

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**IMPACTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO DEL LIQUIDO FOLICULAR
SOBRE LA TASA DE EMBARAZO Y NACIDO VIVO.**

Por

DRA. MARIA EUGENIA ESPINOZA RODRIGUEZ.

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN
GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA**

DICIEMBRE 2023

IMPACTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO DEL LIQUIDO FOLICULAR SOBRE LA TASA DE EMBARAZO Y NACIDO VIVO POST-ICSI

Aprobación de la tesis:



Dr. Otto Valdés Martínez.
Director de tesis.



Dra.C. Selene Marysol García Luna
Co-Director de tesis.



Dr. Óscar Rubén Treviño Montemayor
Coordinador de Investigación.

~~**Dr. Lezmes Dionicio Valdéz Chapa.**
Coordinador de Enseñanza Ginecología y Obstetricia.~~



Dr. Med. Abel Guzmán López
Jefe del Departamento de Ginecología y Obstetricia.



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado.

AGRADECIMIENTOS.

Quiero expresar mi sincero agradecimiento a todas las personas que han contribuido de manera significativa a la realización de esta tesis. Sus esfuerzos y apoyo han sido fundamentales para el éxito de este proyecto.

En primer lugar, quiero agradecer a mi asesor, el Dr. Otto Valdés Martínez por su orientación experta y valiosos consejos a lo largo de todo el proceso de investigación. Su dedicación y paciencia han sido fundamentales para mi crecimiento académico y profesional.

Agradezco también a la Dra. Selene Marysol García Luna por su asesoramiento y comentarios constructivos que enriquecieron la calidad de este trabajo.

Mi reconocimiento especial va a mis padres, el Dr. Ricardo Espinoza Betancé y Lic. Blanca Estela Rodríguez Salas, así como a mis hermanos, Ricardo y Fernanda, por su apoyo inquebrantable y aliento durante los momentos desafiantes. Su comprensión y paciencia han sido un pilar fundamental.

Quiero dedicar unas palabras especiales de agradecimiento a mi pareja, el Dr. Fernando Ramírez Trejo. Tu paciencia y comprensión han sido invaluableles en los momentos de intensidad y desafío. Gracias por estar a mi lado, escucharme, alentarme y entender las demandas que la residencia ha tenido en nuestra vida cotidiana.

No puedo pasar por alto el espíritu solidario y la colaboración constante de todos mis compañeros residentes. Cada uno de ustedes ha contribuido de manera única, creando un ambiente de aprendizaje y apoyo mutuo que ha hecho de esta experiencia algo inolvidable. Gracias por ser más que compañeros, colaboradores comprometidos y amigos leales en este viaje académico.

Finalmente, agradezco a todos aquellos que, de alguna manera, han contribuido a este proyecto. Cada conversación, crítica y palabra de aliento ha sido invaluable.

Este trabajo no habría sido posible sin el respaldo de estas personas y entidades. Gracias por ser parte de este viaje académico y profesional.

FINANCIAMIENTO

Este trabajo fue financiado parcialmente por el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica PAICYT, UANL, clave: SA 1902-21.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo I	1
Resumen	1
Capítulo II	4
Introducción	4
Capítulo III	13
Hipótesis	13
Capítulo IV	14
Objetivos	14
Capítulo V	15
Material y métodos	15
Capítulo VI	18
Resultados	18
Capítulo VII	25
Discusión	25
Capítulo VIII	29
Conclusión	29
Capítulo IX	30
Bibliografía	30
Capítulo X	33
Resumen autobiográfico	33

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla	Página
1. Edad de las participantes del estudio según el resultado reproductivo	18
2. IMC de las participantes del estudio según el resultado reproductivo	19
3. Edad de las parejas de las participantes del estudio según el resultado reproductivo	19
4. Factores de infertilidad	20
5. Consumo de alcohol de las participantes del estudio	21
6. Consumo de tabaco de las participantes del estudio	21
7. Número de ovocitos (mediana) recuperados según el resultado reproductivo	22
8. Número de ovocitos (mediana) en la muestra según el resultado reproductivo	22
9. Número de embriones transferidos por resultado reproductivo	23
10. Calidad embrionaria con respecto a resultados reproductivos. Embriones calidad óptima (1), calidad regular (2), y no óptima (3)	23
11. sORP de los líquidos foliculares	24

LISTA DE ABREVIATURAS

- FSH:** Hormona foliculo estimulante.
- LH:** Hormona luteinizante.
- LF:** Liquido folicular.
- GH:** Hormona del crecimiento.
- hCG:** Hormona gonadotrofina corionica humana.
- EROS:** Especies reactivas de oxigeno.
- EGF:** Factor del crecimiento epidérmico.
- TGF- α :** Factor de crecimiento transformante alfa.
- LDL:** Lipoproteínas de baja densidad.
- MDA:** Malodialdehido.
- SOD:** Superóxido Dismutasa.
- SxGx:** Peroxidasa dependiente de selenio.
- CAT:** Catalasa.
- GPx:** Glutación peroxidasa.
- TRA:** Terapia de Reproducción Asistida.
- FIV:** Fertilización in vitro.
- ADN:** Ácido desoxirribonucleico.
- ICSI:** Inyección intracitoplasmática de espermatozoides.
- sORP:** Potencial de oxidoreducción.
- NV:** Nacido Vivo.
- P4:** Progesterona.
- E2:** Estradiol.
- SNC:** Sistema nervioso central.

CAPITULO 1

RESUMEN

Introducción.

La foliculogénesis, un proceso cíclico en los ovarios durante el ciclo menstrual implica la maduración de folículos ováricos que contienen ovocitos. Comienza con la activación de folículos en reposo, terminando con la selección de un folículo dominante en cada ciclo. La fase final depende de hormonas gonadotrópicas, con la FSH estimulando el crecimiento y la producción de estradiol, seguido por la dependencia de LH en el folículo dominante.

El líquido folicular, compuesto por diversas moléculas y nutrientes, es esencial para el desarrollo y la calidad ovárica. Incluye hormonas, antioxidantes, citoquinas y metabolitos, facilitando la comunicación y la maduración del ovocito.

El estrés oxidativo, resultado del desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes, afecta procesos reproductivos. Las especies reactivas de oxígeno (EROS) pueden influir en la función celular y en la reproducción, afectando la esteroidogénesis ovárica, la maduración ovocitaria y el desarrollo embrionario.

El sistema antioxidante en el líquido folicular, compuesto por enzimas y vitaminas, contrarresta el estrés oxidativo. Sin embargo, niveles desequilibrados pueden resultar en daño celular y afectar la fertilidad.

Investigaciones han explotado la relación entre estrés oxidativo y resultados de fertilización in vitro (FIV). Se ha observado que altos niveles de EROS pueden influir en la calidad de los ovocitos y embriones, afectando la tasa de fertilización y la implantación exitosa.

