## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN FACULTAD DE MEDICINA



# IMPACTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL LÍQUIDO FOLICULAR SOBRE LA MADUREZ OVOCITARIA Y TASA DE IMPLANTACIÓN EN PACIENTES SOMETIDAS A FIV

Por:

Dr. Juan Enrique Ferez Paz

Como requisito para obtener el Grado de

SUBESPECIALISTA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN HUMANA

FEBRERO 2021

# IMPACTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL LÍQUIDO FOLICULAR SOBRE LA MADUREZ OVOCITARIA Y TASA DE IMPLANTACIÓN EN PACIENTES SOMETIDAS A FIV

Aprobación de la tesis:

Dr. Otto Hugo Valdes Martínez

Director de Tesis

Dr. Lezmes Dionicio Valdéz Chapa

Jefe de Enseñanza

del Departamento de Ginecología y Obstetricia

Dra. Sci. Geraldina Guerrero González

Coordinadora de Investigación

del Departamento de Ginecología y Obstetricia

Dr. med. Donato Saldívar Rodríguez

Jefe del Departamento de Ginecología y Obstetricia

Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez

Subdirector de Estudios de Posgrado

### **DEDICATORIA Y/O AGRADECIMIENTOS**

Dedico este trabajo primeramente a Dios, por permitirme llegar hasta este momento tan especial de mi vida. A mi esposa Lineth, por su apoyo incondicional en este difícil camino, por tu amor y comprensión. A mis hijos, quienes son la motivación de seguir este camino tan difícil. A mis padres y hermanas, sin el apoyo de ellos nada de esto hubiera sido posible. A mi director de tesis Dr. Otto Valdes por su orientación y disposición. A mis maestros por su continua enseñanza, Dr. Arturo Morales, Dr. Luis Sordia, Dr. Enrique González, Dr. Manuel García, Dra. Juanita Vázquez, Dra. Sara Peña, Maestra Martha Merino. A Selene García por tu ayuda especial en este trabajo. A la Lic. Antonia García, Lic. Margarita Mares y Ofelia por sus enseñanzas diarias. A las embriólogas Lilith Villareal y Nora Naranjos por su dedicación y ayuda en el seguimiento de las muestras.

Ha sido un tiempo muy especial lleno de aprendizaje.

Gracias a todos.

### **TABLA DE CONTENIDOS**

CAPÍTULO	PÁGINA
Capítulo I	
RESUMEN	1
Capítulo II	
INTRODUCCIÓN	3
Capítulo III	
HIPOTESIS	20
Capítulo IV	
OBJETIVOS	21
Capítulo V	
MATERIAL Y MÉTODOS	22
Capítulo VI	
RESULTADOS	30
Capítulo VII	
DISCUSIÓN	35

# Capítulo VIII CONCLUSIONES 38 Capítulo IX ANEXOS 39 Capítulo X BIBLIOGRAFIA 41 Capítulo XI RESUMEN AUTOBIOGRAFICO 46 Capítulo XII ABSTRACT 47

### **INDICE DE TABLAS Y GRAFICOS**

TABLA	PAGINA
Tabla 1 Descripción de participantes	30
Tabla 2 Regresión logística de de embarazo y sORP	33
Tabla 3 Regresión logística de de embarazo y sORP, ajustada	34
por la edad de las pacientes	
Tabla 4 Regresión logistica de de embarazo y sORP, ajustada	34
por la edad y factor de infertilidad de las pacientes	

FIGURA	PAGINA
Figura 1 Valores de sORP por factor de infertilidad	31
Figura 2 Valores de sORP por resultado de embarazo	32

### LISTA DE ABREVIATURAS

ADN Acido Desoxirribonucleico AMH Hormona antimulleriana

ßhCG Hormona gonadotropina corionica

humana, subunidad ß

BMP-15 Proteína morfogenética ósea 15

Ca<sup>2+</sup> Calcio

cAMP Adenosin Monofosfato Ciclico

CAT Catalasa

CeUMER Centro Universitario de Medicina

Reproductiva

E2 Estradiol

EOC Estimulación ovarica controlada ERO Especies reactivas de oxigeno ERN Especies reactivas de nitrogeno

FIV Fertilización in vitro

FSH Hormona foliculo estimulante

GH Hormona de crecimiento GnRH Hormona liberadora de

gonadotropina

GPx Glutation peroxidasa

GSH Glutation

GST Glutation s-transferasa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Peróxido de hidrógeno

ICSI Inyeccion intracitoplasmatica de

espermatozoide

LF Líquido folicular

LH Hormona luteinizante

O<sub>2</sub> Oxigeno

OS Estrés oxidativo
P Progesterona
PG Prostaglandina
PONS Paraoxonasas
PRL Prolactina

sORP Potencial de oxido-reducción

estática

SOD Superoxido dismutasa

TRA Técnica de reproducción asistida

### **CAPÍTULO I**

### **RESUMEN**

### Introducción

El líquido folicular (LF) proporciona un microambiente muy importante para el desarrollo de los ovocitos. En los seres vivos se producen durante el metabolismo fisiológico, reacciones bioquímicas con producción de radicales libres. Al conjunto de radicales libres que tienen la capacidad de producir daño oxidativo, poniendo en riesgo la integridad celular, se les denomina Especies Reactivas del Oxígeno (ERO). Numerosos estudios en humanos han demostrado que el aumento de la generación de ERO pueden estar involucrados en defectos de nacimiento y otras situaciones como los abortos. Además, también hay evidencia del papel de las ERO en la fisiopatología de la infertilidad y su impacto en la fertilidad asistida, pero los datos existentes son contradictorios.

### Objetivo

Investigar el impacto del estrés oxidativo del líquido folicular con respecto a los resultados reproductivos de pacientes sometidas a FIV.

### Materiales y métodos:

Se realizó un estudio prospectivo, no aleatorizado en el que se incluyeron mujeres con diagnóstico de infertilidad primaria o secundaria que acudieron al Centro Universitario de Medicina Reproductiva (CeUMER) del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" de la Universidad Autónoma de Nuevo Leon (UANL). Se incluyeron mujeres que ingresaron al programa de FIV/ICSI, que tuvieran entre 18 y 42 años. Para comparar entre los grupos de pacientes se empleó la prueba de Kolmogorov-Smirnov y se consideró como estadísticamente significativo un valor de p<0.05.

Aspectos éticos

El presente estudio fue aprobado por el comité de ética en investigación de la

Universidad Autónoma de Nuevo León, con la clave de registro Gl20-00014.

Resultados

En este estudio se incluyeron 15 pacientes. La edad promedio de las

participantes fue de 34.6 ± 5.1 años. El valor promedio del sORP fue de 151.2 ±

45.6 mV con un rango intercuartil de 124.9-161.5. De las 15 pacientes, se

realizó la transferencia embrionaria a 13 de ellas, obteniendo en 9 de ellas

resultados de prueba de embarazo positivos (ßhCG+) y 4 negativos (ßhCG-).

Sin embargo, no se encontró diferencia estadística (p=0.61) en los valores de

sORP con respecto a los resultados de la prueba de embarazo.

Conclusiones

No se encontraron diferencias estadísticas en cuanto a el factor de infertilidad y

tasas de embarazo de pacientes sometidas a una técnica de reproducción

asistida de alta complejidad. Los valores de sORP del líquido folicular tuvieron

un rango de 124.9-161.5 mV.

Palabras clave: Estrés oxidativo, liquido folicular, Mioxsys, sORP, ßhCG

2

### **CAPÍTULO II**

### INTRODUCCIÓN

### LÍQUIDO FOLICULAR Y SUS COMPONENTES

El líquido folicular (LF) proporciona un microambiente muy importante para el desarrollo de los ovocitos. El LF es producto de la transferencia de constituyentes del plasma sanguíneo que atraviesan la barrera folicular sanguínea y de la actividad secretora de las células de la granulosa y tecales (1). Por lo que las características bioquímicas del LF que rodea al ovocito pueden jugar un papel crítico en la determinación de la calidad ovocitaria y su potencial para lograr la fertilización, el desarrollo embrionario y su implantación. El análisis de los componentes del LF también puede proporcionar información sobre los cambios metabólicos en el suero sanguíneo, ya que el medio bioquímico circulante puede reflejarse en la composición del LF (2).

