin embargo, estas pruebas son laboriosas, requieren mucho tiempo, son costosas y requieren instrumentos sofisticados y grandes volúmenes de muestra. La prueba ideal debe ser simple y ser capaz de medir todos los oxidantes y antioxidantes que contribuyen al estrés oxidativo en una muestra de semen.

La falta de precisión de las pruebas directas e indirectas, generan una discrepancia en la medición del estrés oxidativo, lo que ha obstaculizado su uso clínico como indicador de calidad para el semen. Algunas pruebas midieron marcadores únicos de oxidantes o solo de reductores, lo que lleva a la falta de estandarización de los resultados¹⁸, de ahí nace el potencial del proceso de reducción/oxidación estático (sORP), el cual trata del balance redox actual en las muestras de semen, es decir la relación entre oxidantes y antioxidantes y se ha descrito como una medida integrada del equilibrio entre la actividad oxidante total (es decir, las especies oxígeno reactivas, tioles oxidados, radicales superóxido, radicales hidroxilo, peróxidos de hidrógeno, óxidos nítricos, peroxinitritos, iones de metal de transición, etc.) y la actividad total del agente reductor (es decir, tioles libres, ascorbatos, tocoferoles α , carotenos β , ácidos úricos, entre otros).

Medir el sORP en muestras de semen se ha convertido en un método novedoso en el campo de la andrología, el cual se ha mostrado prometedor para

predecir parámetros de semen anormales y diferenciar muestras de semen fértiles de infértiles. ¹⁰

En dos estudios realizados por Arfa y Agarwal, se determinó que los valores de sORP del semen, son independientes a la edad y al índice de masa corporal (IMC), por lo que reflejan el estado de estrés oxidativo en el sistema reproductor masculino y no se trata de una medida sistémica indirecta. ^{18 19}.

El sistema MiOXSYS ha surgido como una alternativa a los problemas antes planteados, el cual consiste en una prueba de análisis de semen mediante un electrodo que monitorea el sORP in vitro, utilizando una tecnología electroquímica para la medición cualitativa (milivoltios) del potencial de oxidación-reducción estática en el semen humano con alta especificidad. El ensayo de MiOXSYS proporciona una medida rápida y holística, una vez que el sensor con la muestra del semen se inserta correctamente en el sistema, la medida de sORP se completa en 3 minutos con la visualización de los resultados a diferencia de la utilización de quimioluminiscencia donde se requiere de 60 min para procesar los resultados, y 70 para métodos que utilizan fluorescencia.

El sistema MiOXSYS está diseñado para usarse junto con los parámetros estándar de análisis de semen (volumen de eyaculación, espermatozoides total, concentración de espermatozoides, motilidad total, motilidad progresiva y morfología) como una ayuda para evaluar la calidad del semen, hasta ahora su uso se ha limitado a laboratorios y en hombres adultos de 21 a 45 años de edad. ²⁰

A la fecha, existen 2 publicaciones que utilizaron el sistema MiOXYS para evaluar la calidad del semen, Agarwal y col. establecieron en el 2017 un valor de corte de sORP de $1.42 \text{ mV} / 10^6 \text{ ml}$ para diferenciar grupos de semen fértiles de infértiles, ¹⁸ Posteriormente, en el mismo año, Arafa y col. establecieron el valor de $1.38 \text{ mV} / 10^6 \text{ ml}$ para diferenciar entre las muestras de semen anormales y las normales y un valor de corte de $1.41 \text{ mV} / 10^6 \text{ ml}$, para poder diferenciar entre muestras de semen infértiles y fértiles. ¹⁹

CAPÍTULO III

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En general, los parámetros espermáticos (concentración, motilidad y morfología) son malos predictores de infertilidad. Dado que el sORP es una medida del estrés oxidativo que afecta el número de espermatozoides, su motilidad y morfología, el sORP promete ser un mejor parámetro predictor en la identificación de semen de pacientes infértiles ¹⁹ así como del éxito en técnicas de reproducción asistida de alta complejidad.

CAPÍTULO IV

JUSTIFICACIÓN

El valor de sORP no se ha establecido como un indicador clínico de la calidad del semen, debido a que los valores de corte establecidos provienen de estudios realizados en un número limitado de centros de fertilidad. Por lo tanto, su reproducibilidad debe ser comprobada mediante resultados obtenidos en otros centros con el potencial de posicionarse como un método adicional de análisis al abordar a la pareja infértil con la finalidad de ofrecer un pronóstico que va más allá de la interpretación del espermograma.

Además, en nuestro conocimiento no existen estudios donde el sORP haya sido evaluado al momento en que la muestra de semen se utilice en una técnica de reproducción asistida de alta complejidad (FIV o ICSI), por lo que su valor pronóstico en la tasa de éxito de estas es novedoso y significativo en nuestra área de conocimiento.

CAPÍTULO V

HIPÓTESIS

5.1. Hipótesis de trabajo o alterna (Ha)

Los niveles de sORP del semen son indicadores de la calidad espermática, y a su vez son predictores de éxito en técnicas de reproducción asistida de alta complejidad (FIV e ICSI).

5.2. Hipótesis nula (H0)

Los niveles de sORP no son indicativos de la calidad espermática y no predicen los resultados reproductivos de las técnicas de reproducción asistida de alta complejidad (FIV e ICSI).

CAPÍTULO VI

OBJETIVOS

6.1. Objetivo General

- Correlacionar los niveles de producción de radicales libres y la capacidad antioxidante celular en espermatozoides con las tasas de fertilización en FIV e ICSI

6.2 Objetivos Específicos

- Comparar el nivel de sORP del esperma posterior a la eyaculación, específicamente al momento de la licuefacción y al momento de realizar la FIV/ICSI, donde ya no cuenta con los antioxidantes naturales presentes en el plasma seminal.
- Correlacionar el grado de desarrollo embrionario con el nivel de sORP
- Correlacionar el nivel de sORP con los parámetros espermáticos: Concentración, motilidad y morfología.

CAPÍTULO VII

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio prospectivo y comparativo. Este trabajo se llevó a cabo en el Centro Universitario de Medicina Reproductiva (CeUMER), del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León en un periodo de 1 año, comprendido entre septiembre a noviembre del 2020. Se incluyeron pacientes entre 20 a 47 años, que se sometieron a alguna técnica de reproducción asistida de alta complejidad como FIV/ICSI y que contaron por lo menos con un embrión de buena calidad para su transferencia. Se excluyeron de este estudio a los pacientes azoospermicos. En cuanto a las parejas, se incluyeron mujeres de 20-40 años que consultaron por infertilidad, incluyendo ovodonadoras, y que tenían por lo menos un embrión de buena calidad para transferencia. Se excluyeron mujeres de >40 años, con factor ovárico claramente diagnosticado, que no respondieron adecuadamente a los protocolos de estimulación ovárica, con baja reserva ovárica, o de las que se obtuvieron ovocitos de mala calidad. Se eliminaron aquellas pacientes en los que no hubo transferencia de embriones en fresco.

Método

Una vez que se identificó que la pareja cumpliera con los criterios de inclusión, se le invitó a participar en este estudio. Una vez obtenido el consentimiento por parte de los participantes se procedió a la firma del formato de consentimiento informado.

A continuación, el sujeto de investigación proporcionó la muestra de esperma. Brevemente, se le proporcionó al paciente un recipiente plástico estéril, donde mediante masturbación con abstinencia sexual mínima de 3 días colectó la muestra.