Estudio sugieren que la gestión de condiciones del cultivo embrionario y la suplementación antioxidante pueden mejorar resultados clínicos. Además, la medición de biomarcadores de estrés oxidativo en el líquido folicular podría ser indicativa de fertilidad.

En resumen, el estrés oxidativo en el contexto de la foliculogénesis y la FIV impacta la calidad ovárica y los resultados reproductivos, destacando la importancia de equilibrar las condiciones ambientales y la suplementación antioxidante en la práctica clínica.

Objetivo

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

Material y Métodos.

Se llevó a cabo un estudio prospectivo no aleatorizado en pacientes con diagnóstico de infertilidad primaria o secundaria que recibieron tratamiento de fertilidad con técnicas de alta complejidad (FIV/ICSI) en el centro Universitario de Medicina Reproductiva del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, durante el periodo octubre 2020 a octubre 2021.

Después se obtuvo líquido folicular el cual fue analizado en el sistema MiOXSYS el cual mide el potencial de oxidoreducción (sORP).

Resultados.

En este estudio se observó que los niveles de estrés oxidativo, medidos como el potencial de oxidoreducción estático (sORP), no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de resultado reproductivo: nacido vivo, sin nacido vivo y con prueba de embarazo positiva.

Conclusión.

En conclusión, este estudio no reveló diferencias estadísticamente significativas en los niveles de estrés oxidativo en el líquido folicular con respecto a los resultados reproductivos en pacientes sometidas a FIV. El papel preciso de las especies reactivas de oxígeno (EROS) en los métodos de reproducción asistida aun no está completamente claro y requiere una investigación más extensa. Las discrepancias en opiniones y resultados pueden deberse a variaciones en los métodos de prueba, los resultados evaluados y la limitada cantidad de estudios relevantes publicados. Es crucial llevar a cabo más investigaciones para entender los mecanismos subyacentes de la función de las EROS en la fertilidad femenina. Este enfoque de investigación adicional podría proporcionar información crucial y facilitar el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para mejorar los resultados en los métodos de reproducción asistida.

CAPÍTULO II

INTRODUCCIÓN

1. Marco Teórico

Ciclo ovárico /desarrollo folicular

La foliculogénesis es un proceso cíclico que ocurre en los ovarios durante el ciclo menstrual, es el proceso mediante el cual los folículos ováricos que contienen ovocitos maduran en los ovarios de la mujer, este comienza cuando los folículos que se encuentran en reposo se activan y dejan la reserva ovárica y termina con la selección de un folículo dominante en cada ciclo menstrual.(1)

La etapa final de la foliculogénesis engloba la formación de un folículo antral y este proceso depende de hormonas gonadotrópicas, la hormona folículo estimulante (FSH) influye en el crecimiento de los folículos antrales hasta que uno, usualmente el más grande, logra la producción de estradiol, de esta manera suprimiendo la FSH y pasando a depender de la hormona luteinizante (LH), al folículo que logra este proceso se le denomina folículo dominante. Durante este proceso de selección de folículo, la ovogénesis también toma lugar y comprende una fase de crecimiento seguida de capacitación y por último maduración del ovocito, estos eventos permiten la formación de un ovocito capaz de ser fecundado y con el subsecuente desarrollo de un embrión.(2)

El folículo ovárico constituye un microambiente encargado de la producción de ovocitos de calidad, proporcionando soporte y supliendo los nutrientes necesarios para su crecimiento y

maduración hasta su liberación hacia la trompa uterina (3). El folículo antral forma una cavidad que se llena de líquido el cual se denomina líquido folicular, el cual rodea al ovocito en desarrollo y juega un papel fundamental en la fertilización y desarrollo del embrión.(4)

Líquido Folicular

El líquido folicular (LF) está conformado por varias moléculas derivadas de las células de la granulosa, así como de nutrientes y moléculas del torrente sanguíneo proveniente de los capilares presentes en el ovario y tiene un impacto en el desarrollo embrionario. (3,5)

Los principales componentes del LF son proteínas y hormonas esteroideas como la hormona foliculoestimulante (FSH), hormona luteinizante (LH), hormona de crecimiento (GH), la hormona gonadotrofina coriónica humana (hCG), progesterona (P4) y estradiol (E2), citoquinas, electrolitos, especies reactivas de oxígeno (EROS), moléculas antioxidantes como vitamina E, catalasa y melatonina, factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), metabolitos como aminoácidos y lípidos, los cuales se acumulan dentro del ovocito indicando una comunicación entre este y el LF contribuyendo a su diferenciación y maduración. (3)

Estrés Oxidativo.

En todos los organismos compuestos por células que viven en condiciones aeróbicas, el oxígeno es indispensable para su supervivencia, sin embargo, también puede ser perjudicial, y estos organismos se enfrentan a la “paradoja del oxígeno”, en la cual se necesita oxígeno para vivir, pero algunos productos de su metabolismo como las especies reactivas de oxígeno (EROS) las cuales engloban las moléculas reactivas y radicales libres pueden modificar funciones celulares,

o producir apoptosis celular (6). A raíz de esto, los organismos han creado mecanismos de defensa para lograr un equilibrio entre la generación y la eliminación de EROS, aunque a pesar de estos mecanismos antioxidantes el daño oxidativo sigue siendo inevitable.(7)

Las EROS han sido involucradas tanto en procesos fisiológicos como patológicos, dentro de los roles fisiológicos se encuentra: la regulación del envejecimiento, fortalecimiento del sistema inmune, su participación en la función cognitiva por medio de los mecanismos de señalización células del SNC, su rol en la fertilidad se ha relacionado con maduración y capacitación del espermatozoide; en cuanto a los procesos patológicos, se han vinculado con la infertilidad masculina ya que los espermatozoides no cuentan con enzimas necesarias para controlar el daño oxidativo, en cuanto a la infertilidad femenina, se han asociado los niveles de EROS en el líquido peritoneal con la presencia de infertilidad, también tiene participación en la fisiopatología del cáncer (7).

Aunque la producción controlada de radicales de oxígeno en el cuerpo humano es necesaria para funciones fisiológicas, cuando esta sobrepasa la capacidad antioxidante generalmente son dañinas para la función tisular, resultando en estrés oxidativo (4), el cual resulta del desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes, y produce moléculas activadas llamadas especies reactivas de oxígeno (EROS), las cuales pueden alterar la función celular y los procesos fisiológicos de las células, así como algunos procesos de reproducción como la esteroidogénesis ovárica, maduración ovocitaria, formación de blastocistos, implantación, y el mantenimiento del cuerpo lúteo en el embarazo. (5)

Las EROS a pesar de ser el resultado del estrés oxidativo, podrían contribuir aún más a este a través de la peroxidación de lípidos, sus productos de degradación y los productos que provienen de la interacción con lipoproteínas de baja densidad (LDL) y otras proteínas. La descomposición

de estas moléculas tiene como producto el malondialdehído (MDA) el cual desencadena la producción de anticuerpos lo cual afecta la capacidad de fertilización y desarrollo embrionario.(8)

Sistema Antioxidante

Dentro del microambiente que se crea en el LF existe un sistema antioxidante conformado por: el superóxido dismutasa (SOD), glutatión, peroxidasa dependiente de selenio (SeGPx), catalasa (CAT), tiorredoxina, y glutatión peroxidasa (GPx) así como las vitaminas A, C y E.(8)

In vitro los embriones humanos están en contacto a concentraciones más altas de oxígeno que in vivo, y tienen mayor riesgo de ser afectados por el estrés oxidativo teniendo como consecuencia una mala calidad de embriones. Sin embargo, en el líquido folicular de mujeres sometidas a TRA se han detectado EROS, las cuales sugieren son parte de la actividad metabólica necesaria para el crecimiento folicular y el logro de un embarazo (4).

