



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**Instituto Nacional de Perinatología  
Isidro Espinosa de los Reyes**

**“Capacidad total antioxidante y estrés oxidativo  
en pacientes infértiles con endometriosis”**

**Tesis**

**Que para obtener el título de especialista en:  
Biología de la Reproducción Humana**

**PRESENTA  
JORGE GARCÍA VARGAS**

**DR. JULIO FRANCISCO DE LA JARA DIAZ  
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE ESPECIALIZACION**

**DR. RICARDO ADAME PINACHO  
DIRECTOR DE TESIS Y ASESOR CLINICO**

**D.C. ALBERTO MARTIN GUZMAN GRENFELL  
M.C SALVADOR ESPINO Y SOSA  
ASESORES METODOLÓGICOS**



**MEXICO, D. F. JULIO 2012**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

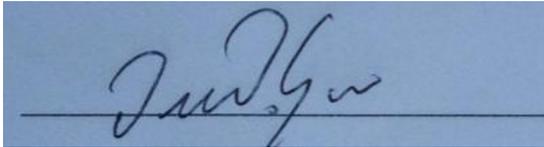
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

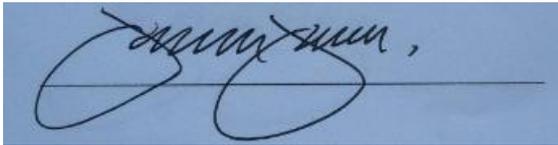
TITULO DE TESIS

“Capacidad total antioxidante y estrés oxidativo en pacientes infértiles con endometriosis”

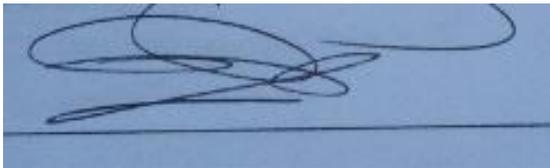
DRA. VIRIDIANA GORBEA CHAVEZ  
DIRECCION DE ENSEÑANZA

A blue rectangular box containing a handwritten signature in black ink, positioned above a horizontal line.

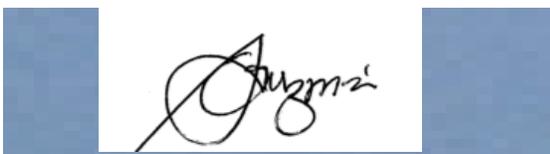
DR. JULIO FRANCISCO DE LA JARA DIAZ  
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE LA SUBESPECIALIDAD EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION HUMANA

A blue rectangular box containing a handwritten signature in black ink, positioned above a horizontal line.

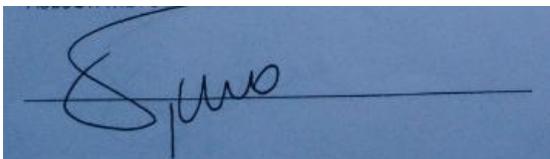
DR. RICARDO ADAME PINACHO  
DIRECTOR DE TESIS Y ASESOR CLINICO

A blue rectangular box containing a handwritten signature in black ink, positioned above a horizontal line.

D. C. ALBERTO MARTIN GUZMAN GRENFELL  
ASESOR METODOLOGICO

A white rectangular box containing a handwritten signature in black ink, flanked by blue vertical bars on both sides, positioned above a horizontal line.

M.C. SALVADOR ESPINO Y SOSA  
ASESOR METODOLOGICO

A blue rectangular box containing a handwritten signature in black ink, positioned above a horizontal line.

**Capacidad total antioxidante y estrés oxidativo en mujeres con infertilidad asociada  
a endometriosis**

García-Vargas J<sup>a</sup>, Guzmán-Grenfell AM<sup>b</sup>, Adame-Pinacho R<sup>a</sup>, Torres-Ramos YD<sup>b</sup>, De la Jara-Díaz JF<sup>a</sup>, Montoya-Estrada A<sup>b</sup>, Espino y-Sosa S<sup>c</sup>.

<sup>a</sup> Coordinación de Infertilidad, Subdirección de Medicina de la Reproducción, <sup>b</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Subdirección de Investigación Biomédica y <sup>c</sup> Médico Investigador, Subdirección de Investigación Clínica, Instituto Nacional de Perinatología, Ciudad de México, México.