### AMINOÁCIDOS, PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS

En humanos, se encontró que las concentraciones de ácido D-aspártico en el LF se correlacionaron directamente con el porcentaje de buena morfología, ovocitos maduros (MII) y la tasa de fertilización (3).

El estudio de los componentes proteicos en LF se ha realizado detectando proteínas específicas y correlacionándolas con la calidad de los ovocitos. En los

últimos años se han introducido técnicas moleculares más complejas, como la proteómica que ha permitido el estudio simultáneo de decenas de proteínas y péptidos en un fluido biológico.

El principal problema en el análisis proteómico de fluidos biológicos complejos es que su composición de proteínas es muy complicada y dinámica; como consecuencia, se necesitan técnicas de separación de proteínas sensibles y de alta resolución. El enfoque más popular de la proteómica de LF se basa actualmente en la electroforesis en gel bidimensional seguida de la digestión de proteínas y la espectrometría de masas (4). Recientemente, se han propuesto y aplicado al estudio de las proteínas del LF, técnicas más sencillas basadas en el fraccionamiento previo de proteínas mediante isoelectroenfoque y la posterior cromatografía de nano líquidos y espectrometría de masas (5). Sin embargo, en general, el conocimiento general sobre las proteínas y su papel en el crecimiento folicular y la maduración de los ovocitos es todavía bastante limitado.

### **HORMONAS**

Gonadotropinas: Las concentraciones intrafoliculares de FSH y LH se ven afectadas por sus niveles circulantes. En los ciclos de FIV, los niveles séricos están determinados por la cantidad de gonadotropinas administradas exógenamente y por el grado de supresión hipofisaria (reduciendo de manera relevante la secreción de gonadotropinas endógenas). Se ha informado que

altas concentraciones de FSH (6), hCG (7) y LH (8) promueven la maduración de los ovocitos y se asocian con la alta probabilidad de fertilización. Estos hallazgos se confirman mediante estudios de inmunohistoquímica que tiñeron las células de la granulosa para hCG: los ovocitos que posteriormente fertilizaron tenían, de hecho, significativamente más células de la granulosa inmunounidas a hCG que los ovocitos no fertilizables (9). Se observó que, en el LF, la LH era consistentemente más alta en folículos que contenían ovocitos, lo que resultó en embriones que condujeron a intentos exitosos de FIV (10). Parece que las gonadotropinas juegan un papel importante en la secreción de varias sustancias por las células de la granulosa (p. Ej., Ácido hialurónico), lo que a su vez afecta el desarrollo y la maduración de los ovocitos. También pueden actuar sinérgicamente con el estradiol (E2) para mejorar la maduración citoplasmática del óvulo y, a través de la secreción de AMP cíclico (cAMP), controlar la meiosis de los ovocitos: niveles más altos de gonadotropinas mejorarían estos procesos y conducirían a mejores ovocitos, embriones y embarazo. En particular, la hormona de crecimiento (GH) parece desempeñar un papel similar (y puede ser sinérgico con las gonadotropinas) (10).

Hormona de crecimiento (GH): Se sabe que la GH mejora la producción de E2 dependiente de FSH por las células de la granulosa (11), así como la formación de receptores de FSH y LH en estas células (12). La síntesis de GH también ocurre en el folículo (13), por lo que la GH podría actuar sinérgicamente con las

gonadotropinas aumentando la "estrogenicidad" del microambiente del folículo, lo que a su vez conduce a mejores ovocitos.

Prolactina (PRL): Se informó que el contenido de PRL era más alto y el cAMP más bajo en el LF de los ovocitos fertilizados en comparación con los huevos no fertilizados (14). En algunos estudios se observó una relación entre los niveles altos de PRL (15) y bajos de cAMP en el LF, la fertilización y el embarazo exitoso, pero otros no lo confirmaron. Por lo tanto, en la actualidad la PRL del LF no se considera un marcador confiable de la calidad de los ovocitos.

Estrógenos, progesterona (P) y andrógenos: Un ambiente estrogénico predominantemente intrafolicular está asociado con un buen crecimiento folicular y tiene efectos anti-atresia. Además, la E2 mejora la maduración citoplásmica de los ovocitos a través de una acción directa no genómica a nivel de la membrana plasmática, induciendo a su vez la entrada de calcio extracelular en la célula y un patrón específico de oscilaciones de Ca<sup>2+</sup> [15]. La relación E2 y E2 / P elevada en el LF indican una etapa más avanzada de maduración de los ovocitos y se ha encontrado repetidamente que se asocian con una mayor probabilidad de lograr un embarazo (14). Esta observación, sin embargo, no fue confirmada por otros estudios (6).

También hay evidencia contradictoria con respecto al significado de los niveles de progesterona en el LF. Varios autores encontraron que una concentración alta de P en LF (o una relación E2 / P baja) era predictiva de la implantación posterior y el embarazo (16), y lo consideraron como un reflejo de la luteinización progresiva del folículo y la reducción de la actividad de la aromatasa relacionada con el logro de la maduración final del ovulo. Por otro lado, sin embargo, los ovocitos de folículos que tenían una P elevada se encontraban con frecuencia asociados con ovocitos posmaduros que fertilizaban de forma anormal y daban lugar a embriones con múltiples pronúcleos. Parece que mientras una exposición óptima a P tiene efectos positivos sobre las características de los ovocitos, una exposición excesiva conduce a un rápido empeoramiento de la calidad de la célula; Actualmente se carece de un conocimiento claro del umbral en el cual P comienza a dañar el ovocito.

### **FACTORES DE CRECIMIENTO**

Inhibina y activina: Las inhibinas son producidas por las células de la granulosa y su nivel de LF refleja el número y la actividad de las células de la granulosa de cada folículo; en el LF, la inhibina A aumenta mientras que la inhibina B disminuye durante la fase folicular (15).

Hormona anti-mulleriana (AMH): Los niveles de AMH en relación con la calidad de los ovocitos siguen siendo contradictorios. Se encontró que los niveles

séricos de AMH entre 1.66 y 4.52 ng / ml se asociaban con ovocitos de alta calidad (16) y con embriones de buena morfología. Cupisti (17) descubrió que los niveles de AMH en folículos individuales estaban inversamente correlacionados con la maduración y el potencial de desarrollo de los ovocitos. Por el contrario, Takahashi (18) observó que los ovocitos tenían más probabilidades de ser fertilizados cuando su folículo era capaz de producir niveles altos de AMH, ya que los niveles de AMH de folículos con ovocitos fertilizados eran más de 3 veces más altos que los de folículos con óvulos no fertilizados.

Proteína morfogenética ósea-15 (BMP-15): Se encontró que BMP-15 influye en la maduración y calidad de los ovocitos. Se observaron niveles más altos de BMP-15 en el LF de los óvulos que se fertilizaron y dividieron en comparación con los no fertilizados o no divididos (14). En el mismo estudio, también se demostró que los niveles intrafoliculares de BMP-15 estaban correlacionados positivamente con los niveles de estradiol en folículos individuales. Estos resultados aún deben confirmarse en estudios más amplios.

### Interleucinas

Se pueden encontrar citocinas proinflamatorias en el LF como resultado de la síntesis y liberación locales ováricas durante la maduración folicular y la ovulación; por ejemplo, IL-1ß en LF deriva tanto del ultrafiltrado plasmático como de la síntesis local por luteinización de las células de la granulosa.

### Prostaglandinas

La prostaglandina (PG) F2α, secretada por las células de la granulosa bajo la estimulación ejercida por las gonadotropinas, se propuso como marcador bioquímico de la calidad de los ovocitos, ya que se encontró mayor en el LF de los folículos cuyos ovocitos fueron fecundados posteriormente. Además, se encontró que las concentraciones de PGE2 y PGF2α en LF eran más altas en folículos que contenían ovocitos maduros (5).

### Carbohidratos

La glucosa es el componente mayoritario en el líquido folicular, ya que representa el 80% de los carbohidratos totales. Es la principal fuente de energía para el metabolismo del ovario.

### Lípidos

La tasa de maduración de los ovocitos puede variar dependiendo de la concentración de fosfolípidos en el líquido folicular. El nivel de fosfolípidos en el líquido folicular puede afectar también la tasa de fertilización (19).