2. Antecedentes

El equipo de Elizur y colaboradores llevó a cabo una evaluación del papel del estrés oxidativo en el proceso de envejecimiento ovárico. Para ello, obtuvieron dos folículos de mujeres sometidas a fertilización in vitro y determinaron los niveles de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Posteriormente, desarrollaron embriones de baja y alta calidad. Sus hallazgos indicaron que durante el proceso de envejecimiento ovárico, existe un incremento gradual en los niveles de peróxido de hidrógeno a nivel folicular. Finalmente, cuando la reserva ovárica se agota, los niveles de esta molécula disminuyen drásticamente. (9)

Como se mencionó anteriormente, el desarrollo ovocitario y la fertilización se ven fuertemente influenciados por el microambiente del líquido folicular. Artini y su equipo evaluaron la concentración de especies reactivas de oxígeno (EROS) en el líquido folicular durante la extracción de ovocitos en el proceso de FIV, un antecedente directo de nuestro estudio. Establecieron una correlación entre los niveles séricos de estas moléculas y el número de ovocitos maduros y fertilizados. Sus hallazgos indicaron que una alta actividad antioxidante y una menor concentración de moléculas proinflamatorias son necesarias para lograr tasas adecuadas de fertilización, embriones de alta calidad y una exitosa implantación embrionaria. Posteriormente, sugirieron que la gestión de las condiciones del cultivo embrionario y la suplementación antioxidante podrían contribuir a mejorar los resultados clínicos. En línea con esta conclusión, Luddi y su equipo demostraron que el tratamiento basado en la suplementación con micronutrientes, iniciado tres meses antes de la FIV, podría proteger el microambiente folicular del estrés oxidativo e incrementar el número de ovocitos de alta calidad recuperados. (10)

Gongdashetti y colaboradores llevaron a cabo un estudio observacional con el propósito de identificar los biomarcadores de estrés oxidativo en el líquido folicular de mujeres con diagnóstico de ovario poliquístico sometidas a FIV. Descubrieron que los niveles de EROS, la capacidad antioxidante total y el 8-isoprostano eran más altos en este grupo de pacientes. A pesar de no encontrar diferencias estadísticamente significativas en estos valores con respecto a las tasas de embarazo exitosos, observaron que los niveles de 8-isoprostano eran superiores en mujeres que experimentaron abortos espontáneos. Este compuesto se produce a través de la peroxidación del ácido araquidónico. Los autores sugirieron que la medición de este marcador, así como el estado antioxidante en el folículo ovárico, podrían mejorar la tasa de embarazos exitosos. (11)

Tural y su equipo investigaron el impacto negativo del estrés oxidativo en los ovocitos obtenidos a través de la FIV. Evaluaron la actividad enzimática de la catalasa-glutación-S-transferasa, el malondialdehído y la arylesterasa en el cúmulo oophorus de pacientes con diferentes respuestas a la terapia de FIV (no respondedoras, normo respondedoras y altamente respondedoras). Descubrieron que la actividad de la glutación-S-transferasa estaba aumentada y que los niveles de malondialdehído estaban disminuidos en las mujeres altamente respondedoras. Argumentaron que el desequilibrio entre las EROS y los antioxidantes presentes en el líquido folicular, a favor de las EROS, podría resultar en un aumento del estrés oxidativo y la apoptosis celular. (12)

En su revisión narrativa, Kala y colaboradores exploraron la importancia de las EROS y los antioxidantes en el desarrollo y la maduración ovocitaria. Explicaron que estas moléculas funcionan de manera sincrónica en la función ovulatoria, y debido a un metabolismo activo y esteroidogénesis, la producción de EROS es alta en los tejidos reproductivos. Un desequilibrio en estos sistemas podría conducir a una disfunción ovulatoria, aunque el mecanismo exacto de interacción aún no se comprende por completo. (13)

Nishihara y su equipo examinaron la relación entre el estado oxidativo y antioxidativo en el líquido folicular de mujeres sometidas a fertilización in vitro y transferencia embrionaria. Estudiaron a un total de 117 mujeres infértiles y tomaron muestras de líquido folicular al momento de la extracción de los ovocitos. Evaluaron la capacidad antioxidante total, los niveles de glutación y la 8-hidroxi-2'-deoxyguanosina y concluyeron que estos indicadores se encontraban alterados y podrían funcionar como marcadores de fertilidad. (14)

El estrés oxidativo a nivel folicular puede influir en la tasa de obtención de ovocitos y embriones de alta calidad en mujeres infértiles sometidas a FIV de varias maneras. El estrés oxidativo puede causar daño al ADN en los ovocitos y espermatozoides. Cuando los folículos contienen altos niveles de especies reactivas de oxígeno (EROS), como los radicales libres, pueden dañar el ADN de los ovocitos en desarrollo. Esto puede resultar en ovocitos de baja calidad, con un mayor riesgo de aneuploidía (número anormal de cromosomas) y dificultades para la fertilización.

Además, puede afectar negativamente la calidad de los ovocitos, lo que significa que son menos propensos a fertilizarse y desarrollarse en embriones de alta calidad. Los ovocitos de baja calidad pueden no llegar a la etapa de blastocisto, que es recomendada para una transferencia exitosa en la FIV. El estrés oxidativo influye en la respuesta ovárica a la estimulación de la FIV. Los altos niveles de ROS pueden afectar la maduración de los folículos y disminuir el número de ovocitos obtenidos en un ciclo de FIV. Por último, una vez que se fertilizan los ovocitos, el estrés oxidativo puede seguir afectando el desarrollo embrionario. Puede dar lugar a la formación de embriones de baja calidad, que tienen menos posibilidades de implantarse con éxito en el útero de la mujer. (15,16)