Posterior a la colección de la muestra, se esperó de 10 a 30 minutos para permitir la licuefacción de la muestra. Con el objetivo corroborar la presencia de espermatozoides en la muestra, se colocó una alícuota de 10 μ L en la cámara de conteo de Makler para su visualización directa mediante microscopía de campo claro. Una vez que se corroboró que la muestra cumplía con los criterios de inclusión, se tomó una alícuota de 30 μ L para la medición del sORP mediante el sistema MiOXSYS. Brevemente, se insertó un sensor en el equipo MiOXSYS, al que se aplicaron 30 μ l de la muestra de semen. En el sensor, la muestra fluye internamente a través del electrodo de trabajo y llena la celda de referencia, completando el circuito electroquímico. La lectura de sORP obtenida refleja el promedio de los 10 últimos segundos (o lo equivalente a 20 lecturas) del proceso.

Esta medición del sORP al tiempo de la licuefacción del semen, se registró como el sORP inicial (sORPi).

Simultáneamente, una alícuota de ~100 μ l de la muestra fue analizada mediante un espermograma convencional siguiendo las recomendaciones descritas en el manual de la OMS ²¹, registrando la concentración, motilidad y morfología. Además, la concentración y motilidad espermática se obtuvieron mediante el análisis de semen asistido por computadora (CASA) con el equipo IVOS versión 12.3 (Hamilton Thorne Biosciences, USA).

El resto de la muestra fue procesado por las embriólogas para su uso en la TRA de alta complejidad a la que se sometió la pareja. Brevemente, dependiendo de las características de la muestra, esta fue capacitada mediante gradiente de densidad) o lavada. Una vez que se completo este proceso, la muestra fue incubada a 37°C en un bloque térmico, hasta el momento de su utilización en la ICSI o FIV. En ese momento se tomó otra alícuota de 30 μ l de la muestra con la que se realizó una nueva medición del sORP, definida como el sORP final (sORPf). En la medición final, la muestra no contenía plasma seminal ya que fue eliminado durante la capacitación espermática o lavado de la muestra.

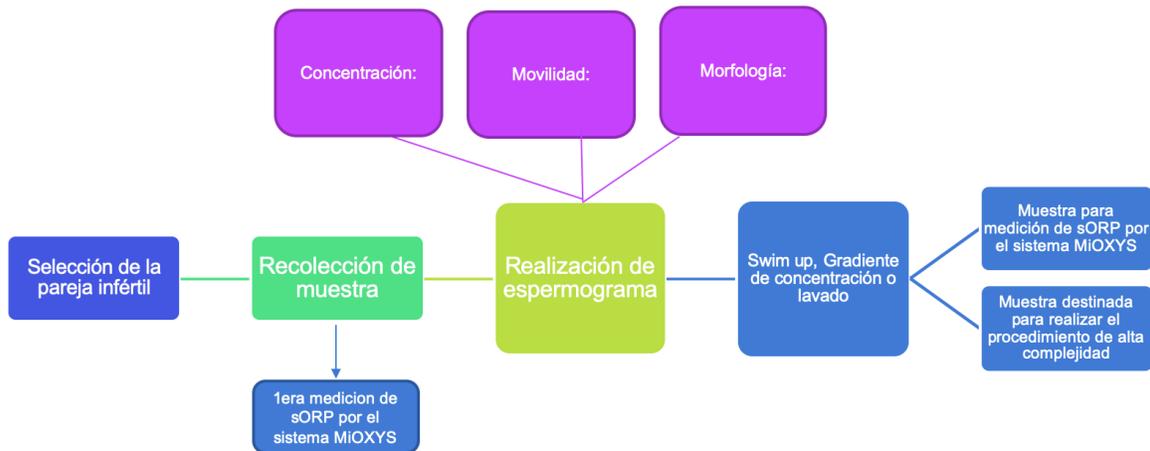


Figura 1. Estrategia general del estudio.

Por lo que, la primera medición brindó información acerca del nivel de producción / defensa de los espermatozoides tal como originalmente son eyaculados. Mientras que la segunda medición proporcionó información dinámica de cómo se desarrolló el proceso de oxidación durante la incubación en condiciones donde el espermatozoide no cuenta con los antioxidantes naturales presentes en el plasma seminal.

Por último, se registró la cantidad de óvulos inyectados, la tasa de fertilización, el número de células y calidad embrionaria en el día 2, 3 y 5, así como el día en que se llevó a cabo la transferencia embrionaria además del resultado de la fracción Beta de Gonadotropina Coriónica Humana (β -HGC), a las 2 semanas de la transferencia embrionaria.

Se creó una base de datos en Microsoft Excel con las siguientes variables: Edad, enfermedades crónicas, índice de masa corporal (IMC), consumo de tabaco, consumo de alcohol, días de abstinencia, tiempo en minutos transcurrido desde el eyaculado hasta la medición del sORPi, valor de sORPi, tiempo en minutos transcurrido desde el eyaculado hasta la medición del sORPf, el valor de sORPf, los parámetros espermáticos básicos: concentración, motilidad y morfología. espermática, óvulos inyectados, óvulos fertilizados, número de embriones top quality (se definió como top quality, aquellos embriones que en día 2 tenían de 4 a 5 células calidad 1 y 1-2 y que en día 3 tenían de 7-8 células calidad 1 y 1-2 en base a la clasificación de la Asociación para Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR), el número de embriones transferidos y finalmente el resultado de la β -HGC.

Tamaño muestral

En esta primera etapa del estudio se utilizó el método de regresión lineal mediante mínimos cuadrados con un cálculo en una población infinita con una precisión del 5%, confianza del 95% y prevalencia del 50%. Obteniendo una N de 15 pacientes.

Análisis estadístico:

Se creó una base de datos en Microsoft Excel con las variables demográficas de los pacientes incluidos y los parámetros obtenidos del espermograma. Los niveles de sORP inicial y final, fueron normalizados mediante una fracción establecida por el

manual operativo del sistema MiOXSYS (nivel de sORP/ concentración espermática). La tasa de fertilización se obtuvo en base a los óvulos inyectados y los que lograron su fertilización, (número de embriones inyectados / número de fertilizaciones normales). El grado de desarrollo embrionario se expresó como una variable ordinaria.

Para el análisis de las variables continuas, éstas fueron expresadas como medias con desviación estándar (SD) y las variables categóricas como frecuencias y/o proporciones relativas. Los análisis fueron realizados con el software RStudio y se consideró estadísticamente significativo el valor de $p < 0.05$.

La relación entre los niveles de sORP y la tasa de fecundación se estableció mediante una correlación de Pearson y los niveles de sORP con el número de embriones Top Quality, con un coeficiente de correlación de Spearman por tratarse de variables ordinales.

En cuanto al estudio de los niveles de sORP con los parámetros espermáticos, solo se analizó el inicial mediante correlación de Spearman.

Consideraciones éticas:

El presente protocolo fue sometido para su autorización al Comité de Ética, Comité de Investigación y Comité de Bioseguridad de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la U.A.N.L. El cual fue

registrado con la clave GI20-00005. El presente protocolo no proveyó ningún tipo de ganancia financiera o comercial por su realización, por lo que los autores declararon no tener ningún tipo de conflicto de interés por su realización.

CAPÍTULO VIII

RESULTADOS

En el presente estudio se incluyeron un total de 15 parejas con diagnóstico de infertilidad primaria y/o secundaria, que acudieron al Centro Universitario de Medicina Reproductiva del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, para someterse a alguna TRA de alta complejidad como FIV o ICSI, en quienes se descartó el factor ovárico como causa de la infertilidad.

La población masculina que se incluyó en este estudio (n=15) tuvo un promedio 36.9 ± 6.4 años, un peso de 85.3 ± 26.4 kg, un índice de masa corporal (IMC) de 29.6 ± 8.44 kg/m², y en promedio 3.3 días de abstinencia sexual al momento de la medición del sORP mediante el sistema MiOXISIS (Tabla 1).