### Proteínas

El líquido folicular es rico en proteínas procedentes del plasma o secretadas de las células de la granulosa y de la teca.

La mayoría de las proteínas del líquido folicular detectadas están involucradas en procesos metabólicos (19%), procesos celulares (14%), comunicación celular (11%) y respuesta inmunitaria (11%). Contiene múltiples proteínas asociadas a la respuesta inflamatoria, como es de esperar, ya que la ovulación es un proceso asociado a la inflamación. En cuanto a su función molecular se encontró que un 31% de las proteínas tenían actividad catalítica, mientras que la clasificación basada en la localización indicó que el 56% eran extracelulares (20).

### ESTRÉS OXIDATIVO

En los seres vivos se producen continuamente, durante su metabolismo fisiológico, reacciones bioquímicas que producen radicales libres. Procesos oxidativos que, si no son controlados, pueden poner en peligro la integridad celular.

El conjunto de radicales libres que tienen la capacidad de producir daños oxidativos se les denomina Especies Reactivas del Oxígeno (ERO). Estos tienen orígenes distintos, desde mitocondrial hasta factores exógenos (ionización, contaminación, estrés, etc).

Las ERO incluyen iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos, tanto inorgánicos como orgánicos. Son generalmente moléculas muy pequeñas altamente reactivas debido a la presencia de una capa de electrones libres.

Estas especies se forman de manera natural como subproducto del metabolismo normal del oxígeno y tienen un importante papel en la señalización celular. Sin embargo, en épocas de estrés ambiental sus niveles pueden aumentar en gran manera, lo cual puede resultar en daños significativos a las estructuras celulares. Esto lleva en una situación conocida como estrés oxidativo.

La correcta modulación de estos radicales libres por parte de los antioxidantes reduce sensiblemente la aparición de muchos procesos patológicos. Aunque dependemos del oxígeno para respirar, este elemento es el causante de la oxidación celular, al producir radicales libres. Esto ocurre cuando el organismo metaboliza naturalmente el oxígeno, iniciándose procesos destructivos convertido en radical libre, combinándose con otras moléculas y transformándolas en peligrosas.

En un principio todos los radicales libres deberían ser clasificados como nocivos, aunque se generan como consecuencia fisiológica del metabolismo porque lo que los hace patogénicos es su aumento incontrolado. Los efectos de las ERO sobre el metabolismo celular han sido bien documentadas en una gran variedad de especies.

Estos incluyen no sólo los roles en la muerte celular programada y la necrosis, sino también efectos positivos, tales como la inducción de genes de defensa y

la movilización de los sistemas de transporte de iones. También se lo implica con frecuencia en funciones de señalización redox o señalización oxidativa. En particular, las plaquetas que participan en la reparación de heridas y homeostasis de la sangre liberan especies reactivas del oxígeno para reclutar más plaquetas en los sitios de lesión. Estas también proporcionan un enlace a la adaptación del sistema inmune a través del reclutamiento de glóbulos blancos.

El sistema que se ve más rápidamente afectado es el sistema inmunitario, especialmente sensible a los ERO. Cuadros patológicos e ineficacia de los planes vacunales son sus principales consecuencias. La presencia y actividad de antioxidantes contrarresta la acción de los radicales libres, ya que colabora en mantener o restablecer el equilibrio que proporcionará un mayor nivel de salud, protegiendo el sistema inmunitario, restaurando la eficacia de las vacunaciones y favoreciendo el funcionamiento orgánico.

Las ERO se producen como parte del metabolismo celular y están involucradas tanto en la salud como en la enfermedad durante toda nuestra vida. Los principales tipos de ERO incluyen el anión superóxido (O2 • -), el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y el radical hidroxilo (OH •). Las enzimas antioxidantes y las moléculas pequeñas, como el glutatión, las vitaminas E, C y A y la tiorredoxina 2, mantienen el estado redox de las células. En un tejido sano, los ERO (prooxidantes) y los antioxidantes que sirven para eliminar los ERO

permanecen en equilibrio. El estrés oxidativo se refiere a la alteración de este equilibrio y la sobreproducción de ERO. La fecundación in vitro (FIV) es una de las técnicas de reproducción asistida más habituales. Este método es un tratamiento de infertilidad ampliamente aceptado y, a menudo, sigue siendo la única posibilidad de tener un bebé para las parejas infértiles. Desafortunadamente, el éxito de esta técnica, medido como una tasa promedio de embarazo por ciclo, es solo del 30-40% (21). Entre las muchas razones del fracaso de la FIV, el estrés oxidativo parece ser un factor importante (22). Sin embargo, hay datos limitados sobre los posibles efectos de ERO en el sistema reproductor femenino (23).

Los radicales libres y otros oxidantes pueden causar la oxidación de lípidos, proteínas y ADN, aumentando así la probabilidad de enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, inflamatorias y muchas otras (24). Los productos tóxicos de las reacciones radicales ejercen efectos citotóxicos, causan daño a la membrana celular y activan las vías de muerte celular. Por lo tanto, los metabolitos del oxígeno pueden alterar la función celular e incluso afectar la supervivencia celular (25).

Las ERO sirven como moléculas de señal clave en una variedad de procesos fisiológicos en el cuerpo de una mujer, desde la maduración de los ovocitos hasta la fertilización, el embarazo y el desarrollo embrionario (26). Las ERO juegan un papel en la fisiología de la función ovárica. Se ha detectado la

expresión de varios biomarcadores de estrés oxidativo en ovarios humanos que funcionan normalmente. Existe evidencia de que las ERO están implicadas en la maduración del folículo, la foliculogénesis, la función del cuerpo lúteo y la ovulación (27). Además, se ha demostrado una actividad enzimática oxidativa más fuerte en las células implicadas en la esteroidogénesis, como las células de la teca, las células de la granulosa luteína y las células del hilio.

Numerosos estudios en humanos han demostrado que el aumento de la generación de ERO puede estar involucrado en defectos de nacimiento y otras situaciones como los abortos. Además, también hay alguna evidencia del papel de ERO en la fisiopatología de la infertilidad y la fertilidad asistida, pero los datos existentes son contradictorios y no están claros (28).

El líquido folicular (LF) crea el microambiente para el ovocito en desarrollo y tiene un impacto directo en la calidad del ovocito, la implantación y el desarrollo embrionario temprano. Un desequilibrio en la producción de ERO en el líquido folicular ovárico puede tener un efecto adverso en los procesos anteriores. El aumento de la actividad de ERO en LF puede ser tóxico para la formación de embriones, mientras que un nivel de ERO fisiológico puede ser indicativo de ovocitos sanos en desarrollo (29). La medición de estos parámetros podría tener relevancia clínica. La evaluación de la tasa de estrés oxidativo puede ser útil para evaluar la fertilización in vitro.

### SISTEMAS ANTIOXIDANTES

Dada la toxicidad de ERO y las especies reactivas de Nitrogeno (ERN), las células han desarrollado mecanismos de defensa que retrasan o previenen significativamente la oxidación de los sustratos oxidables como proteínas, lípidos, carbohidratos y ADN, y se conocen como sistemas antioxidantes.

Las células aerobias disponen de una serie de mecanismos que les permiten vivir en una atmósfera con oxígeno, ya que continuamente generan cantidades pequeñas, pero significativas, de radicales de oxígeno. Existen varias posibles clasificaciones de estas defensas antioxidantes. Una de ellas las divide en dos grupos: sistemas de defensa primarios y secundarios.

En el primer grupo se incluyen aquellos sistemas encargados de prevenir la peroxidación lipídica y otros tipos de daño oxidativo. Entre ellos se encuentran proteínas como la transferrina o la ferritina que, al secuestrar iones Fe, impiden que tenga lugar la reacción de Haber-Weiss catalizada, la iniciación de la peroxidación o la descomposición de los hidroperóxidos lipídicos. La ceruloplasmina es posiblemente un sistema de defensa extracelular. Además, pertenecen a este grupo enzimas como la superóxido dismutasa (SOD) o la catalasa (CAT), encargadas de eliminar los radicales superóxido y el peróxido de hidrógeno respectivamente y la glutatión peroxidasa (GPX), que contribuye también a eliminar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se incluyen aquí compuestos como los ß-carotenos capaces de eliminar el O<sub>2</sub> en estado singlete, el ácido ascórbico y el glutatión.