3. Definición del problema de investigación

El estrés oxidativo a nivel folicular puede influir en la tasa de obtención de ovocitos y embriones de alta calidad en mujeres infértiles sometidas a fertilización in vitro (FIV) de varias maneras. El estrés oxidativo puede causar daño al ADN en los ovocitos y espermatozoides. Cuando los folículos contienen altos niveles de especies reactivas de oxígeno (EROS), como los radicales libres, pueden dañar el ADN de los ovocitos en desarrollo. Esto puede resultar en ovocitos de baja

calidad, con un mayor riesgo de aneuploidía (número anormal de cromosomas) y dificultades para la fertilización. Además, puede afectar negativamente la calidad de los ovocitos, lo que significa que son menos propensos a fertilizarse y desarrollarse en embriones de alta calidad. Los ovocitos de baja calidad pueden no llegar a la etapa de blastocisto, la cual es necesario para una transferencia exitosa en la FIV. El estrés oxidativo influye en la respuesta ovárica a la estimulación de la FIV. Los altos niveles de EROS pueden afectar la maduración de los folículos y disminuir el número de ovocitos obtenidos en un ciclo de FIV. Por último, una vez que se fertilizan los ovocitos, el estrés oxidativo puede seguir afectando el desarrollo embrionario disminuyendo las posibilidades de implantarse con éxito en el útero de la mujer.

4. Justificación

Realizar un estudio de investigación que determine el impacto de las concentraciones de especies reactivas de oxígeno (EROS) en el líquido folicular y su relación con la madurez ovocitaria óptima y la tasa de implantación en la fertilización in vitro (FIV) sería valioso para ampliar nuestra comprensión de los factores que influyen en el éxito de la FIV, como se ha mencionado en los antecedentes, el estrés oxidativo y sus efectos en el entorno folicular son un área de investigación en evolución en la medicina reproductiva con un gran auge en la última década.

Si se demuestra que existe una correlación entre las concentraciones de EROS en el líquido folicular y la calidad de los ovocitos, esto podría tener importantes implicaciones clínicas. La identificación temprana de folículos con altos niveles de EROS podría permitir intervenciones para mejorar la calidad ovárica y, en última instancia, aumentar las tasas de éxito de la FIV. Los resultados de este tipo de estudio podrían ayudar a personalizar el tratamiento de FIV para

pacientes específicos y ajustar las estrategias de tratamiento, como la administración de antioxidantes o suplementación con micronutrientes previo al embarazo para optimizar los desenlaces clínicos.

La FIV puede ser un proceso costoso y emocionalmente agotador. Si se puede identificar de manera más precisa qué pacientes tienen una mayor probabilidad de éxito, esto podría reducir los costos y la carga emocional asociados con los ciclos de FIV fallidos. Por otra parte, de confirmar nuestra hipótesis, se podría abrir la puerta a investigaciones futuras sobre terapias dirigidas para reducir los efectos del estrés oxidativo en el entorno folicular, lo que podría mejorar las tasas de éxito en la FIV.

5. Originalidad y contribución

El presente estudio contribuiría directamente al conocimiento actual sobre el impacto de las especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes en la tasa de fertilización in vitro exitosa. Una rama de investigación que actualmente se encuentra en auge y de la cuál aún no existe evidencia sólida al respecto, por lo que continuar esta línea de investigación es de gran importancia.

CAPÍTULO III

HIPÓTESIS

El estado antioxidante del líquido folicular contribuye al desarrollo y la maduración del ovocito, y condiciona su calidad y capacidad de fertilizarse, lo que tiene implicaciones en la reproducción asistida.

CAPÍTULO IV

OBJETIVOS

6.1.Objetivo Principal

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

6.2.Objetivos Secundarios

- 6.1.1 Asociar el impacto del estrés oxidativo con el líquido folicular con los resultados de embarazo clínico.
- 6.1.2 Asociar el impacto del estrés oxidativo en el líquido folicular con los resultados de nacido vivo.

CAPÍTULO V

MATERIAL Y MÉTODOS

Tipo y diseño de estudio: Estudio prospectivo, no aleatorizado.

Lugar y sitio: Centro Universitario de Medicina Reproductiva, Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, UANL.

Número de participantes: 25

Características de la población: Mujeres con diagnóstico de infertilidad primaria o secundaria que acudan al (CeUMeR) del Hospital Universitario “José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León entre los años 2020-2021, y que se sometían a un tratamiento de fertilidad con técnicas de alta complejidad (FIV e ICSI).

Criterios de inclusión:

- Mujeres que consulten por infertilidad.
- Edad 18 a 40 años.
- Ingreso al programa de FIV/ICSI.
- Consentimiento informado verbal.
- Sin endometriosis severa.
- Factor masculino normal.

Criterio de exclusión:

- Cancelación de ciclo de estimulación ovárica controlada por mala respuesta.

- Obesidad
- Historia de cirugía pélvica en los últimos 3 meses.
- Pacientes en las que no se obtengan óvulos.

Metodología

Se realizó un estudio prospectivo, no aleatorizado, en pacientes con diagnóstico de infertilidad primaria o secundaria, que acudieron al Centro Universitario de Medicina Reproductiva del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” y que se sometieron a un tratamiento de fertilidad con técnicas de alta complejidad (FIV/ICSI), durante el periodo comprendido del 05 de octubre del 2020 al 02 de octubre del 2021.

Una vez obtenido el consentimiento informado, se procedió a la estimulación ovárica, para este estudio, se seleccionaron algunos ovocitos de cada paciente y se les dio seguimiento hasta la transferencia de embriones. Un embriólogo experimentado realizó la manipulación de ovocitos, incluido el procedimiento de FIV, la evaluación del desarrollo embrionario y la transferencia de embriones frescos.

Posteriormente a la punción folicular se obtuvieron ~6mL del líquido folicular que contenía los ovocitos el cual posteriormente fue separado y centrifugado a 13,000 rpm durante 10 min, posterior a lo cual, aproximadamente 1.5 mL del sobrenadante fueron transferidos a un crio vial, el cual fue mantenido a -80°C hasta el momento de su análisis.

En consecuencia, para obtener el resultado cuantitativo del análisis, la muestra se descongeló y posteriormente se midió en el sistema MiOXSYS (Aytu BioScience, Inc.) siguiendo

las recomendaciones del fabricante, el cual mide la transferencia de electrones en todos los oxidantes y reductores conocidos y desconocidos dentro de la muestra, el sistema mide el potencial de oxidoreducción estático de la muestra (sORP).

Siguiendo las recomendaciones del fabricante, se aplicó una muestra de 30 μ L de LF al sensor que se insertó en el analizador, después del tiempo de análisis, el valor obtenido correspondió al nivel de estrés oxidativo en la muestra.

7. Ética.

El estudio fue aprobado por el comité de ética e investigación de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” con la clave: G120-00014.