## RESUMEN

### Objetivo

- Estudiar el nivel de capacidad total antioxidante en relación a marcadores de estrés oxidativo en plasma de pacientes con infertilidad asociada a endometriosis.

### Diseño

- Estudio experimental, tipo transversal.

### Lugar

- Coordinación de Infertilidad del Instituto Nacional de Perinatología

### Pacientes

- 64 pacientes con infertilidad fueron incluidas en el estudio (24 controles sin endometriosis, 29 con endometriosis grado I y II y 10 pacientes con endometriosis grado III y IV)

### Intervención

- Se obtuvo una muestra sérica al momento de realizar una laparoscopia diagnóstica como parte de su abordaje así como líquido peritoneal de hueco pélvico, estos fueron procesados para su análisis

### Resultados principales

- Se midieron marcadores séricos de estrés oxidativo como productos de degradación de ácidos grasos como lipoperóxidos y malodialdehído, carbonilos, nitritos y nitratos así como la capacidad total antioxidante

## Resultados

- Las mujeres con endometriosis severa tiene una concentración mayor de nitritos y nitratos (14.11 versus 9.09, p 0.004), marcador indirecto de producción de óxido nítrico, aumento que informa de un desacoplamiento de la sintasa de oxido nítrico, a favor de un aumento de la formación de peroxinitrito, un marcador de estrés oxidativo. No se encontraron diferencias significativas entre el grupo de endometriosis contra sin endometriosis. La capacidad total antioxidante en plasma medido por CUPRAC no muestra diferencias significativas entre los grupos.

## Conclusión

- Los hallazgos confirman que en endometriosis severa hay evidencia de un desequilibrio del sistema oxidante a favor de estrés oxidativo, sin embargo este proceso no afecta la capacidad total antioxidante de las pacientes lo cual es de importancia ya que constituye una defensa al estrés oxidativo limitando el daño que ocasiona la endometriosis para el proceso reproductivo.

## Palabras clave

- Estrés oxidativo, endometriosis, infertilidad.

## **ABSTRACT**

### Objective

- To study level of total antioxidant capacity in relationship with markers of oxidative stress in plasma of patients with infertility and endometriosis.

### Design

- Experimental, cross sectional study.

### Setting

- Infertility department at National Institute of Perinatology.

### Patients

- 64 patients with infertility were included (24 controls without endometriosis, 29 with grade I-II endometriosis and 10 with grade III-IV endometriosis).

### Intervention

- Blood was obtained before performing a laparoscopy surgery, as a part of the clinical investigation of infertility. At time of surgery, peritoneal fluid was obtained. Both samples were processed for further analysis.

### Main outcomes measures

- We measured serum markers of oxidative stress , such as degradation products of fatty acids (lipoperoxides and malodialdehyde), carbonils, nitrites-nitrates and total antioxidant capacity.

### Discussion

- Women with severe endometriosis have a higher concentration of nitrites and nitrates (14.11 versus 9.09, p 0.004), which represents an indirect marker of nitric

oxide production. This increase reflects an uncoupling of nitric oxide synthase that favours of increased peroxynitrite formation, a marker of oxidative stress. No significant differences were found between the endometriosis group against without endometriosis. The plasma total antioxidant capacity measured by CUPRAC did not show significant differences between groups.

### Conclusión

- Our findings support evidence about altered balance between pro oxidant and antioxidant activities that generate oxidative stress in severe endometriosis. Although this process does not affect the total antioxidant capacity which is important because this capacity constitutes a defense against oxidative stress so limiting any potential injury to the reproductive process.

### Key words

- Oxidative stress, endometriosis, infertility.