Los sistemas de defensa secundarios constituyen ese segundo grupo. Son sistemas más específicos que tienden a detener la peroxidación lipídica una vez que ya se ha iniciado. Entre ellos se encuentra la vitamina E, que comprende cuatro derivados diferentes de los cuales el tocoferol es el más importante. También en este grupo se sitúa la glutatión peroxidasa, que es capaz de reducir los hidroperóxidos lipídicos.

Otras veces, estos mecanismos de defensa se clasifican en sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, y según si funcionan en la fracción soluble o en la lipídica.

Antioxidantes enzimáticos

Poseen especificidad de sustrato y catalizan la conversión de ERO en compuestos menos reactivos, deteniendo las reacciones en cadena de la oxidación.

### SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)

Descubierta por McCord y Fridovich (1969), la SOD cataliza la reacción de dismutación del O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el cual puede ser eliminado a su vez por catalasa y glutatión peroxidasa.

CATALASA (CAT)

CAT cataliza la conversión de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub>.

Aunque CAT no es esencial para algunos tipos celulares en condiciones normales, sí tiene un papel en la respuesta adaptativa de la células al estrés oxidativo (30).

### GLUTATIÓN PEROXIDASA (GPX)

La GPx comparte su sustrato con la CAT, pero además cataliza la reducción de diferentes hidroperóxidos lipídicos y orgánicos utilizando GSH que es transformado en glutatión disulfuro (GSSG).

### GLUTATIÓN S-TRANSFERASA (GST)

Cataliza la conjugación de GSH con un centro electrofílico de una molécula pequeña. De esta manera ejerce un papel protector contra la toxicidad causada por xenobióticos y sus metabolitos. Los derivados conjugados del GSH son por lo general biológicamente inactivos y no tóxicos, y son rápidamente excretados por el organismo tras su conversión metabólica en derivados del ácido mercaptúrico (31).

### PARAOXONASAS (PONS)

La familia de las paraoxonasas se compone de tres miembros que son homólogos estructurales: PON1, PON2 y PON3, cuyos genes se encuentran situados de forma adyacente en el brazo largo del cromosoma 7 en los seres

humanos y comparten un 70% de identidad en sus secuencias. Las proteínas PON1, PON2 y PON3 tienen un peso molecular de aproximadamente 40 KDa y están formadas por 355 aminoácidos.

### Antioxidantes no-enzimáticos

Las sustancias antioxidantes pueden prevenir la formación de radicales libres, como por ejemplo los quelantes de metales de transición que evitan la formación del radical hidroxilo, o bien detener las reacciones en cadena de la peroxidación, proporcionando un electrón a un radical libre, con la consiguiente formación de un producto estable. Entre estos antioxidantes se hallan las vitaminas C y E y el GSH.

### Vitamina E

La vitamina E pertenece al grupo de vitaminas liposolubles ampliamente distribuidas en los alimentos de origen vegetal. Consta de 2 partes: un anillo complejo de cromano y una larga cadena lateral de fitilo. Existen cuatro formas de la vitamina E: alfa, beta, gamma y delta-tocoferol, y cada una de ellas contiene a su vez 8 isómeros, siendo el RRR-α-tocoferol la forma más activa de la vitamina E en humanos y un poderoso antioxidante biológico.

### Vitamina C

La vitamina C o el ácido ascórbico es un sólido cristalino blanco muy soluble en agua. El ácido ascórbico en plantas y algunos animales es sintetizado a partir

de la glucosa, pero los humanos no lo sintetizan. Por ello es necesario ingerirla en la dieta (32).

En el citosol la vitamina C actúa como un antioxidante primario que elimina ERO producidas en el metabolismo celular. La vitamina C favorece el reciclado de la vitamina E (33).

### Glutatión (GSH)

El GSH es un tripéptido formado por L-cisteína, L-glutamato y L-glicina (γ-Glu-Cys-Gly). Además de participar en reacciones de conjugación catalizadas por GST para la eliminación de xenobióticos, el GSH es el principal antioxidante intracelular. El glutatión está presente en las células tanto en su forma reducida como oxidada.

### EROS EN LA FISIPATOLOGIA DE LA REPRODUCCION

En reproducción femenina, las ERO y sus sistemas antioxidantes desempeñan diferentes funciones. Con niveles adecuados se comportan como mediadores de la señalización hormonal, la esteroidogenesis ovárica, la ovulación, la formación del cuerpo lúteo y la luteolisis, así como de la función de las células germinales. Estos ERO a menudo se forman dentro del ovario como parte de la síntesis de hormonas esteroideas durante las fases folicular y lútea.

La transición desde el folículo en desarrollo hasta el folículo antral se asocia a un marcado aumento del metabolismo de las células de la granulosa, fundamentalmente en la producción de esteroides vía citocromo P450 (34), con el consiguiente aumento de la generación de radicales libres.

El O<sub>2</sub> puede dar lugar a la ruptura de la pared folicular, requisito indispensable para la ovulación; de hecho, se ha observado que la peroxidación lipídica se intensifica en el folículo preovulatorio. Además, las ERO intervienen en la maduración del ovocito, dado que inducen la reanudación de la meiosis I en la pubertad.

### **CAPÍTULO III**

### **HIPOTESIS**

El estrés oxidativo influye en múltiples procesos biológicos incluyendo el éxito de las técnicas de reproducción asistida, por lo que el estado antioxidante del líquido folicular podría reflejar la calidad ovocitaria así como su capacidad de fertilizarse y de subsecuentemente culminar en embarazo.

### **CAPÍTULO IV**

### **OBJETIVOS**

### Objetivo general

 Investigar el impacto del estrés oxidativo en el líquido folicular con respecto a la madurez ovocitaria y los resultados reproductivos en pacientes sometidas a FIV.

### **Objetivos Secundarios**

- Asociar el impacto del estrés oxidativo en el líquido folicular con los resultados de la tasa de implantación (ß-hCG).

### **CAPÍTULO V**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

Se realizó un estudio prospectivo, no aleatorizado en el que se incluyeron mujeres con diagnóstico de infertilidad primaria o secundaria que acudieron al Centro Universitario de Medicina Reproductiva del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" de la Universidad Autónoma de Nuevo León en 2020 y que se sometieron a un tratamiento de fertilidad con técnicas de alta complejidad (FIV e ICSI). Se incluyeron mujeres que consultaron por infertilidad, de 18 a 42 años que ingresaron al programa de FIV/ICSI, sin endometriosis severa y con factor masculino normal. Se excluyeron casos de cancelación de ciclo de estimulación ovárica controlada por mala respuesta, con obesidad, historia de cirugía pélvica en los últimos 3 meses, o aquellas pacientes en las que no se obtuvieron óvulos o con infecciones o datos de inflamación.

En este estudio como proxy de la calidad del líquido folicular se realizó la medición cualitativa del potencial de oxido-reducción estática (sORP) mediante el uso del sistema MiOXSYS. Posteriormente, se evaluó la madurez ovocitaria y las tasas de implantación embrionaria.

### Estimulación ovárica

En la reproducción asistida, se pretende imitar lo que ocurre en el ciclo natural pero a mayor escala, de manera que maduren varios folículos ováricos a la vez.

Esto se consigue con el tratamiento hormonal que contiene la hormona FSH.

Además, la estimulación ovárica es bilateral: los folículos crecen en ambos ovarios a la vez.

Concretamente, la estimulación ovárica controlada para la FIV consiste en tres fases que se caracterizan por la administración de diferentes fármacos:

### Frenaje o supresión hipofisaria

Se administran fármacos análogos de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) con la finalidad de hacer un bloqueo del flujo hormonal interno entre la hipófisis y los ovarios. De esta manera, no hay producción endógena de gonadotropinas (FSH y LH) y los ovarios se mantienen en reposo.

### Desarrollo folicular múltiple

Una vez bloqueada la hipófisis, es necesario administrar gonadotropinas exógenas para conseguir un desarrollo folicular controlado. Lo que se pretende es sincronizar toda la cohorte de folículos y que crezcan todos a la vez hasta conseguir un tamaño adecuado.