8. Análisis de datos.

El análisis estadístico se realizó en GraphPad Prism versión 8.4.2 para Windows. Específicamente, la edad y los niveles de sORP se compararon con una prueba t no pareada, y el IMC y el número de ovocitos se compararon con la prueba U de Mann-Whitney. Los factores de infertilidad, el consumo de tabaco y el alcohol y la calidad del embrión transferido se evaluaron mediante la prueba exacta de Fisher. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

CAPÍTULO VI

RESULTADOS

Se compararon principalmente los valores de sORP de pacientes infértiles que se sometieron a procedimientos de FIV y para los cuales se siguió el embrión o los embriones transferidos desde la recuperación de los ovocitos hasta la transferencia de embriones frescos.

Los datos se agruparon según su resultado reproductivo, en tres grupos: con nacido vivo, sin nacido vivo y con prueba de embarazo negativa. Se comparó la edad de las pacientes en estos grupos, encontrando que no son estadísticamente diferentes ($p=0.282$) (Figura 1), y por lo tanto comparables. Se observó lo mismo en cuanto al IMC de las participantes ($p=0.93$) (Figura 2).

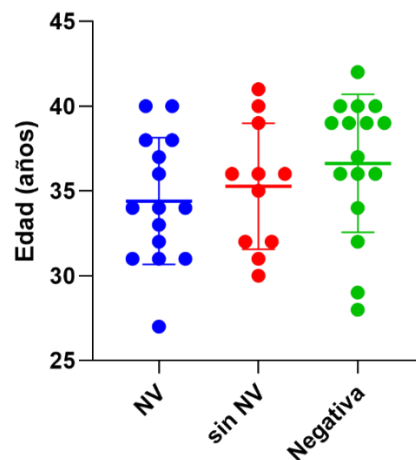


Figura 1.- Edad de las participantes del estudio según el resultado reproductivo.

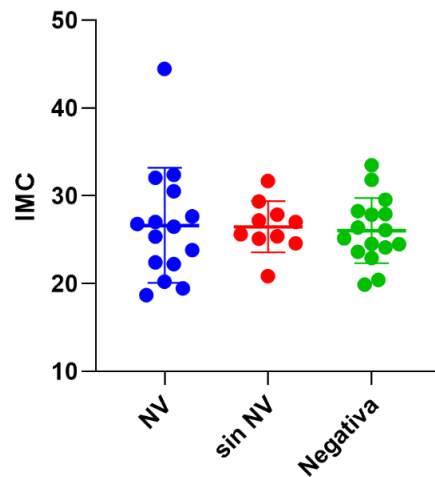


Figura 2.- IMC de las participantes del estudio según el resultado reproductivo.

Sin embargo, en cuanto a la edad de sus parejas, si se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ($p=0.02$). El análisis de comparación múltiple reveló que la edad de las parejas fue superior en aquellos con prueba de embarazo negativa en comparación con los que tuvieron NV ($p=0.003$) sin NV ($p=0.01$).

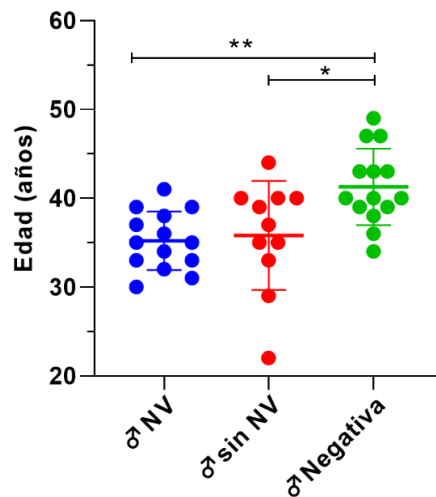


Figura 3.- Edad de las parejas (varón) de las participantes del estudio según el resultado reproductivo.

En cuanto a los factores de infertilidad de las parejas participantes en el estudio, no se evidenció diferencia en la proporción de uno o de múltiples factores de infertilidad con el resultado reproductivo de nacido vivo, sin nacido vivo o una prueba de embarazo negativa ($p>0.05$) (Figura 4).

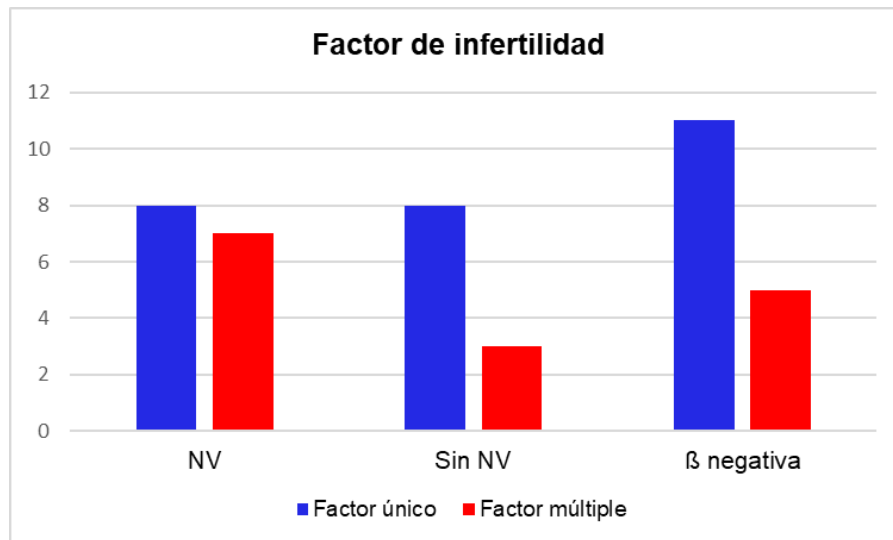


Figura 4.- Factores de infertilidad

En cuanto a sus hábitos de consumo, el consumo de alcohol (Figura 5) y de tabaco (Figura 6), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, con valores de $p> 0.05$.



Figura 5.- Consumo de alcohol de las participantes del estudio

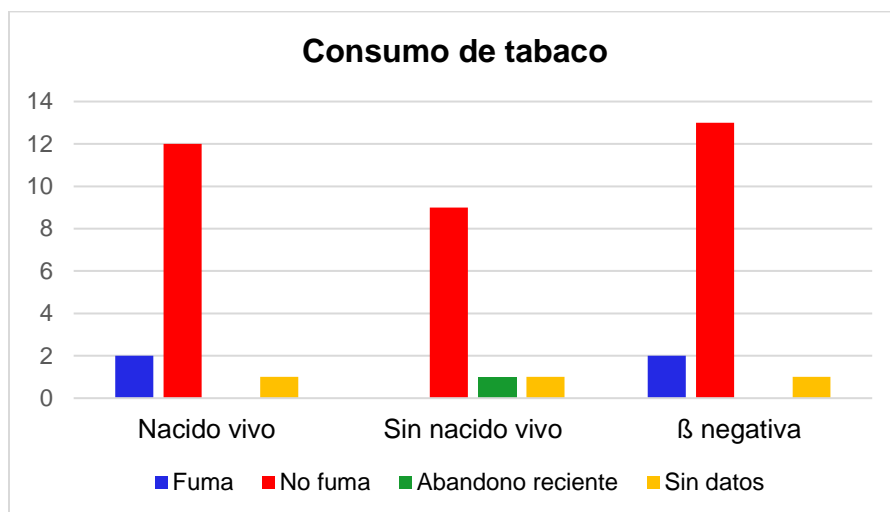


Figura 6.- Consumo de tabaco de las participantes del estudio

En cuanto a los resultados de las técnicas de reproducción asistida de estas parejas. No se encontró diferencia en el número de ovocitos recuperados por grupo ($p=0.63$) (Figura 7). Sin embargo, el número de ovocitos obtenidos en el líquido folicular que fue evaluado si presentó diferencia estadísticamente significativa ($p=0.04$) (Figura 8), la comparación múltiple reveló una diferencia entre los grupos de pacientes con NV y con prueba de embarazo negativa ($p=0.04$).