Tabla 1. Características de la población en estudio

	Mínimo	Máximo	Promedio
Edad	26	47	36.9
IMC	22.6	56.8	29.5
Talla	1.59	1.78	169
Abstinencia	2	6	3.3

El cuanto a la descripción clínica de los pacientes, 13.3% refirió tabaquismo activo (n=2) y el 66.6% (n=10) consumo de alcohol ocasional, el 6.6% (n=1) de la población presentó arritmia cardiaca (n=1), 6.6% resistencia a la insulina (n=1) y 6.6% (n=1) diabetes mellitus con hipertensión.

Sobre las muestras de semen estudiadas, se analizó pH, volumen, concentración, motilidad, morfología y presencia de leucocitos siguiendo las recomendaciones del manual de la Organización Mundial de la Salud en su 10^a edición. ²¹.

En cuanto a los parámetros espermáticos, el pH de las muestras siempre estuvo dentro del rango de 7-8, con un promedio de 7.7. El volumen mínimo obtenido fue de 0.6 ml y el máximo de 5.3 ml con un valor promedio de 2.37 ± 1.28 ml. En cuanto a la concentración, la muestra con menor concentración de espermatozoides incluida en el estudio fue de 0.8 M/ml y la más elevada tuvo 337

M/ml con un promedio de 87.8 ± 88 M/ml. La motilidad varió encontrando de 20 – 81% de formas con movimiento progresivo (a+b) y un promedio de 46%. Respecto a la morfología, se encontró que las muestras contenían de 3 - 14% de células con morfología normal, con un promedio de 6.9% (Tabla 2).

Tabla 2.- Descripción de los parámetros espermáticos de las muestras incluidas en este estudio

	Media + DE	Min-Max
pH	7.7	7 -8
Volumen	2.3	0.6 - 5,3ml
Concentración	87.7 M/ml	0.8 – 337 M/ml
Motilidad	46%	20 – 81%
Morfología	6.9%	3% - 14%

Referente a la medición inicial del sORP, el tiempo promedio transcurrido de la recolección de la muestra a la medición del sORPi, fue de 20 min, con un promedio de 19.6mV sORPi, y para la segunda medición se presentó mayor heterogeneidad del tiempo transcurrido de la recolección de la muestra al momento de la inyección intracitoplasmática o FIV, con un promedio de 2.8 horas y un valor de 12.10mV de sORPf, lo cual se observa representado en la Figura 2, donde la

línea de la medición final muestra una mayor diferencia entre los minutos transcurridos con respecto a la medición inicial.

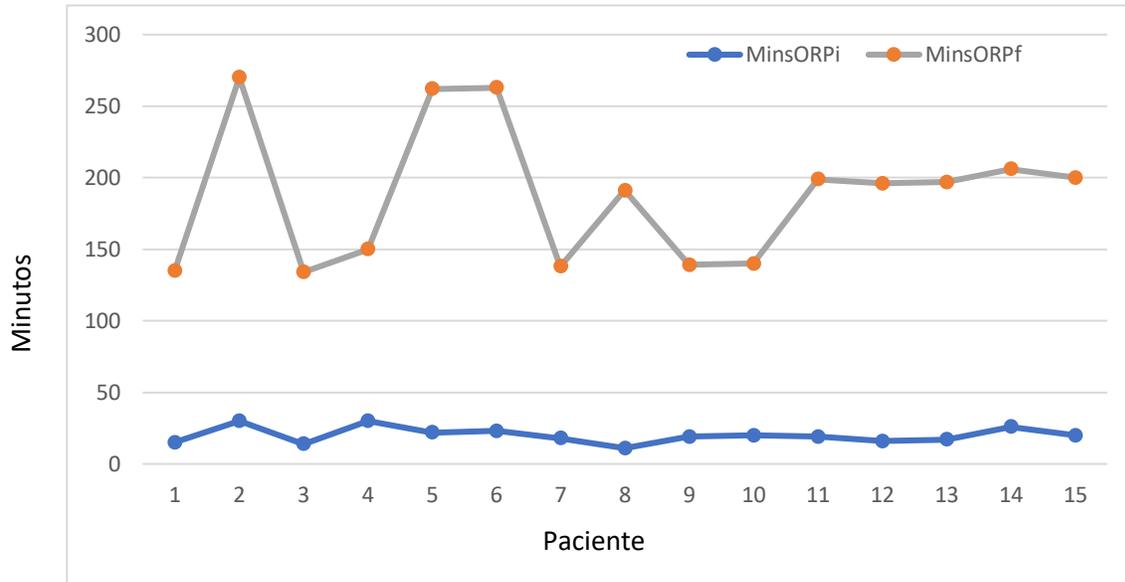


Figura 2.- Relación de tiempo en la medición del sORP.

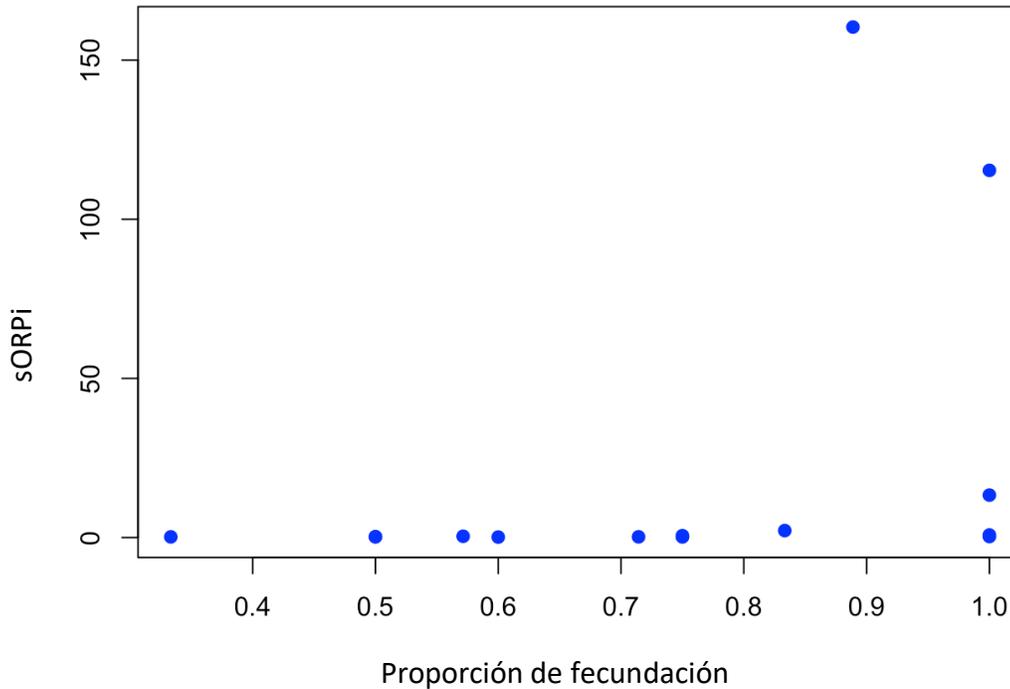
MinsORPi (minutos a la toma del Potencial de Oxidación-Reducción Estático inicial)

MinsORPf (minutos a la toma del Potencial de Oxidación-Reducción Estático final)

Para responder al objetivo general y estudiar si el nivel entre el valor de sORP inicial y final esta ligado con la tasa de fertilización se utilizó una correlación de Pearson con cada uno de los valores de sORP inicial y final.

La correlación entre el nivel de sORPi y la tasa de fecundación, no mostró una correlación significativa, con un valor de $p = 0.157$ y un intervalo de confianza al 95% (-0.15 a 0.74). Sin embargo, se presentaron dos valores extremos, los cuales se encuentran representados en la Figura 3.