### Maduración folicular final

Esta fase consiste en una inyección final de un fármaco que contiene la hormona hCG para que los óvulos que hay en el interior de los folículos puedan madurar. Es muy importante programar la punción folicular unas 36 horas

después de esta inyección, ya que si pasa más tiempo se produciría la ovulación y los óvulos maduros serían expulsados de los ovarios a las trompas de Falopio.

### Tipos de fármacos

Los fármacos empleados durante la estimulación ovárica se dividen en:

### Agonistas de la GnRH

Son las hormonas utilizadas para frenar la hipófisis en los protocolos largos de estimulación ovárica controlada (EOC).

### Antagonistas de la GnRH

Son las hormonas utilizadas para frenar la hipófisis en los protocolos cortos de EOC.

### Gonadotropinas

Son los fármacos que contienen FSH y/o LH como principios activos.

### Inductores de la ovulación

Son los medicamentos que sirven para realizar la maduración folicular final e inducir la ovulación.

### Control médico

Para el presente estudio, el estudio consistió en la estimulación ovárica de la paciente seguido de la punción folicular dictada por el control médico.

Específicamente, el tratamiento hormonal para estimular los ovarios, es decir, las gonadotropinas, se debe empezar a administrar los primeros días de regla

(entre el día 1 y el día 3). Se realiza una ecografía transvaginal a la mujer para comprobar que los ovarios están en reposo y, si es así, se puede comenzar con la estimulación.

El tratamiento suele administrarse mediante inyecciones subcutáneas diarias en la zona del abdomen. Tras varios días con la aplicación de estos fármacos, la paciente debe acudir a la clínica para comprobar cómo se van desarrollando los folículos por ecografía. Este control debe repetirse aproximadamente cada dos días.

Durante el seguimiento médico, se cuentan los folículos que van creciendo y se mide su tamaño. Si fuera necesario, el ginecólogo ajustaría la dosis del medicamento con el fin de obtener una respuesta ovárica óptima.

El tamaño adecuado que deben alcanzar los folículos es de aproximadamente 18 mm. Además, también es necesario controlar el nivel de estradiol, que suele ser de 200-300 pg/ml por cada folículo maduro.

En ese momento, se programa la punción folicular para la recuperación de los óvulos maduros y se indica a la mujer el momento exacto en el que tendrá que aplicarse la inyección de hCG.

Durante la punción folicular se colectará la muestra de líquido folicular mediante aspirado.

### Punción folicular

El siguiente paso es la obtención de los óvulos mediante la punción folicular u ovárica mediante aspirado. Se trata de una intervención quirúrgica realizada bajo anestesia en la que el ginecólogo va pinchando los folículos del ovario ("bolsas" que contienen los óvulos) y aspirando su contenido. Para este estudio se descartaron aquellas muestras contaminadas con sangre o medio de cultivo y se empleó un contenedor por cada folículo aspirado.

Una vez obtenido el líquido folicular se analizó bajo microscopio estereoscópico para localizar el ovocito, el cual fue separado para la TRA. Mientras que de aproximadamente 5-10 ml del líquido folicular, fueron colocados en un tubo cónico estéril el cual será centrifugado a 1000 g por 10 minutos para remover el detrito celular. Posteriormente, ~1.5 mL del sobrenadante fueron colocados en un crio vial y almacenados a -80°C, hasta su análisis.

El líquido folicular fue analizado por el sistema MiOXSYS, que mide la transferencia de electrones en todos los oxidantes y reductores conocidos y desconocidos dentro de la muestra biológica. El sistema MiOXSYS mide el potencial de oxido reducción estático (sORP). La suma de estrés oxidativo en comparación con la cantidad de estrés de reducción (equilibrio redox) presente en una muestra de líquido folicular se puede medir con un electrodo sORP. El sistema MiOXSYS se basa en la tecnología electroquímica que utiliza un

sensor de electrodos basada en platinos con una celda de referencia Ag/AgCl y un analizador basado en galvanostato que completa el circuito.

Para lo anterior, las muestras fueron descongeladas en un baño de agua a 37 °C, posteriormente, se insertó un sensor en el equipo MiOXSYS, al que se aplicaron 30 µl de la muestra del líquido folicular. Internamente, la muestra fluye a través del electrodo de trabajo y llena la celda de referencia, completando así el circuito electroquímico, La medida de sORP resultante refleja el promedio de los 10 segundos finales (o 20 lecturas) del proceso.

Los valores de sORP exhibidos por encima del rango normal implicaría un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes (oxidantes elevados) evidenciando la presencia de estrés oxidativo en la muestra. Sin embargo, no se ha establecido un rango normal de valores de sORPs en liquido folicular.

### Tamaño de muestra

Dado que existe información limitada con respecto a la medición de estrés oxidativo se realizó un estudio piloto con 15 pacientes con diagnóstico de infertilidad primaria o secundaria.

### Análisis estadístico

Los valores de sORP (mV) obtenidos de las muestras de líquido folicular se presentaron como medias ± error estándar o medianas (con percentiles 25 y 75).

Las variables a medir fueron directamente el potencial oxido reducción (sORP) del líquido folicular con respecto al factor de infertilidad de la paciente, y a las tasas de embarazo.

Para la comparación entre los grupos se realizó la prueba de Kolmogórov-Smirnov para variables continuas no paramétricas. En las comparaciones, fueron considerados como estadísticamente significativos valores de P <0.05.

Se realizo una regresion logistica, tomando en cuenta el resultado de la prueba de embarazo, el sORP y se ajusto con las variables de edad y factor de infertilidad usando el SPSS Statistics version 20.

#### **Consideraciones éticas**

El presente protocolo fue sometido para su autorización al Comité de Ética y Comité de Investigación del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González". Y se mantuvo la confidencialidad de los sujetos de investigación mediante un número de registro único en expedientes archivados en el departamento de Biología de la Reproducción al que solo tienen acceso las personas involucradas en la elaboración del estudio. El presente protocolo no tuvo ninguna ganancia financiera o comercial por su realización, por lo que los autores declararon no tener ningún tipo de conflicto de interés por su realización.

Dada la naturaleza del estudio, donde se evaluó el estrés oxidativo en un material biológico que es obtenido durante los procedimientos realizados en las TRA y el cual es usualmente descartado, no prevemos que podamos detectar alguna anomalía. Sin embargo, si fuera el caso se informaría a la paciente.

# **CAPÍTULO VI**

#### **RESULTADOS**

Se incluyeron 15 pacientes que cumplían con criterios de inclusión. Las características basales de la población estudiada se describen en la tabla 1. La edad media de las participantes fue de 34.6 ± 5.1 años. Siendo la edad mínima de 25 años y la máxima de 42 años. El valor medio del sORP fue de 151.2 ± 45.6 mV, con un valor mínimo de 94.7 y máximo de 300.4 mV. Se subdividieron en rangos intercuartílicos obteniendo valores entre el 25% y 75% de 124.9 a 161.5% respectivamente.

Tabla 1.- Descripción de participantes

	Media ± DS	Min-máx.	25-75%		
Edad	34.6 ± 5.1	25-42	31-38		
sORP	151.2 ± 45.6 mV	94.7 -300 mV	124.9-161.5 mV		

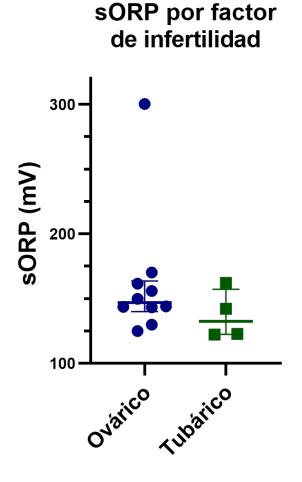
Se recupero un total de 157 ovocitos de las pacientes incluidas en el estudio. Se hizo un seguimiento de 50 ovocitos de los cuales 47 fueron recuperados en estadio MII.

Las pacientes se clasificaron dependiendo del factor de infertilidad. De las 15 pacientes incluidas, 10 de ellas presentaban factor de infertilidad ovárico, correspondiente al 66% de la población analizada. Mientras que 4 pacientes

presentaron factor de infertilidad ovárico correspondiente al 27% y una paciente no presentaba ninguno de los factores descritos anteriormente (7%).