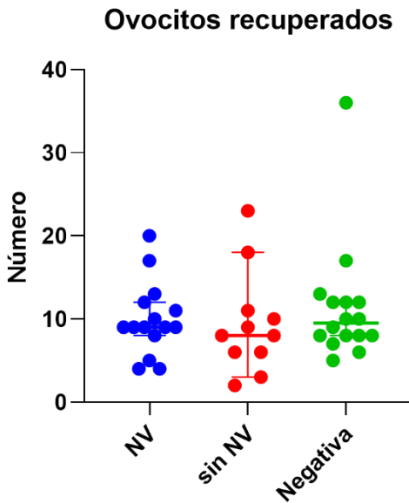


Figura 7.- Número de ovocitos (mediana) recuperados según el resultado reproductivo.

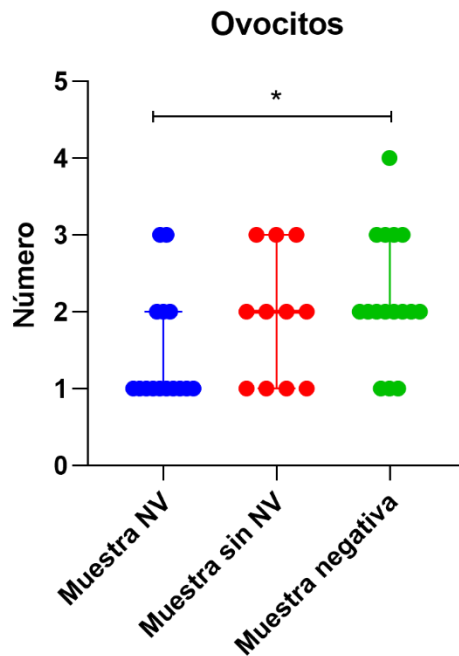


Figura 8.- Número de ovocitos (mediana) en la muestra según el resultado reproductivo.

No se encontraron diferencias entre el número de embriones transferidos que dieron lugar a un nacido vivo y sin nacido vivo (0.632) y aquellos que dieron lugar a una prueba negativa o sin nacido vivo ($p=0.60$) (Figura 9).

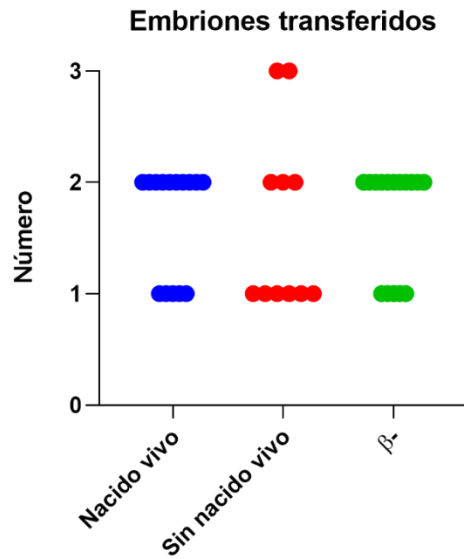


Figura 9.- Número de embriones transferidos por resultado reproductivo.

Con respecto a la calidad de los embriones transferidos y los resultados reproductivos no se observaron diferencias con respecto a la calidad de los embriones con nacido vivo y sin nacido vivo ($p=0.202$), y la calidad de aquellos que dieron lugar a una prueba negativa o sin nacido vivo (0.659) (Figura 10).

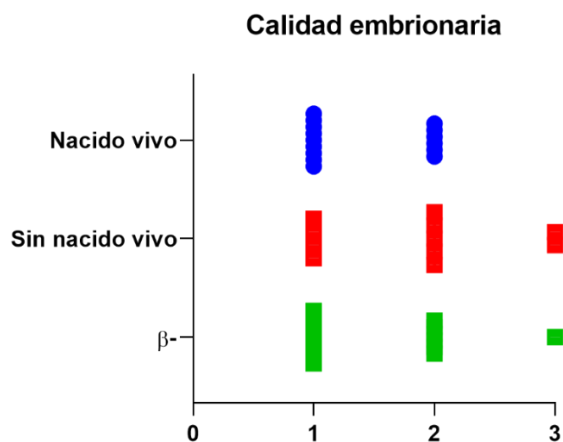


Figura 10.- Calidad embrionaria con respecto a resultados reproductivos. Embriones calidad óptima (1), calidad regular (2), y no óptima (3).

En cuanto a los niveles de estrés oxidativo denotados como sORP, no se encontraron diferencias en las medianas de los valores de sORP entre los grupos ($p=0.732$). Siendo estas de 142.2 (IQR 124.9-159), 143.3 (IQR 132.4-163.2) y 154.5 (IQR 129-166) (Figura 11).

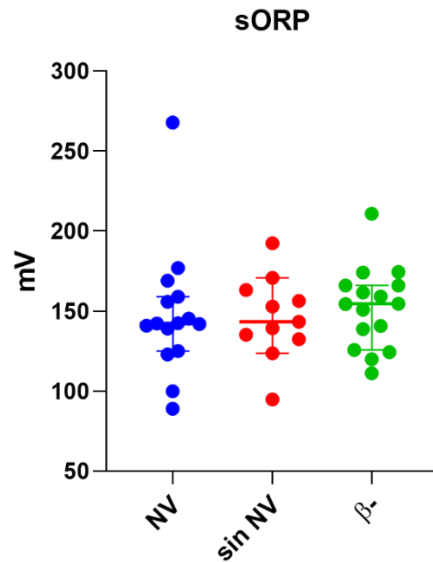


Figura 11.- sORP de los líquidos foliculares

CAPITULO VII

DISCUSIÓN

Las especies oxidantes son productos de la actividad metabólica normal que, en concentraciones fisiológicas, desempeñan funciones fundamentales tanto a nivel celular como sistémico. En el sistema reproductor femenino y en el desarrollo embrionario, se cree que las especies reactivas de oxígeno desempeñan un papel importante, ya que participan en la esteroidogénesis, ovulación ovárica, maduración de ovocitos, compactación de embriones y blastocistos sin embargo, el deterioro del equilibrio fisiológico entre la producción y eliminación estos compuestos puede provocar daño mediado por estrés oxidativo resultando en la alteración de las estructuras celulares, lo que en última instancia conduce a la muerte celular (17,18). Se cree que el estado antioxidante del líquido folicular contribuye al desarrollo y la maduración del ovocito, y condiciona su calidad y capacidad de fertilizarse, (19) sin embargo, el efecto que tienen las concentraciones de EROS en el líquido folicular sobre los desenlaces en técnicas de reproducción asistida aún no se ha caracterizado completamente.