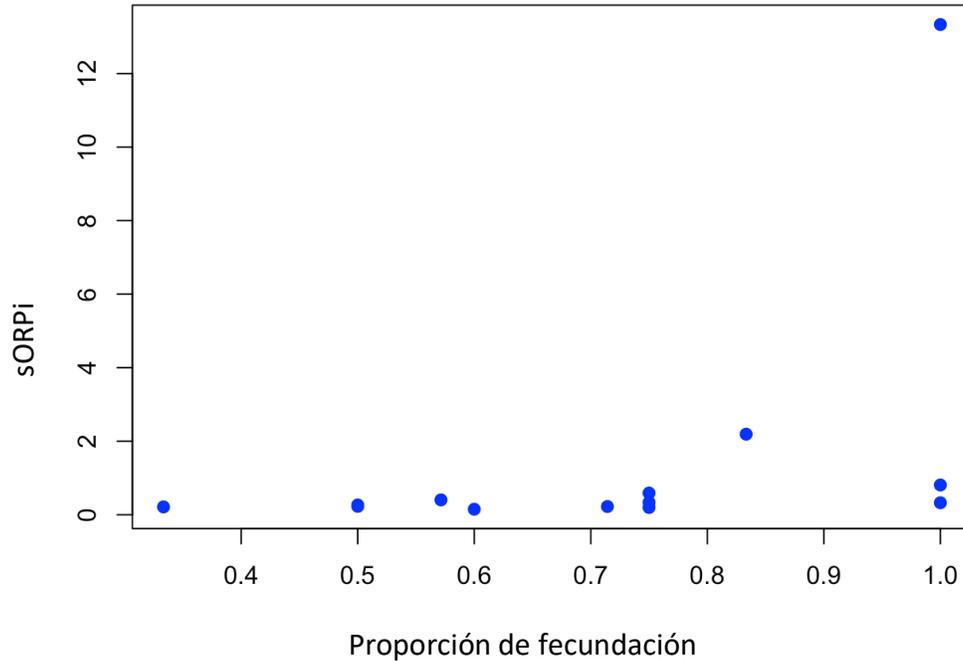
Figura 3.- Relación de sORPi con tasa de fertilización



Estos valores fueron condicionados por la concentración espermática, de pacientes con oligozoospermia severa, por lo que se realizó un análisis de sensibilidad, excluyendo estos valores extremos.

En la Figura 4 podemos observar el análisis de sensibilidad, sin embargo, aunque se observa una tendencia de a mayor nivel de sORPi, mayor tasa de fertilización, la correlación no llegó a ser significativa con $p=0.118$, IC al 95% (-0.12 a 0.8).

Figura 4.- Análisis de sensibilidad entre el nivel del sORPi y la tasa de fertilización



La correlación entre el nivel de sORPi y la tasa de fecundación, tampoco reflejó una correlación significativa, con un valor de $p=0.14$ y un intervalo de confianza al 95% (-0.14 a 0.75), de la misma forma se realizó un análisis de sensibilidad extrayendo los valores extremos, en la cual se observa aun más la independencia entre los valores, con un p mayor de $p= 0.46$, y un intervalo de confianza al 95% (-0.09 a 0.79). (Figuras 5 y 6)

Figura 5.- Relación de sORPf con tasa de fertilización.

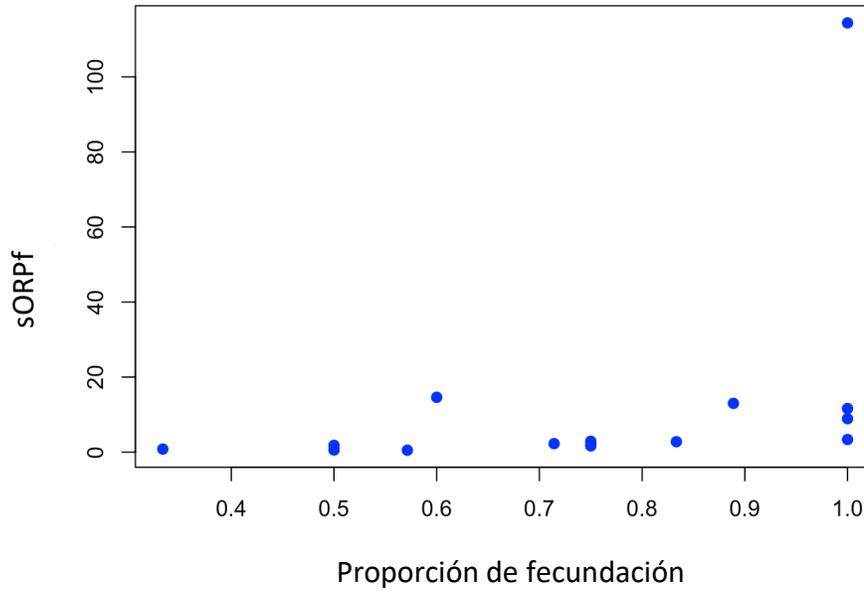
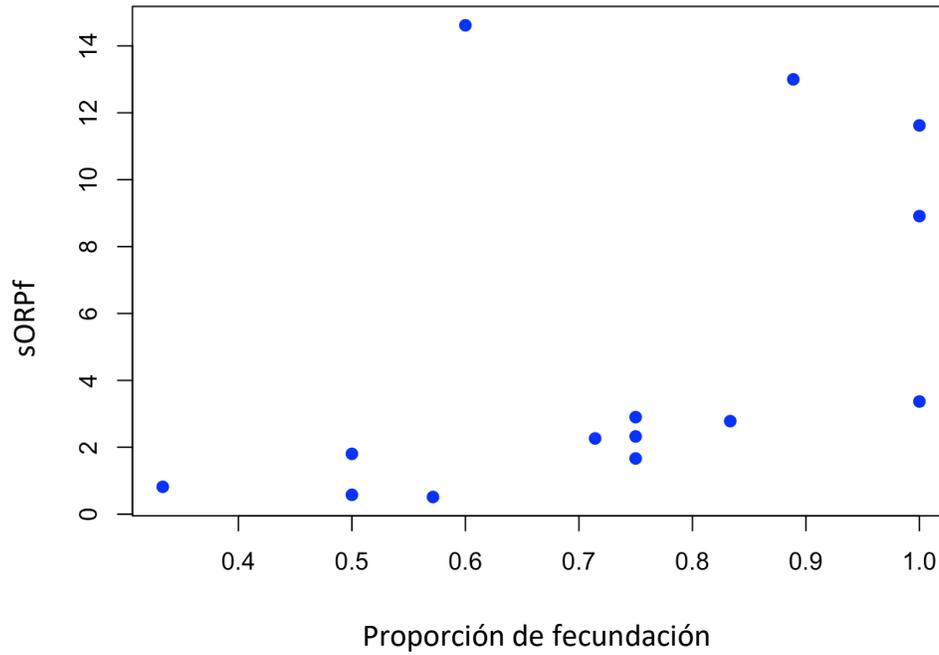
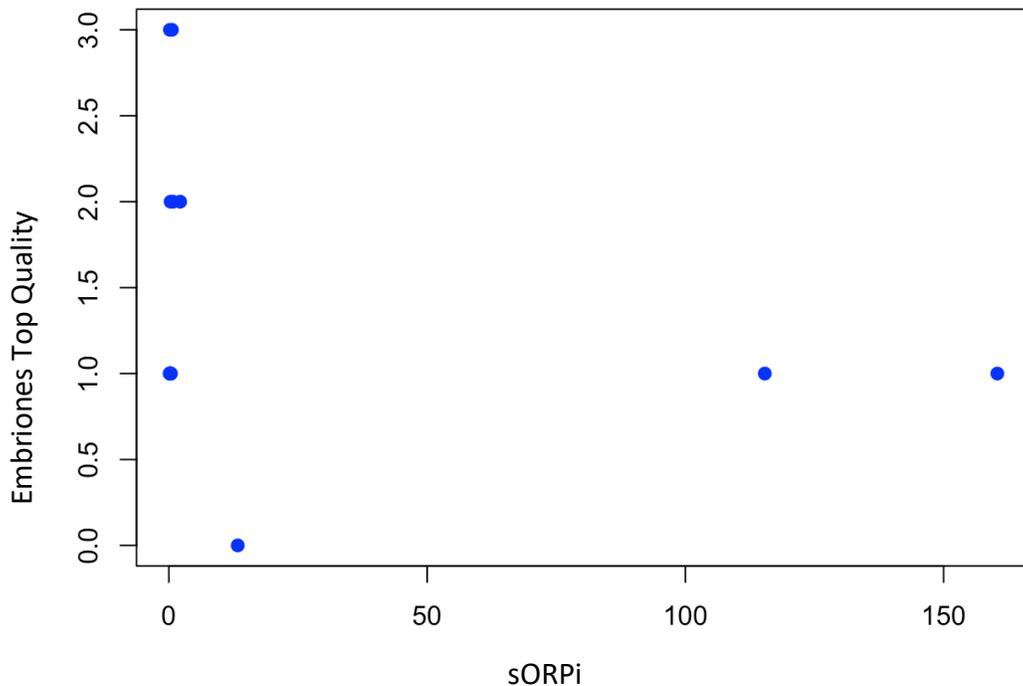