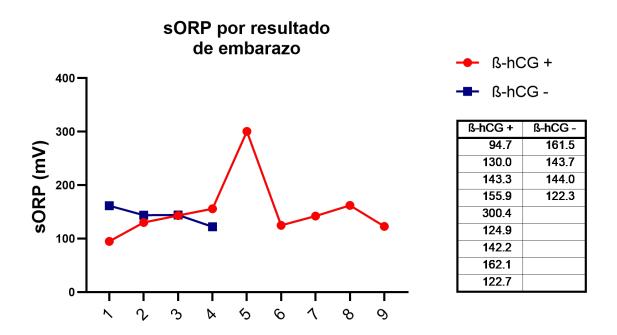
Al realizar el análisis comparativo de los valores de sORP entre los factores ováricos y tubáricos, utilizando la prueba no paramétrica para datos continuos de Kolmogórov-Smirnov, no se obtuvo diferencia estadísticamente significativa (p=0.26) entre el estrés oxidativo de pacientes con factor ovárico o tubárico que se sometieron a alguna técnica de reproducción asistida (Figura 1).

Figura 1. Valores de sORP por factor de infertilidad



Por último, un análisis comparativo entre los valores de sORP de pacientes con prueba de embarazo (ßhCG) positiva y negativa. De las 15 pacientes incluidas en total, se realizó transferencia embrionaria (TE) a 13 de ellas. Dos semanas después de la TE, los resultados fueron recabados, 9 tuvieron ßhCG positivas y 4 ßhCG negativas. No se encontró diferencia estadística (p=0.61) en los valores de sORP con respecto a los resultados de la prueba de embarazo (Figura 2).

Figura 2.- Valores de sORP por resultado de embarazo



Se realizo una regresión logística para evaluar si es posible predecir el resultado de la prueba de embarazo basado en el valor de sORP, sin embargo, basado en el valor de p =0.727 con un 95% CI para OR de 0.976-1.035, no es posible realizar estas predicciones (Tabla 2).

Tabla 2. Regresión logística de embarazo y sORP.

#### Variables en la ecuación 95% C.I. para Odds Ratio Valor de Odds В Error estándar Wald Ratio Inferior Superior gl Paso sORP 1 .005 .015 .122 .727 1.005 .976 1.035 Constante .040 2.255 .000 1 .986 1.041

Además, la regresión logística se ajustó con la edad de las pacientes, y tampoco se encontró una significancia estadística (p=0.838) con un 95% CI para OR de 0.976-1.035, por lo que en este punto nuestros datos no nos permiten realizar una predicción (Tabla 3).

a. Variables especificadas en el paso 1: sORP.

Tabla 3. Regresión logística de embarazo y sORP, ajustada por la edad de las

# Variables en la ecuación

						Valor de	Odds	95% C.I. para Odds	
		В	Error estándar	Wald	gl	р	Ratio	Inferior	Superior
Paso 1 <sup>a</sup>	sORP	.005	.016	.089	1	.766	1.005	.975	1.036
	Edad	.025	.120	.042	1	.838	1.025	.810	1.297
	Constante	718	4.349	.027	1	.869	.488		

a. Variables especificadas en el paso 1: sORP, Edad. pacientes.

Del mismo modo, al añadir a la regresión logística el factor de infertilidad, los datos son insuficientes para permitir una predicción (Tabla 4).

Tabla 4. Regresión logística de embarazo y sORP, ajustada por la edad y factor de infertilidad de las pacientes.

Variables en la ecuación										
								95% C.I. para Odds		
			Error			Valor de		Ratio		
		В	estándar	Wald	gl	р	Odds Ratio	Inferior	Superior	
Paso	1ª sORP	.015	.025	.352	1	.553	1.015	.966	1.067	
	Edad	.044	.120	.133	1	.716	1.045	.825	1.323	
	Factor			.427	2	.808				
	Factor(1)	-21.728	40192.980	.000	1	1.000	.000	.000		
	Factor(2)	-20.794	40192.980	.000	1	1.000	.000	.000		
	Constante	18.383	40192.981	.000	1	1.000	96320526.70			
							6			

a. Variables especificadas en el paso 1: sORP, Edad, Factor.

# **CAPÍTULO VII**

## DISCUSIÓN

Como mencionamos previamente, el líquido folicular (LF) proporciona un microambiente muy importante para el desarrollo de los ovocitos. Se han estudiado diversos componentes del líquido folicular (LF), como citocinas, factores de crecimiento y hormonas, y su posible influencia en el desarrollo ovocitario y calidad embrionaria. El estrés oxidativo ha surgido recientemente como un factor importante que influye negativamente en los resultados de las técnicas de reproducción asistida (TRA). Los malos resultados obtenidos en estas técnicas podrían deberse a una falta de los mecanismos de protección natural del ovocito y embrión frente al estrés oxidativo in vitro. Se ha demostrado que las concentraciones de varios marcadores de estrés oxidativo son mayores en plasma que en LF, lo que sugiere que el LF cuenta con altas concentraciones de antioxidantes que protegen al ovocito del daño oxidativo (35).

Diversos estudios han centrado su interés en el microambiente que rodea al ovocito, y han encontrado ERO y antioxidantes en el líquido folicular. Por ello, un desbalance entre las ERO y los sistemas antioxidantes en el LF podría ser responsable de un desarrollo anormal del ovocito, causando daño en el ADN, el citoesqueleto y las membranas celulares, que se traduciría en una menor capacidad de fertilización del ovocito.

Maldonado y colaboradores realizaron un estudio prospectivo que midió el ORP en el líquido folicular por MiOXSYS de 20 donantes y 20 pacientes. Los resultados obtenidos fueron que los valores de ORP en el líquido folicular de pacientes fueron significativamente (p<0.0001) más altos comparados con aquellos obtenidos en las donantes (100.8  $\pm$  17.5 mV vs 86.0  $\pm$  14.8 mV) (36). En contraste con nuestro estudio que fue realizado en pacientes infértiles únicamente y los valores promedio de ORP fueron de 151.2  $\pm$  45.59 mV independientemente del factor de infertilidad que presentara.

Heromi y colaboradores realizaron un estudio prospectivo, en el cual midieron el estrés oxidativo en líquido folicular y medio de cultivo ovocitario, con 211 muestras foliculares de 124 pacientes, concluyendo que, a menor índice de estrés oxidativo, mejor es el estado de fertilización y el desarrollo embrionario (37).

Nuestro estudio incluyó un total de 15 pacientes que se sometieron a alguna técnica de reproducción asistida. Encontrándose un promedio de los valores sORP de 151.2 ± 45.6 mV. Dado que no existen valores de referencia a nivel mundial, decidimos investigar el impacto tiene el estrés oxidativo en el líquido folicular sobre la madurez y tasas de embarazo y aunque no encontramos diferencias estadísticamente significativas en las comparaciones que realizamos, observamos valores más altos que los reportados por Maldonado y col. Otra diferencia con respecto al estudio de Maldonado y col fue el uso de la

muestra en fresco, posterior a la punción folicular, que en nuestro caso fue después de un periodo de almacenamiento a -80 °C, ya que se les dio seguimiento a los óvulos recuperados.

El sORP del líquido folicular se midió con el MiOXSYS, sin embargo, este equipo está diseñado para medir el estrés oxidativo para muestras de semen. En el presente trabajo, se pretendió innovar mediante el uso de este dispositivo para evaluar una matriz diferente, tal cual fue el líquido folicular. Este trabajo, es el primero en nuestro conocimiento que evalúa el líquido folicular mediante el sistema MiOXSYS con respecto al factor de infertilidad, calidad ovocitaria y embarazo.

Basado en los resultados de la regresión logística no podemos predecir el resultado de la prueba de embarazo basado en los niveles de sORP de las muestras de líquido folicular de las pacientes que se sometieron a una técnica de reproducción asistida de alta complejidad. Lo anterior debido a que el numero de muestras es insuficiente para realizar tales predicciones. Del mismo modo, no se pudieron realizar predicciones al ajustar el modelo con otras variables como la edad y el factor de infertilidad de la paciente. Por lo que, como perspectiva de este estudio, se requiere la inclusión de un mayor numero de muestras de líquido folicular.