## **ANTECEDENTES**

La endometriosis es una entidad crónica asociada con dolor pélvico, dismenorrea severa, dispareunia, infertilidad, o incluso ser asintomática y ser descubierta de manera incidental (1), siendo el grupo en edad reproductiva el afectado, al ser una entidad estrógeno dependiente. Los factores que conducen a la infertilidad en esta entidad, son diversos y pueden actuar a los diferentes niveles del proceso de la reproducción, desde la folículo génesis, la ovulación y la fecundación, hasta el transporte tubario e implantación del blastocito (2). Adicionalmente, hay evidencia de que existen alteraciones en el líquido peritoneal secundario a un aumento en el número de macrófagos y sus citocinas secretadas (3). A pesar de numerosos estudios publicados, continúa siendo un tema controvertido en cuando a su etiología y patogenia, debido a los múltiples mecanismos descritos. Las teorías clásicas no han logrado proponer un mecanismo patogénico preciso. En los sitios de endometriosis, las células inflamatorias como los eosinófilos, neutrófilos y macrófagos, generan especies reactivas de oxígeno que contribuyen al desarrollo de estrés oxidativo en la cavidad peritoneal lo que lleva a estrés oxidativo aumentando aún más la respuesta inmune en los sitios afectados por quimio atrayentes al inducir la actividad de las células ectópicas endometriales. Esto explicaría el porque las mujeres con endometriosis tienen los peores resultados en técnicas de reproducción asistida hablando de programas como fertilización in vitro, donde se ha propuesto que el estrés oxidativo podría estar involucrado en una menor calidad ovocitaria (4). El estado oxidativo pro inflamatorio del líquido peritoneal es un importante mediador de la endometriosis. Muchos estudios investigaron esta correlación, pero a la fecha también hay resultados que son discrepantes (5).

Bajo condiciones normales, los anti oxidantes como la vitamina E, la vitamina C y el b-caroteno contrarrestan el efecto de las especies reactivas de oxígeno (ERO). Cuando existe un desequilibrio y hay un exceso de las ERO, el estrés oxidativo surge, lo que resulta en daño a diversas biomoléculas (6). La producción de grandes cantidades de ERO, secundaria a un elevado número de macrófagos y leucocitos polimorfonucleares en el líquido peritoneal de pacientes con endometriosis estaría ligada en la cadena de eventos que llevan a infertilidad asociada a endometriosis (7). El aumento en el número y la actividad de los macrófagos en endometriosis se acompaña de una liberación de más citocinas y otros mediadores inmunes tales como el óxido nítrico (NO) (8). El óxido nítrico es un biorregulador con una gran diversidad de funciones. En pequeñas cantidades, el NO es importante en la función ovárica y la implantación embrionaria. Sin embargo, cantidades anormales de el NO y de la enzima sintasa de oxido nítrico endotelial se han observado en el endometrio de las mujeres con endometriosis (9). Esto se debe en parte a que los macrófagos peritoneales expresan cantidades más altas de NOS, tienen una mayor actividad de esta enzima, y han sido demostrado que producen más NO en respuesta a la estimulación inmune in vitro. La producción excesiva de NO se ha asociado con una disminución de la fertilidad mostrando efectos deletéreos sobre la función del oviducto y la movilidad del esperma, y se ha demostrado que es tóxico para los embriones e inhibe la implantación. Por lo que se sugiere que una reducción en la producción de NO o el bloqueo de sus efectos mejoraría la fertilidad en pacientes con endometriosis. Por ejemplo, se ha sugerido que con las técnicas de FIVTE se evitaría el contacto de los gametos y embriones con factores tóxicos peritoneales y oviductales (tales como ERO y peroxinitrito) (10).

En tal sentido, la medición de NO es uno de los parámetros que se emplea para evaluar un desequilibrio al estrés oxidativo. El NO tiene una vida media muy breve lo que hace difícil su medición en fluidos corporales, es por esta razón es por lo que se miden sus metabolitos los nitritos (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) y nitratos (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), que son producto de la oxidación del NO y son relativamente estables en sangre, es decir tienen una vida media más prolongada (11). El NO es sintetizado por la acción catalítica de una familia de sintasas del NO (NOS). Al momento han sido identificadas, caracterizadas y clonadas tres isoformas de la enzima, denominadas de acuerdo al tejido en el que primeramente se identificaron, como la neuronal (nNOS), la endotelial (eNOS), ambas constitutivas y la tercera que es inducible (iNOS) y que fue inicialmente identificada en macrófagos. Pese a que su función es la misma, oxidar a la L-arginina para sintetizar NO y L-citrulina en cantidades equimolares (12,13).