Figura 6.- Análisis de sensibilidad entre el nivel del sORPf y la tasa de fertilización



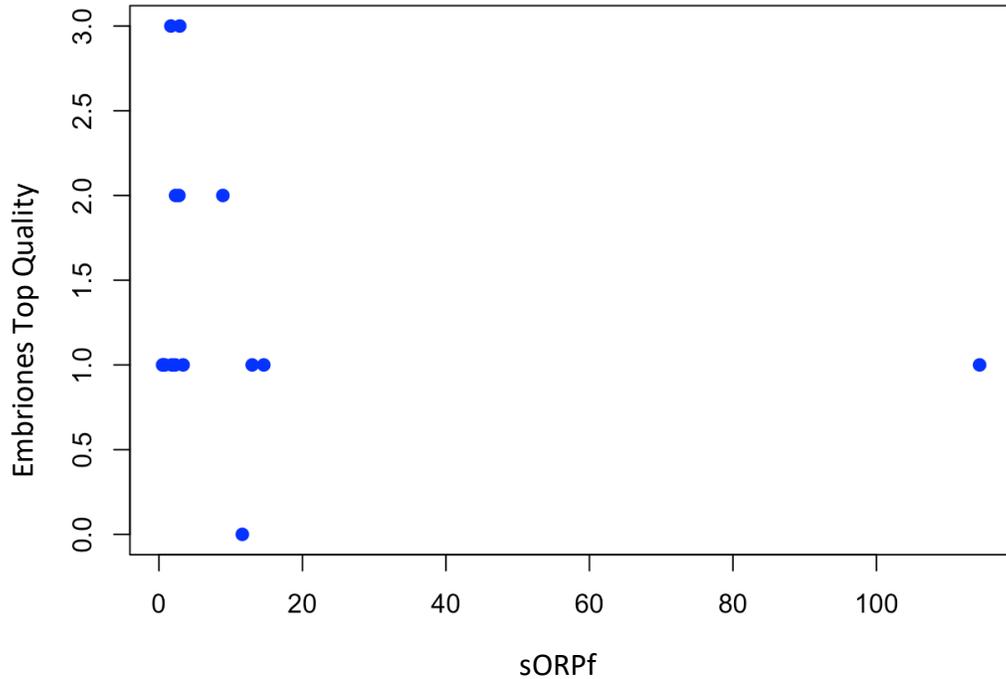
Continuando con los objetivos secundarios, se estudió el nivel entre el valor de sORP inicial y final con el número de embriones Top Quality desarrollados por cada paciente, en este caso se utilizó un coeficiente de correlación de Spearman por tratarse de variables ordinales, se obtuvo una $r = -0.6$, que indica que no existe una correlación lineal entre las variables, con una $p = 0.80$. (Figura 7).

Figura 7.- Relación de sORPi con número de embriones Top Quality



Del mismo modo, se estudió el nivel entre el valor de sORP final con el número de embriones Top Quality desarrollados por cada paciente, encontrando una $r = -0.13$, lo cual se interpreta como falta de relación lineal entre las variables, con una $p = 0.62$. (Figura 8)

Figura 8.- Relación de sORPf con número de embriones Top Quality



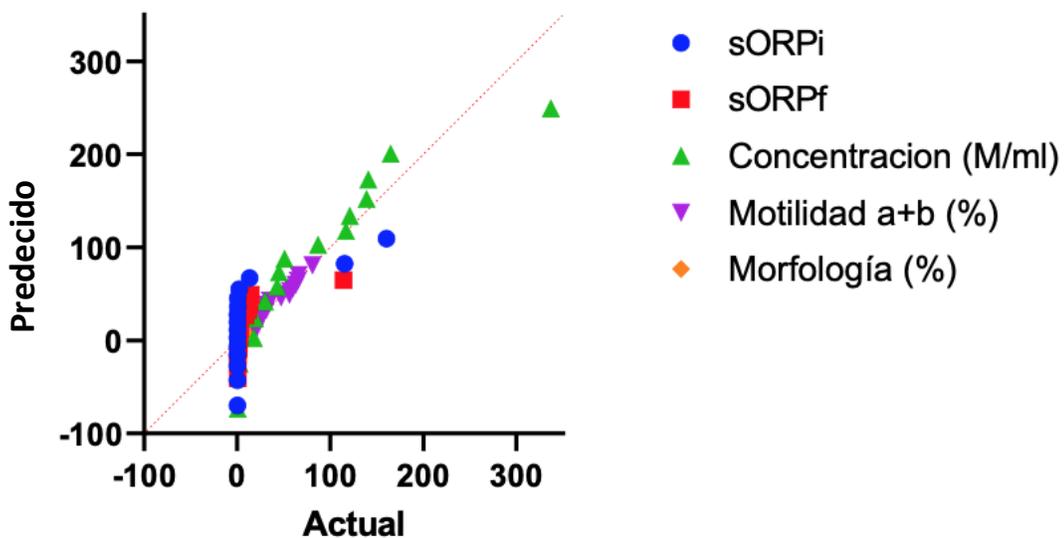
En cuanto a la relación del nivel de sORP con los parámetros espermáticos (concentración, motilidad y morfología) se realizó una correlación de Spearman, ya que, aunque los valores espermáticos registraron una distribución normal, los valores de sORP no, por lo que se recategorizaron a variables ordinales. Se obtuvo una correlación negativa significativa entre la concentración y motilidad espermática con el nivel del sORPi, (concentración $r = -0.61$ y una $p = 0.01$), (motilidad $r = -0.55$ y una $p = 0.03$), es decir que a mayor estrés oxidativo menor fue la concentración y motilidad espermática, no siendo así para morfología ($r = 0.05$, $p = 0.86$). (Tabla 3)

Tabla 3.- Comparación de los valores estadísticos en cada uno de los parámetros espermáticos

Parámetro	r-value	IC 95%	p-value
Concentración	-0.61	(-0.85 a -0.12)	0.01
Motilidad	-0.55	(-0.83 a -0.04)	0.03
Morfología	0.05	(-0.54 a 0.62)	0.86

En la Figura 9, se presenta un QQ plot en el que se observa que los datos de los parámetros espermáticos con la correlación de Spearman presentaron una distribución normal, además la prueba de Kolmogorov-Smirnov indicó normalidad de los datos. Por lo cual fue válido hacer comparaciones estadísticas.