## **CAPITULO VIII**

#### CONCLUSIONES

Mediante los resultados de este trabajo no se estableció el impacto del estrés oxidativo en el líquido folicular con respecto a la madurez ovocitaria y los resultados reproductivos en pacientes sometidas a FIV. Así mismo, no se asoció el impacto del estrés oxidativo en el líquido folicular con los resultados de la tasa de implantación (β-hCG).

En el presente trabajo no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la madurez ovocitaria y tasas de implantación (embarazo) en las pacientes con factor de infertilidad ovárico o tubárico sometidas a alguna técnica de reproducción asistida.

Se necesita incluir un mayor número de muestras, para fortalecer nuestras observaciones, lo cual podría ayudarnos a lograr una significancia estadística. Por lo que son necesarios más estudios en este campo para poder establecer valores de referencia globales que nos ayuden a dilucidar el papel del estrés oxidativo en los resultados de las técnicas de reproducción asistida de alta complejidad.

#### **CAPITULO IX**

#### **ANEXOS**





FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

#### DR. OTTO HUGO VALDEZ MARTÍNEZ.

Investigador Principal
Departamento de Ginecología y Obstetricia.
Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González"
Presente -

Estimado Dr. Valdez:

En respuesta a su solicitud con número de ingreso PI20-00254 con fecha del 18 de Agosto del 2020, recibida en las oficinas de la Secretaría de Investigación Clínica de la Subdirección de Investigación, se extiende la siguiente notificación con fundamento en el artículo 41 BIS de la Ley General de Salud; los artículos 14 inciso VII, 99 inciso I, 102, 109 y 112 del Decreto que modifica a la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la salud publicado el día 2 de abril del 2014; además de lo establecido en los puntos 4.4, 6.2, 6.3.2.8, 8 y 9 de la Norma Oficial Mexicana NOM-012-SSA3-2012, que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos; así como por el Reglamento interno de Investigación de nuestra Institución.

Se le informa que el Comité a mi cargo ha determinado que su proyecto de investigación clínica abajo mencionado cumple con los aspectos éticos necesarios para garantizar el bienestar y los derechos de los sujetos de investigación que la sociedad mexicana demanda, por lo cual ha sido APROBADO.

Titulado "Impacto del estrés oxidativo en el líquido folicular sobre la madurez ovocitaria y tasa de implantación en pacientes sometidas a FIV"

De igual forma el siguiente documento:

Protocolo escrito en extenso, versión 4.0 de fecha Septiembre 2020.

Por lo tanto usted ha sido autorizado para realizar dicho estudio en el **Departamento de Ginecología y Obstetricia** del Hospital Universitario como Investigador Responsable. Su proyecto aprobado ha sido registrado con la clave **GI20-00014.** La vigencia de aprobación de este proyecto es al día **01 de Octubre del 2021.** 

Participando además el Dr. Juan Enrique Ferez Paz como **Tesista**, el Dr. Luis Humberto Sordia Hernández, Dr. Felipe Arturo Morales Martínez, Dra. C. Selene Marysol García Luna, Dra. Ma. Eugenia Espinoza Rodríguez y la MIP Ana Paula Rabago Jamaica como Co-Investigadores.

Toda vez que el protocolo original, así como la carta de consentimiento informado o cualquier documento involucrado en el proyecto sufran modificaciones, éstas deberán someterse para su reaprobación.

Será nuestra obligación realizar visitas de seguimiento a su sitio de investigación para que todo lo anterior se encuentre 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 bienestar y seguridad de los sujetos en investigación.

Comité de Ética en Investigación

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







FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

## El proyecto aprobado será revisado:

- 1. Al menos una vez al año, en base a su naturaleza de investigación.
- 2. Cuando cualquier enmienda pudiera o claramente afecte bienestar y los derechos de los sujetos de investigación o en la conducción del estudio.
- 3. Cualquier evento o nueva información que pueda afectar la proporción de beneficio/riesgo del estudio.
- 4. Así mismo llevaremos a cabo auditorias por parte de la Coordinación de Control de Calidad en Investigación aleatoriamente o cuando el Comité lo solicite.
- 5. Toda revisión será sujeta a los lineamientos de las Buenas Prácticas Clínicas en Investigación, la Ley General de Salud, el Reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud, la NOM-012-SSA3-2012, el Reglamento Interno de Investigación de nuestra Institución, así como las demás regulaciones aplicables.

Atentamente,
"Alere Flammam Veritatis" Monterrey Nuevo León a 01 de Octubre del 2020

COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

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

Comité de Ética en Investigación

L. Farresco I, Madero y Av. Gonzalitos sín. Col. Mitras Centro, C.P. 64460, Monterrey, N.L. México



# **CAPÍTULO X**

## **BIBLIOGRAFIA**

- 1. Fortune JE: Ovarian follicular growth and development in mammals. Biol Reprod 1994, 50:225-232.
- 2. Leroy JL, Vanholder T, Delanghe JR, Opsomer G, Van Soom A, Bols PE, Dewulf J, de Kruif A: Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum. Theriogenology 2004, 62:1131-1143.
- 3. D'Aniello G, Grieco N, Di Filippo MA, Cappiello F, Topo E, D'Aniello E, Ronsini S: Reproductive implication of D-aspartic acid in human pre-ovulatory follicular fluid. Hum Reprod 2007, 22:3178-3183.
- 4. Görg A, Weiss W, Dunn MJ: Current two-dimensional electro- phoresis technology for proteomics. Proteomics 2004, 4:3665-3685.
- 5. Hanrieder J, Nyakas A, Naessén T, Bergquist J: Proteomic analysis of human follicular fluid using an alternative bottom-up approach. J Proteome Res 2008, 7:443-449
- 6. Suchanek E, Simunic V, Macas E, Kopjar B, Grizelj V: Prostaglandin F2 alpha, progesterone and estradiol concentrations in human follicular fluid and their relation to success of in vitro fertilization. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 1988, 28:331-339.
- 7. Ellsworth LR, Balmaceda JP, Schenken RS, Silverman AY, Prihoda TJ, Asch RH: Human chorionic gonadotropin and steroid concen- trations in human

follicular fluid in relation to follicle size and oocyte maturity in stimulated ovarian cycles. Acta Eur Fer- til 1984, 15:343-346.

- 8. Cha KY, Barnes RB, Marrs RP, Lobo RA: Correlation of the bioac- tivity of luteinizing hormone in follicular fluid with oocyte maturity in the spontaneous cycle. Fertil Steril 1986, 45:338-341.
- 9. Enien WM, Chantler E, Seif MW, Elstein M: Human ovarian gran- ulosa cells and follicular fluid indices: the relationship to oocyte maturity and fertilization in vitro. Hum Reprod 1998, 13:1303-1306.
- 10. Mendoza C, Ruiz-Requena E, Ortega E, Cremades N, Martinez F, Bernabeu R, Greco E, Tesarik J: Follicular fluid markers of oocyte developmental potential. Hum Reprod 2002, 17:1017-1022.
- 11. Lanzone A, Fortini A, Fulghesu AM, Soranna L, Caruso A, Mancuso S: Growth hormone enhances estradiol production follicle- stimulating hormone-induced in the early stage of the follicular maturation. Fertil Steril 1996, 66:948-953.
- 12. Jia X, Kalmijn J, Hsueh AJ: Growth hormone enhances follicle- stimulating hormone-induced differentiation of cultured rat granulosa cells. Endocrinology 1986, 118:1401-1409.
- 13. Izadyar F, Zhao J, Van Tol HT, Colenbrander B, Bevers MM: Messen- ger RNA expression and protein localization of growth ormone in bovine ovarian tissue and in cumulus oocyte com- plexes (COCs) during vitro maturation. Mol Reprod Dev 1999, 53:398-406.