En el presente estudio se evaluó el impacto de las concentraciones de especies reactivas de oxígeno en el líquido folicular sobre resultados reproductivos en pacientes sometidas a fertilización in vitro (FIV-ICSI) y transferencia de embriones. Se encontró que los niveles de estrés oxidativo denotados como potencial de oxidorreducción estático de la muestra (sORP) de líquido folicular no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de pacientes con: nacido vivo, sin nacido vivo y/o con prueba de embarazo negativa ($p=0.732$).

Jozwik et al. reportaron observaciones similares, que sugieren que la concentración de marcadores de estrés oxidativo en el líquido folicular no refleja el potencial de fertilización de los

ovocitos, en este estudio además observó una correlación negativa significativa entre el nivel de EROS en el líquido folicular y la calidad del embrión. (20)

De manera similar, Jana et al. identificaron una asociación negativa entre el incremento en los niveles EROS y los resultados de la FIV, informaron además que el aumento de los niveles de EROS en el líquido folicular estaba vinculado con una disminución en la calidad del embrión. Establecieron un valor de corte alrededor de ~107 EROS/400 μ l de líquido folicular, más allá del cual la probabilidad de desarrollar embriones de alta calidad era reducida. Se evidenció que los valores de EROS que superan este umbral tenían un impacto negativo en la calidad de los ovocitos, la maduración, la fertilización y la formación de embriones, mientras que niveles considerablemente más bajos (<100 EROS) se asociaron con una buena calidad embrionaria. (21)

Por otro lado, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el número de ovocitos recuperados por grupo ($p=0.63$) hallazgos en concordancia con S. Das et. al., en 2006 cuyo estudio no reveló una asociación significativa entre la maduración de los ovocitos y los niveles de EROS en el líquido folicular. (6) Sin embargo, el número de ovocitos obtenidos en el líquido folicular que fue evaluado si presentó diferencia estadísticamente significativa entre los grupos, la comparación múltiple reveló una diferencia entre los grupos de pacientes de nacido vivo y con prueba de embarazo negativa ($p=0.04$)

Este estudio posee limitaciones en relación al tamaño de muestra, un número de muestra mayor podría brindar al estudio mayor validez interna y por tanto brindar conclusiones estadísticamente significativas para contrastar con la literatura actual. Cabe destacar que en este estudio se analizó la tasa de nacido vivo, desenlace que es considerado un marcador fiable de cualquier investigación de intervención médica en reproducción asistida y por lo tanto una

fortaleza del estudio ya que, considerando su importancia, este desenlace debe utilizarse para evaluar el impacto en las intervenciones. A pesar de ello mucha de la literatura existente en la que se respalda el papel que desempeña el estrés oxidativo sobre el potencial de fertilización de los ovocitos no analiza la tasa de nacido vivo como cómo medida de resultado primaria. Adicionalmente debe tomarse en consideración que el sORP del líquido folicular se midió con el sistema MiOXSYS (Aytu BioScience, Inc.) el cual está diseñado para medir el estrés oxidativo para muestras de semen. En este estudio, se buscó introducir una innovación al emplear este dispositivo para analizar una matriz distinta, específicamente el líquido folicular no obstante, se recomienda abordar la interpretación de los resultados con precaución.

Actualmente, el papel de las EROS en relación con la reproducción humana sigue sin estar claro, esta confusión resulta de los diferentes materiales empleados al llevar a cabo las técnicas de reproducción como pueden ser diferencias en el fluido folicular, embriones y medio de cultivo, así como diferencias en métodos de ensayo tales como capacidad antioxidante total, enzimas antioxidantes y los diversos criterios de valoración empleados desde presencia de un ovocito, fertilización, hasta viabilidad del embrión y embarazo, tales diferencias conducen a una amplia heterogeneidad en la literatura existente y una dificultad notoria a la hora de interpretar y contrastar estos resultados.

Existe también una amplia variabilidad observada en los niveles de EROS en el líquido folicular, así como a la falta de un valor de referencia para mujeres fértiles sanas. En consecuencia, es difícil determinar si los niveles de EROS en el líquido folicular se encuentran en un rango fisiológico o patológico. Estudios posteriores deberían centrarse en determinar puntos de corte en los niveles de EROS en el líquido folicular para la determinación de un umbral de inhibición de la calidad del embrión y que permitan 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.

Es necesario realizar más estudios para aclarar las funciones fisiológicas y patológicas del estrés oxidativo y su relación con la reproducción femenina, ya que podrían conducir al desarrollo de nuevas estrategias para la regulación de la fertilidad en el ser humano, así mismo, se puede lograr una mejor comprensión investigando el papel de la actividad antioxidante en el líquido folicular bajo métodos estandarizados para contrarrestar la alta heterogeneidad existente de estudio a estudio.

Capítulo VIII

CONCLUSIÓN

Mediante los resultados de este trabajo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en relación al impacto del estrés oxidativo en el líquido folicular entre los desenlaces reproductivos en pacientes sometidas a FIV-ICSI.

Actualmente, el papel de las EROS en los métodos de reproducción asistida aún no se ha dilucidado completamente y requiere más investigación. Las opiniones y resultados contradictorios podrían atribuirse a los diferentes métodos de ensayo y desenlaces evaluados, así como al número limitado de estudios relevantes publicados. Es esencial realizar más investigaciones para definir los mecanismos subyacentes de la función de las EROS en la fertilidad femenina. Dicha investigación podría contribuir a obtener información importante y fomentar el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para contribuir a mejores desenlaces en métodos de reproducción asistida.