Figura 9.- QQ plot de los parámetros espermáticos



CAPÍTULO IX

DISCUSIÓN

En los últimos años, el desbalance entre los radicales libres y la capacidad antioxidante del espermatozoide, se ha considerado una de las principales causas de infertilidad masculina idiopática.²² De hecho, se han propuesto como mecanismo fisiopatológico la alteración de 4 vías, la primera de ellas conformada por la capacitación espermática, donde la producción controlada de radicales libres aumenta la adenosina cíclica 3', 5'-monofosfato (cAMP), la cual activa enzimas y regula la expresión génica.²³ La segunda, la hiperactivación del espermatozoide. Makker y col. Demostraron que al incubar los espermatozoides a bajas concentraciones de iones hidroxilo, se produce la hiperactivación, lo cual se traduce a un mejor desplazamiento del espermatozoide.²⁴ La tercera, la reacción acrosómica, Bansal y col observaron su activación in vitro al agregar dosis fisiológicas de óxido nítrico,²⁵ y por último la unión óvulo-esperma, para llevar a cabo la fertilización, los radicales libres inhiben la actividad de la proteína tirosina fosfatasa y previene la desfosforilación y desactivación de la fosfolipasa A2 (PLA2), necesaria para aumentar la fluidez de la membrana²⁶.

Actualmente existe literatura que sustenta que el nivel de sORP se relaciona directamente con los parámetros espermáticos, ^{18 19} y sobre el daño en el ADN nuclear y mitocondrial que causa el estrés oxidativo con afectación del epigenoma, con un posible resultado en infertilidad, pérdida gestacional recurrente, pobres resultados de embarazo y un incremento en la carga de enfermedad de la descendencia ²⁷, sin embargo no se ha estudiado su relación directa.

Este estudio es el primero en correlacionar la tasa de fertilización y el desarrollo embrionario con el sORP. Iniciando con la tasa de fertilización, nuestra evidencia no muestra una relación clara, aunque desplegó una tendencia a la mayor tasa de fertilización con la mayor cantidad de sORP inicial, esta relación se acentuó en el análisis de sensibilidad cuando se eliminaron los valores extremos, mostrando una probabilidad aun más baja, sin llegar a ser significativa, lo que pudo verse afectado por el número de pacientes incluidos. Una posible explicación a ésta tendencia en una situación donde el nivel de sORP elevado representa una causa importante de infertilidad masculina, es que el nivel alto de sORP altera solo los mecanismos fisiopatológicos antes mencionados de capacitación, motilidad, reacción acrosómica y unión de gametos, los cuales se corrigen con las técnicas de reproducción asistida, resultando en una mayor tasa de fertilización.

La relación no persistió con la medición del sORP final, observando solo un incremento de los niveles de sORP respecto a los iniciales sin llegar a ser proporcionales. Esto sugiere que el desarrollo del proceso de oxidación aumenta

durante la incubación en condiciones donde el espermatozoide no cuenta con los antioxidantes naturales presentes en el plasma seminal e incluso el mismo proceso de centrifugación es causa conocida de estrés oxidativo y consecuentemente de daño celular ²⁸, lo que nos demuestra cuán susceptibles son las gametos a ser afectadas por la producción endógena de radicales libres y mecanismos externos. No obstante, estos niveles no mostraron ninguna tendencia con la tasa de fertilización, incluso realizando el análisis de sensibilidad.

En el presente trabajo no fue posible realizar una predicción del desarrollo embrionario y concepción (prueba de embarazo positiva) basado en el nivel de sORP del semen al momento de la eyaculación (sORPi) o al momento de la TRA (sORPf). Similarmente, con el objetivo de determinar la relación entre los niveles de EOR con la condición del cigoto, la calidad embrionaria y la tasa de embarazo clínico de pacientes sometidos a FIV o ICSI, Lan y cols en 2019, midieron los niveles de EOR a los días 1, 3, y 5 del medio de cultivo de embriones mediante un ensayo de quimioluminiscencia con luminol. Sin embargo, no se encontró una asociación significativa de los niveles de EOR del medio de cultivo con la calidad embrionaria, formación del blastocisto o su viabilidad (arresto), tampoco con la probabilidad de concepción. Los niveles de EOR en el día 1 fueron similares en cigotos fertilizados normalmente, ovocitos sin fertilizar, y cigotos poliespérmicos, y no se asociaron con un desarrollo embrionario retardado, alta fragmentación, formación de blastocistos o arresto. ²⁹ En contraste con el estudio de Lan y cols. donde se evaluaron 101 pacientes sometidos a FIV y 60 sometidos a ICSI, prevemos que el incremento en el número de muestras en nuestro estudio (n=15) podría incrementar el poder

estadístico y permitirnos realizar asociaciones o inferencias con respecto a la calidad embrionaria o la tasa de embarazo basados en los valores de sORP del semen.

Respecto a los parámetros del seminograma, se encontró una relación significativa entre la concentración y motilidad espermática con los niveles de sORP inicial. A mayor nivel de estrés oxidativo menor concentración y motilidad, lo que confirma los hallazgos de estudios previos realizados. Tal es el caso de Arafa y col. que lograron diferenciar muestras de semen anormales de las normales, en base al nivel del sORP ¹⁹ y de Agarwal y col. quienes además lograron diferenciar grupos de semen fértiles de infértiles.¹⁸ En cuanto a la morfología no se encontró relación con el estrés oxidativo.

El cambio en la motilidad espermática ligado al nivel del sORP refuerza la teoría previamente descrita sobre como el estrés oxidativo afecta al espermatozoide desde su proceso de capacitación, y no permite la hiperactivación. Se sabe que las principales fuentes de estrés oxidativo en el eyaculado con leucocitos seminales y espermatozoides anormales, especialmente los que presentan gotas citoplasmáticas, ³⁰ por lo que se esperaba que los niveles de sORP inicial se correlacionaran inversamente con la morfología de las muestra, sin embargo nuestros resultados no lo evidenciaron.

Nuestro estudio cuenta con una limitante muy importante que es el número de pacientes incluidos, el poder estadístico se calculó con 15 pacientes, sin

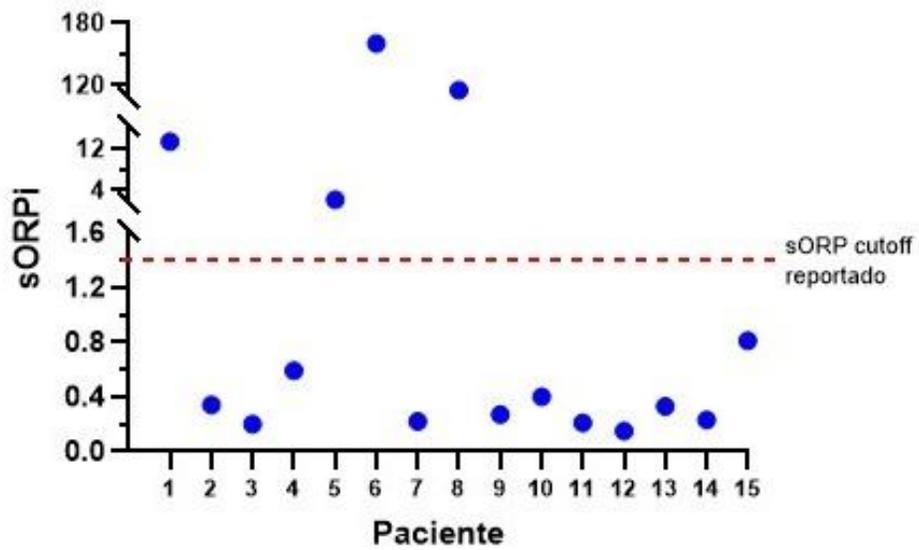
embargo, al analizar los resultados, creemos que al incrementar la muestra, nuestras deducciones pudieran adquirir significancia estadística. Otro aspecto a considerar es que, al tomar el factor ovárico como criterio de exclusión, la mayoría de pacientes presentaban un espermograma alterado, por lo que no fue posible conformar grupos de seminogramas normales para compararlos con los anormales, y estudiar si existía alguna diferencia entre los niveles de sORP. Una tercera limitante fue el tiempo transcurrido entre la recolección de la muestra y la medición del sORP final, ya que existió diferencia de hasta 2 horas entre las tomas, esto dependió del momento en que se llevó a cabo la inyección intracitoplasmática o la FIV, por lo que pudo haber sido un sesgo importante que incrementara el nivel de estrés oxidativo en ciertas muestras. Por otro lado, 3 muestras presentaron valores extremos de sORP en 2 se reportó un valor "Hi" y en 1 "Low" por el sistema MiOXSYS, por lo que se tomó como referencia el valor mínimo -1 y máximo + 1 detectado por el sistema para registrarlos en la base de datos, condición que puede limitar su interpretación en el análisis estadístico. Por último, entre las causas que pueden influir en el estrés oxidativo se encuentran el consumo de alcohol, tabaquismo, varicocele, obesidad, diabetes, infecciones, ejercicio físico, estrés psicológico, la edad y factores ambientales ³⁰, sin embargo en nuestro estudio no se logró realizar un sub-análisis de factores que pudieran influenciar los niveles de sORP como el tabaco, enfermedades crónicas, IMC debido al número pequeño de muestras con las variables deaseadas a analizar.