- 14. Lindner C, Lichtenberg V, Westhof G, Braendle W, Bettendorf G: Endocrine parameters of human follicular fluid and fertilization capacity of oocytes. Horm Metab Res 1988, 20:243-246.
- 15. Laufer N, Botero-Ruiz W, DeCherney AH, Haseltine F, Polan ML, Behrman HR: Gonadotropin and prolactin levels in follicular fluid of human ova successfully fertilized in vitro. J Clin Endocrinol Metab 1984, 58:430-434.
- 16. Basuray R, Rawlins RG, Radwanska E, Henig I, Sachdeva S, Tummon I, Binor Z, Dmowski WP: High progesterone/estradiol ratio in follicular fluid at oocyte aspiration for in vitro fertilization as a predictor of possible pregnancy. Fertil Steril 1988, 49:1007-1011.
- 17. Cupisti S, Dittrich R, Mueller A, Strick R, Stiegler E, Binder H, Beck- mann MW, Strissel P: Correlations between anti-müllerian hor- mone, inhibin B, and activin A in follicular fluid in IVF/ICSI patients for assessing the maturation and developmental potential of oocytes. Eur J Med Res 2007, 12:604-608.
- 18. Takahashi C, Fujito A, Kazuka M, Sugiyama R, Ito H, Isaka K: Anti-Müllerian hormone substance from follicular fluid is posi- tively associated with success in oocyte fertilization during in vitro fertilization. Fertil Steril 2008, 89:586-591.
- 19. Fayezi S, Darabi M, Darabi M, Nouri M, Rahimipour A, Mehdizadeh A. Analysis of follicular fluid total phospholipids in women undergoing in-vitro fertilisation. J Obstet Gynaecol 2014 Apr;34(3):259-62.
- 20. Zamah AM, Hassis ME, Albertolle ME, Williams KE. Proteomic analysis of human follicular fluid from fertile women. Clin Proteomics 2015 Mar 3;12(1):5,015-9077-6. eCollection 2015.

- 21. Das, S., Chattopadhyay, R., Ghosh, S., Ghosh S., Goswami, S.K., Chakravarty, B.N., et al. (2006) Reactive oxygen species level in follicular fluid-embryo quality marker in IVF? Hum Reprod 21:2403–2407.
- 22. Sikka, S.C. (2004) Andrology and corner-role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. J Androl 25:p5–18.
- 23 Agarwal, A., Saleh, R.A. and Bedaiwy, M.A. (2003) Role of oxidative oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. Fertil Steril 79:829–843.
- 24. Luszczewski, A., Matyska-Piekarska, E., Trefler, J., Wawer, Iwona., Łacki, J., Śliwińska-Stańczyk, P. (2007) Reactive oxygen species physiological and pathological function in the human body. Reumatologia 45:284–289.
- 25. Oral, O., Kutlu, T., Aksoy, E., Ficicioglu, C., Uslu, H. and Tugrul, S. (2006) The effects of oxidative stress on outcomes of assisted reproductive techniques. J Assist Reprod Genet 23:81–85.
- 26. Agarwal, A., Gupta, S. and Sharma, R.K. (2005) Role of oxidative stress in female reproduction. Reprod Biol Endocrinol 3:28.
- 27. Jozwik, M., Wolczynski, S., Szamatowicz, M. (1999) Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans. Mol Hum Reprod 5:409–413.
- 28. Fujimoto, V.Y., Bloom, M.S., Huddleston, H.G., Shelley, W.B., Ocque, A. J. and Browne, R.W. (2011) Correlations of follicular fluid oxidative stress biomarkers and enzyme activities with embryo morphology parameters during in vitro fertilization. Fertil Steril 96:1357–1367.

- 29. Jana, S.K., Babu, N., Chattopadhyay, R., Chakravarty, B. and Chaudh- ury, K. (2010) Upper control limit of reactive oxygen species in follicular fluid beyond which viable embryo formation is not favorable. Reprod Toxicol 29:447–451.
- 30. Céspedes Miranda EM, Hernández Lantigua I, Llópiz Janer N. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: II. catalasa. Revista Cubana De Investigaciones Biomédicas 1996; vol. 15 numero 2:18-22.
- 31. Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification. Clin Chim Acta 2003 Jul 1;333(1):19-39.
- 32. Halliwell B, Gutteridge JMC. The antioxidants of human extracellular fluids. Arch Biochem Biophys 1990 July 1990;280(1):1-8.
- 33. Chan AC. Partners in defense, vitamin E and vitamin C. Can J Physiol Pharmacol 1993 Sep;71(9):725-31.
- 34. Richards JS. Hormonal control of gene expression in the ovary. Endocr Rev 1994 Dec;15(6):725-51.
- 35. Gupta S, L.S., The impact of oxidative stress on female reproduction and art: and evidence based review. Reprod Biol Endocrinol. 2012; 10: 49.
- 36. Maldonado Rosas, I., Jiménez Medina, I., Pérez Bernal, F., Solórzano Vázquez, JF., Villar Muñoz, LG., Agarwal, A. Determinación de potencial de óxido reducción (ORP) en líquido folicular y medios de cultivo utilizados para el lavado y cultivo de los ovocitos después de la punción ovárica Revista Mexicana de Medicina de la Reproducción 2018 julio-septiembre;9(3).
- 37. Hiromi Terao, Osamu Wada-Hiraike, Aiko Nagumo, Chisato Kunitomi, Jerilee M. K. Azhary, Miyuki Harada, Tetsuya Hirata, Yasushi Hirota, Kaori

Koga, Tomoyuki Fujii and Yutaka Osuga (2019) Role of oxidative stress in follicular fluid on embryos of patients undergoing assisted reproductive technology treatment. Journal of Obstetrics and Gynaecology Research 45(3)

# **CAPÍTULO XI**

## **RESUMEN AUTOBIOGRAFICO**

Juan Enrique Ferez Paz

Candidato para el grado de

Subespecialista en Biología de la Reproducción Humana

Tesis: IMPACTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL LIQUIDO FOLICULAR
SOBRE LA MADUREZ OVOCITARIA Y TASA DE IMPLANTACIÓN EN
PACIENTES SOMETIDAS A FIV

Campo de estudio: ciencias de la salud

Biografía:

Datos personales: nacido en San Pedro Sula, Cortes, Honduras: el 3 de noviembre de 1983.

Educación: Egresado de la Universidad Católica de Honduras obteniendo el grado de medico cirujano y partero en el año 2012. Egresado de la Universidad Nacional Autónoma -VS obteniendo el grado de Ginecología y Obstetricia en el año 2017.

48

## **CAPÍTULO XII**

#### **ABSTRACT**

#### Introduction:

Follicular fluid (FF) provides a very important microenvironment for the development of oocytes. In living beings, during their physiological metabolism, biochemical reactions with the production of free radicals are continuously produced. Oxidative processes that we do not control can endanger cell integrity. The set of free radicals that have the ability to produce oxidative damage are called Reactive Oxygen Species (ROS, according to the English acronym for reactive oxygen species). Numerous human studies have shown that increased ROS generation may be involved in birth defects and other situations such as abortions. Furthermore, there is also some evidence for the role of ROS in the pathophysiology of infertility and assisted fertility, but the existing data are conflicting and unclear.

## Objective:

To investigate the impact of oxidative stress on follicular fluid with respect to oocyte maturity and reproductive outcomes in patients undergoing IVF.

#### Materials and methods:

A prospective, non-randomized study was carried out in which women with a diagnosis of primary or secondary infertility who attended the University Center for Reproductive Medicine of the University Hospital of the UANL were included. Women who entered the IVF / ICSI program, who were between 18 and 42 years old, were included. To search for a statistical relationship of the data, the Kolmogorov-Smirnov test was used and a value of p <0.05 was considered a statistically significant finding.

**Ethical aspects:** 

It was approved by the research ethics committee of the Autonomous University

of Nuevo León, accepted with the registration code Gl20-00014.

Results:

Fifteen patients who met the inclusion criteria were included. The mean age of

the participants was  $34.6 \pm 5.1$  years. The mean value of the sORP was  $151.2 \pm$ 

45.6 mV. Of the 15 patients included in total, 13 of them underwent embryo

transfer, obtaining 9 patients positive BhCG results and 4 negative BhCG

results. No statistical difference was found in the values of sORP with respect to

the results of the pregnancy test (p = 0.61).

Conclusions:

Our data did not show statistical differences in terms of oocyte maturity and

implantation rates (pregnancy) in patients with an infertility factor who

underwent an assisted reproductive technique.

**Key words:** Oxidative stress, follicular fluid, Mioxsys

50