CAPÍTULO IX

BIBLIOGRAFÍA

1. Gougeon A. Croissance folliculaire dans l’ovaire humain: de l’entrée en croissance du follicule primordial jusqu’à la maturation préovulatoire. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2010 May;71(3):132–43.
2. Hennet ML, Combelles CMH. The antral follicle: A microenvironment for oocyte differentiation. *International Journal of Developmental Biology*. 2012;56(10–12):819–31.
3. Basuino L, Silveira CF. Human follicular fluid and effects on reproduction. *J Bras Reprod Assist*. 2016;20(1):38–40.
4. Attaran M, Pasqualotto E, Falcone T, Goldberg JM, Miller KF, Agarwal A, et al. The Effect of Follicular Fluid Reactive Oxygen Species on the Outcome of In Vitro Fertilization. 2000.
5. Pizarro BM, Cordeiro A, Reginatto MW, Campos SPC, Mancebo ACA, Areas PCF, et al. Estradiol and Progesterone Levels are Related to Redox Status in the Follicular Fluid During In Vitro Fertilization. *J Endocr Soc*. 2020;4(7):1–18.
6. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction.
7. Bardaweel SK, Gul M, Alzweiri M, Ishaqat A, Alsalamat HA, Bashatwah RM. Reactive oxygen species: The dual role in physiological and pathological conditions of the human body. Vol. 50, *Eurasian Journal of Medicine*. AVES İbrahim KARA; 2018. p. 193–201.
8. Huang B, Li Z, Ai J, Zhu L, Li Y, Jin L, et al. Antioxidant capacity of follicular fluid from patients undergoing in vitro fertilization. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(5):2273–82.

9. Elizur SE, Lebovitz O, Orvieto R, Dor J, Zan-Bar T. Reactive oxygen species in follicular fluid may serve as biochemical markers to determine ovarian aging and follicular metabolic age. *Gynecol Endocrinol.* 2014;30(10):705–7.
10. Artini PG, Scarfò G, Marzi I, Fusi J, Obino ME, Franzoni F, et al. Oxidative Stress-Related Signaling Pathways Predict Oocytes' Fertilization In Vitro and Embryo Quality. *Int J Mol Sci.* 2022;23(21).
11. Gongdashetti K, Gupta P, Dada R, Malhotra N. Follicular fluid oxidative stress biomarkers and art outcomes in PCOS women undergoing in vitro fertilization: A cross-sectional study. *Int J Reprod Biomed.* 2021;19(5):449–56.
12. Tural R, Karakaya C, Erdem M, Aykol Z, Karabacak RO, Kavutçu M. Investigation of oxidative stress status in cumulus cells in patients with in vitro fertilization. *Turkish J Med Sci.* 2021;51(4):1969–75.
13. Kala M, Shaikh MV, Nivsarkar M. Equilibrium between anti-oxidants and reactive oxygen species: a requisite for oocyte development and maturation. *Reprod Med Biol.* 2017;16(1):28–35.
14. Nishihara T, Matsumoto K, Hosoi Y, Morimoto Y. Evaluation of antioxidant status and oxidative stress markers in follicular fluid for human in vitro fertilization outcome. *Reprod Med Biol.* 2018;17(4):481–6.
15. Askoxylaki M, Siristatidis C, Chrelias C, Vogiatzi P, Creatsa M, Salamalekis G, et al. Reactive oxygen species in the follicular fluid of subfertile women undergoing in Vitro Fertilization: A short narrative review. *J Endocrinol Invest.* 2013;36(11):1117–20.
16. Agarwal A, Rosas IM, Anagnostopoulou C, Cannarella R, Boitrelle F, Munoz LV, et al. Oxidative Stress and Assisted Reproduction: A Comprehensive Review of Its Pathophysiological Role and Strategies for Optimizing Embryo Culture Environment. *Antioxidants.* 2022;11(3).

17. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* [Internet]. 2005 Jul 14 [cited 2023 Dec 10];3:28. Available from: [/pmc/articles/PMC1215514/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14561807/)
18. Carbone MC, Tatone C, Delle Monache S, Marci R, Caserta D, Colonna R, et al. Antioxidant enzymatic defences in human follicular fluid: characterization and age-dependent changes. *Mol Hum Reprod* [Internet]. 2003 Nov [cited 2023 Dec 10];9(11):639–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14561807/>
19. Jozwik M, Wolczynski S, Jozwik M, Szamatowicz M. Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans. *Mol Hum Reprod* [Internet]. 1999 May [cited 2023 Dec 10];5(5):409–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10338363/>.
20. Jana SK, K NB, Chattopadhyay R, Chakravarty B, Chaudhury K. Upper control limit of reactive oxygen species in follicular fluid beyond which viable embryo formation is not favorable. *Reprod Toxicol* [Internet]. 2010 [cited 2023 Dec 10];29(4):447–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20406678/>
21. Das S, Chattopadhyay R, Ghosh S, Ghosh S, Goswami SK, Chakravarty BN, et al. Reactive oxygen species level in follicular fluid--embryo quality marker in IVF? *Hum Reprod* [Internet]. 2006 [cited 2023 Dec 10];21(9):2403–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16861701/>

CAPÍTULO X

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Dra. María Eugenia Espinoza Rodríguez

Candidato para el Grado de Especialista en Ginecología y Obstetricia

Tesis: IMPACTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO DEL LIQUIDO FOLICULAR SOBRE LA TASA DE EMBARAZO Y NACIDO VIVO.

Campo de estudio: Ciencias de la Salud

Biografía:

Datos personales: nacida en Parral, Chihuahua, el 16 de febrero de 1993.

Estado civil: Soltera

Grado de estudio: Médico Cirujano y Partero por la Universidad Autónoma de Nuevo León, graduado en 2019

Trayectoria

Obtuve mis estudios desde primaria hasta preparatoria en el Instituto Parralense A.C. en la ciudad de Parral, Chihuahua. Posteriormente cursé mis estudios de Médico Cirujano y Partero en la Universidad Autónoma de Nuevo León entre el 2012 y el 2019. Durante este periodo tuve la oportunidad de participar en un programa de servicio comunitario en Houston TX, en una clínica para la mujer sin seguro médico “El Buen Samaritano”, la cual contribuyó a mi interés por la salud de la mujer.

Realicé mi servicio social en el Departamento de Oncología, del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”. Continué mi educación de posgrado en el programa de Ginecología y Obstetricia en el Hospital Universitario “José E. González” en marzo del 2020 con sólida base teoría y práctica. Durante este periodo me desempeñé como jefa de residentes durante el periodo marzo 2023- febrero 2024 y realicé mi rotación de campo en el Hospital General “Dr. Arroyo” en el periodo marzo-junio 2023. Este periodo no solo amplió mis conocimientos, sino que también me proporcionó la oportunidad de colaborar con destacados académicos, lo que enriqueció mi perspectiva y enfoque hacia mi área de estudio. A medida que avanzaba en mi carrera me di cuenta de mi fascinación particular por Biología de la reproducción, este interés guió mi elección de cursos y proyectos de investigación.

La génesis de esta tesis se encuentra en la convergencia de mis intereses, las experiencias de investigación previas y el estímulo intelectual recibido durante mi formación académica. A lo largo de este proceso, he enfrentado desafíos que han fortalecido mi residencia y habilidades de resolución de problemas, fundamentales para la culminación de este proyecto.

En resumen, mi trayectoria personal representa un compromiso continuo con la excelencia académica, el crecimiento intelectual y el deseo constante de contribuir al conocimiento. Esta tesis no solo es el resultado de la investigación sistémica, sino también hito significativo en mi desarrollo académico y profesional.