Las fortalezas de este estudio son, primero, su naturaleza prospectiva, segundo, que es el primero que relaciona el sORP al momento de la inyección

intracitoplasmática o FIV, con la tasa de fertilización y desarrollo embrionario, aunque no encontramos una dependencia entre las variables, la distribución de los valores marca una tendencia, por lo que la perspectiva de este trabajo será aumentar el número de pacientes incluidos para incrementar el poder estadístico de este análisis. Y tercero, los criterios de inclusión y exclusión fueron muy estrictos, se eliminó todo factor ovárico conocido, para tratar de no sumar otra causa que pudiera influir sobre el nivel de estrés oxidativo y poder relacionar los resultados directamente al factor masculino.

En relación al sistema MiOXSYS, los autores Agarwal y col. junto con Arafa y col. establecieron un valor de corte de ORP de $1.42 \text{ mV} / 10^6 \text{ ml}$ y $1.41 \text{ mV} / 10^6$ respectivamente para diferenciar grupos de semen fértiles de infértiles.^{18 19} si tomamos estos valores como referencia y los comparamos con nuestra base de datos, lo esperado sería encontrar el 26.6% de los espermogramas alterados, sin embargo el 40% de las muestras presentaban alteración en alguno de los parámetros. (Figura 10) Por tanto, los hallazgos previos deberán ser tomados con cautela.

Figura 10.- Comparación de sORPi con el valor corte de sORP reportado



CAPÍTULO X

CONCLUSIÓN

Aunque hoy en día existe evidencia de que el nivel de sORP se relaciona con la calidad espermática y se infiere su concomitancia con el proceso de fertilización, no se encontró una relación significativa, entre la producción de radicales libres y la capacidad antioxidante celular en espermatozoides, medida a través de los niveles de sORP inicial y final con las tasas de fertilización en FIV e ICSI. Sin embargo, existe una tendencia de que a mayor sORP inicial, mayor tasa de fertilización. Sobre el grado de desarrollo embrionario, este pareciera ser una variable independiente del nivel de sORP.

Acerca de los parámetros espermáticos, se corroboró la relación del sORP inicial con la concentración y motilidad espermática. No se encontró relación con la morfología.

Finalmente, debido a la evidencia limitada, aun no es posible asegurar la relación del sORP con la tasa de fertilización, sin embargo, probablemente juegue

un papel importante y son necesarios más estudios prospectivos, controlados y con poblaciones más grandes para establecer si el estrés oxidativo influye en las tasas de fertilización.

CAPÍTULO XI

REFERENCIAS

- (1) Edition, F. Examination and Processing of Human Semen. *World Health* **2010**. <https://doi.org/10.1038/aja.2008.57>.
- (2) Strauss, J. F.; Barbieri, R. L.; Gargiulo, A. R. *Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management: Eighth Edition*; 2018. <https://doi.org/10.1576/toag.8.3.201.27262>.
- (3) Littarru, G. P.; Bruge, F.; Tiano, L. *Antioxidants in Andrology*, Jul-Sep;48.; Publisher Name Springer, Cham, 2017.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-319-41749-3>.
- (4) Vander Borgh, M.; Wyns, C. Fertility and Infertility: Definition and Epidemiology. *Clinical Biochemistry*. 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012>.
- (5) Agarwal, A.; Mulgund, A.; Hamada, A.; Chyatte, M. R. A Unique View on Male Infertility around the Globe. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2015**.
<https://doi.org/10.1186/s12958-015-0032-1>.

- (6) WHO. Infertility <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/infertility>. (accessed Nov 26, 2020).
- (7) Betteridge, D. J. What Is Oxidative Stress? In *Metabolism: Clinical and Experimental*; 2000. [https://doi.org/10.1016/S0026-0495\(00\)80077-3](https://doi.org/10.1016/S0026-0495(00)80077-3).
- (8) Kumar, N.; Singh, A. K. Reactive Oxygen Species in Seminal Plasma as a Cause of Male Infertility. *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction*. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jogoh.2018.06.008>.
- (9) Krumova, K.; Cosa, G. Chapter 1. Overview of Reactive Oxygen Species; 2016. <https://doi.org/10.1039/9781782622208-00001>.
- (10) Henkel, R.; Samanta, L.; Agarwal, A. *Oxidants, Antioxidants and Impact of the Oxidative Status in Male Reproduction*; 2018. <https://doi.org/10.1016/C2016-0-03860-3>.
- (11) Alfadda, A. A.; Sallam, R. M. Reactive Oxygen Species in Health and Disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/936486>.
- (12) Dandekar, S. P.; Nadkarni, G. D.; Kulkarni, V. S.; Puneekar, S. Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzymes in Male Infertility. *J. Postgrad. Med.* **2002**. Jul-Sep; 48 (3): 186-89, discussion 189-90. PMID: 12432192
- (13) Moustafa, M.; Sharma, R. K.; Thornton, J.; Mascha, E.; Abdel-Hafez, M. A.; Thomas, A. J.; Agarwal, A. Relationship between ROS Production, Apoptosis and DNA Denaturation in Spermatozoa from Patients Examined for Infertility. *Hum. Reprod.* **2004**. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh024>.
- (14) Agarwal, A.; Sharma, R. K.; Nallella, K. P.; Thomas, A. J.; Alvarez, J. G.; Sikka, S. C. Reactive Oxygen Species as an Independent Marker of Male

Factor Infertility. *Fertil. Steril.* **2006**.

<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.02.111>.

- (15) Kadioglu, A.; Ortac, M. The Role of Sperm DNA Testing on Male Infertility. *Translational Andrology and Urology*. 2017.
<https://doi.org/10.21037/tau.2017.03.82>.
- (16) Aitken, R. J.; Gordon, E.; Harkiss, D.; Twigg, J. P.; Milne, P.; Jennings, Z.; Irvine, D. S. Relative Impact of Oxidative Stress on the Functional Competence and Genomic Integrity of Human Spermatozoa. *Biol. Reprod.* **1998**. <https://doi.org/10.1095/biolreprod59.5.1037>.
- (17) Zini, A.; Defreitas, G.; Freeman, M.; Hechter, S.; Jarvi, K. Varicocele Is Associated with Abnormal Retention of Cytoplasmic Droplets by Human Spermatozoa. *Fertil. Steril.* **2000**. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(00\)00703-2](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(00)00703-2).
- (18) Agarwal, A.; Arafa, M.; Chandrakumar, R.; Majzoub, A.; AlSaid, S.; Elbardisi, H. A Multicenter Study to Evaluate Oxidative Stress by Oxidation–Reduction Potential, a Reliable and Reproducible Method. *Andrology* **2017**.
<https://doi.org/10.1111/andr.12395>.
- (19) Arafa, M.; Agarwal, A.; Al Said, S.; Majzoub, A.; Sharma, R.; Bjugstad, K. B.; AlRumaihi, K.; Elbardisi, H. Semen Quality and Infertility Status Can Be Identified through Measures of Oxidation–Reduction Potential. *Andrologia* **2018**. <https://doi.org/10.1111/and.12881>.
- (20) AytuBioscience. MioXSYS, The male infertility oxidative system
<https://mioxsys.com/>.
- (21) WHO, W. H. O. Laboratory Manual for the Examination and Processing of

Human Semen, 2010. Fifth edition, ISBN 978 92 4 154778 9

- (22) Agarwal, A.; Virk, G.; Ong, C.; du Plessis, S. S. Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. *World J. Mens. Health* **2014**.
<https://doi.org/10.5534/wjmh.2014.32.1.1>.
- (23) Tsai, W. W.; Niessen, S.; Goebel, N.; Yates, J. R.; Guccione, E.; Montminy, M. PRMT5 Modulates the Metabolic Response to Fasting Signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**. <https://doi.org/10.1073/pnas.1304602110>.
- (24) Makker, K.; Agarwal, A.; Sharma, R. Oxidative Stress & Male Infertility. *Indian Journal of Medical Research.* 2009 Apr;129(4):357-67.
PMID:19535829.
- (25) Bansal, A. K.; Bilaspuri, G. S. Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. *Veterinary Medicine International.* 2011.
<https://doi.org/10.4061/2011/686137>.
- (26) Calamera, J.; Buffone, M.; Ollero, M.; Alvarez, J.; Doncel, G. F. Superoxide Dismutase Content and Fatty Acid Composition in Subsets of Human Spermatozoa from Normozoospermic, Asthenozoospermic, and Polyzoospermic Semen Samples. *Mol. Reprod. Dev.* **2003**.
<https://doi.org/10.1002/mrd.10368>.
- (27) Bisht, S.; Faiq, M.; Tolahunase, M.; Dada, R. Oxidative Stress and Male Infertility. *Nature Reviews Urology.* 2017.
<https://doi.org/10.1038/nrurol.2017.69>.
- (28) Marzano, G.; Chiriaco, M. S.; Primiceri, E.; Dell'Aquila, M. E.; Ramalho-Santos, J.; Zara, V.; Ferramosca, A.; Maruccio, G. Sperm Selection in Assisted Reproduction: A Review of Established Methods and Cutting-Edge

Possibilities. *Biotechnology Advances*. 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107498>.

- (29) Lan, K. C.; Lin, Y. C.; Chang, Y. C.; Lin, H. J.; Tsai, Y. R.; Kang, H. Y.
Limited Relationships between Reactive Oxygen Species Levels in Culture
Media and Zygote and Embryo Development. *J. Assist. Reprod. Genet.*
2019. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1363-6>.
- (30) Sabeti, P.; Pourmasumi, S.; Rahiminia, T.; Akyash, F.; Talebi, A. R.
Etiologies of Sperm Oxidative Stress. *International Journal of Reproductive
BioMedicine*. 2016. <https://doi.org/10.29252/ijrm.14.4.231>.

CAPÍTULO XII

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Cristina Aidé Ramírez Colunga

Candidato para el grado de Subespecialista en Biología de la
Reproducción

Tesis: Sistema MiOXSYS y medición de capacidad antioxidante de los
espermatozoides.

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Biografía:

Datos Personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León, el 25 de diciembre de 1989, hija de Blanca Alicia Ramírez Colunga.

Educación: En julio 2012 finalizó la licenciatura de Médico Cirujano y Partero en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. En febrero de 2019 obtuvo la especialización en Ginecología y Obstetricia, en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la UANL.

Experiencia Profesional: Residente de segundo año (2-2) de la Subespecialidad de Biología de la Reproducción en el Centro Universitario de Medicina Reproductiva de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

CAPÍTULO XIII

ANEXOS

Carta de Aceptación del comité de ética



DR. FELIPE ARTURO MORALES MARTÍNEZ.

Investigador principal
Departamento de Ginecología y Obstetricia
Presente.-

Estimado Dr. Morales Martínez:

Les informo que nuestro **Comité de Ética en Investigación** del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González", ha **evaluado y aprobado** el proyecto de investigación titulado: **"MiOXSYS y medición de capacidad antioxidante de los espermatozoides"**, participando además el Dr. Luis Humberto Sordia Hernández, MC Martha Merino Ruiz, Dra. Cristina Aide Ramirez Colunga, Est. Ana Paula Rábago Jamaica y la Dra. Selene Marysol Garcia Luna como Co-Investigadores.

De igual forma los siguientes documentos.

- Protocolo escrito en extenso, versión 2 de fecha marzo 2020.
- Formato de Consentimiento Informado, versión 1.0 de fecha Febrero 2020.

Le reitero que es su obligación presentar a este Comité de Ética en Investigación un informe técnico parcial a más tardar el día en que se cumpla el año de emisión de este oficio, así como notificar la conclusión del estudio. Este protocolo quedo registrado en esta Subdirección con la clave **G120-00005**.

Será nuestra obligación realizar visitas de seguimiento a su sitio de investigación para que todo lo anterior esté debidamente consignado, en caso de no apegarse, este Comité tiene la autoridad de suspender temporal o definitivamente la investigación en curso, todo esto con la finalidad de resguardar el beneficio y seguridad de todo el personal y sujetos en investigación.

Atentamente,
"Alere Flammam Veritatis"
Monterrey N L., 28 de Mayo de 2020



COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

DR. med. JOSÉ GERARDO GARZA LEAL
Presidente del Comité de Ética en Investigación

Comité de Ética en Investigación

Av. Francisco I. Madero y Av. Gonzalitos s/n. Col. Mitras Centro. C.P. 64460. Monterrey N.L. México
Teléfonos 81 8329 4050 Ext. 2870 a 2874 Correo Electrónico: investigacionclinica@meduani.com



CAPÍTULO XIV

ABSTRACT

Male infertility, defined as the alteration of at least one of the spermogram parameters established by the World Health Organization (WHO) [1], occupies up to 50% of the recognizable causes of infertility. [2] Advances in the field have managed to identify environmental, physiological and genetic influences at the molecular level, which generate oxidative stress resulting from the imbalance between oxidants and reducers that is harmful to the sperm. [3] The MiOXSYS system has emerged as an alternative to quantify oxidative stress, which consists of an analysis of semen using an electrode that monitors the oxidation-reduction potential (sORP) in human semen with high specificity. Which allows to relate oxidative stress with sperm quality, as well as with fertilization rates or embryonic development.

Objective: Correlate the levels of free radical production and the cellular antioxidant capacity in spermatozoa with the rates of fertilization and embryonic development in In Vitro Fertilization (IVF) and Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) cycles.

Material and Methods: A prospective and comparative study was carried out. At “Dr. José E. González ” hospital with patients undergoing a highly complex procedure such as IVF or ICSI. SORP was measured at the time of semen liquefaction and at the time of IVF / ICSI and was correlated with sperm parameters, fertilization rate, and embryonic development.

Results: No significant relationship was found between the oxidation-reduction potential (sORP) in human semen with the fertilization rate, nor the degree of embryonic development. However, the negative relationship between concentration and motility was corroborated, not being the case for the morphology of the spermograms performed.

Conclusions: The oxidative stress of sperm, measured as the oxidation-reduction potential by the MiOXSYS system, is not related to fertilization rates or embryonic development in assisted reproductive techniques. Therefore, it is not possible to define a cut-off value as an infertility parameter. A relationship between high sORP level and low sperm count and motility was observed.

Key words: Oxidative stress, MiOXSYS, male infertility, embryonic development, fertilization.