La actividad de las NOS está regulada por las concentraciones de calcio intracelular libre así como por la disponibilidad de tetrahidrobiopterina (uno de sus cofactores), y de su sustrato L-arginina. La deficiente disponibilidad de estas moléculas, puede inducir una condición de “NOS disfuncional” o “NOS desacoplada”, caracterizada por una disminución en la síntesis de NO con la concomitante formación de anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) y de peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>); es decir en condiciones en que la disponibilidad de L-arginina es reducida, las NOS se comportan como NADPH oxidasa (formadora de O<sub>2</sub><sup>-</sup>) o como peroxinitrito sintasa, respectivamente (14). El peroxinitrito es considerado como un fuerte pro oxidante similar al radical hidroxilo (15). La expresión de NOS en endometrio ectópico, como el caso de la adenomiosis fue evidenciada durante todo el ciclo menstrual (16). En

este estudio, se documentó la generación de peroxinitrito en el endometrio ectópico característico de la adenomiosis. Tanto la expresión de iNOS y de ONOO- fueron marcadamente reducidas después de terapia farmacológica con agonistas de GnRH, lo que apoya la propuesta de que la expresión incrementada de iNOS y la generación de peroxinitrito tienen una participación importante en la fisiopatología de la endometriosis. En la actualidad no existen estudios que evalúen la presencia de peroxinitrito en el endometrio ectópico en endometriosis.

La activación de polimorfonucleares y macrófagos también se traduce en mayor producción de ERO. Datos indirectos aportan pruebas de la existencia de elevadas concentraciones de lipoproteínas de baja densidad oxidadas (oxLDL) en líquido peritoneal asociados al desarrollo de endometriosis (17). En el líquido peritoneal en pacientes con infertilidad asociada a la endometriosis, la capacidad antioxidante total se redujo, y las enzimas antioxidantes individuales tales como la superóxido dismutasa fueron significativamente menores. Además, las concentraciones de lipoperóxidos fueron más altas entre los pacientes con endometriosis, lo que sugiere un papel del estrés oxidativo en el desarrollo de la endometriosis (3). Adicionalmente, se han vinculado a las ERO en la formación de adherencias, fenómeno aun no comprendido (18). Además, las alteraciones en la folículo génesis, pueden disminuir la calidad de los ovocitos. Los niveles del marcador de estrés oxidativo: 8-hidroxi-1-desoxiguanosina, fueron mayores en pacientes con endometriosis que con factor tubárico, masculino o infertilidad desconocida (19). Estudios recientes han encontrado la presencia de otros marcadores de estrés oxidativo, como los llamados productos avanzados de la oxidación de proteínas (AOPP) e hidroperóxidos totales en pacientes con endometriosis al compararlo con controles en muestras de sangre .

Otros marcadores se han encontrado en endometrio, a través de examen microscópico con apoyo de fluorescencia, como el reporte de Azevedo y Cols, que describen que en pacientes con endometriosis se presenta un incremento en la producción de superóxido en comparación con controles (20).

El sistema amortiguador antioxidante puede ser evaluado indirectamente como una capacidad antioxidante total. Este parametro puede ofrecer una idea de como se encuentra el conjunto de la respuesta antioxidante ante cada agresor oxidativo en cada sistema.

La evaluación depende del fluido, tejido o célula que se pretenda estudiar, ya que cada uno de los ambientes tiene diferentes sistemas antioxidantes y una conjunción o integración diferente. Así mismo, el tipo de sistema antioxidante predominante es heterogéneo y se debe de considerar para saber efectivamente que se está evaluando.

Las pruebas que miden el efecto antioxidante combinado de las defensas no enzimáticas en fluidos biológicos pueden ser útiles para proporcionar un índice de la capacidad del organismo para contrarrestar las especies reactivas conocidas como pro oxidantes, resistir el daño oxidativo y de combate oxidativos relacionados con el estrés enfermedades, esta estado se le conoce como la capacidad total antioxidante (21). El seleccionado reactivo cromogénico redox para el ensayo de suero humano debe ser fácilmente accesible, estable, selectivo, responder a todos los tipos de biológicamente importantes antioxidantes. El método CUPRAC, desarrollado por Apak y Cols, cumple estos requisitos para análisis en plasma, La capacidad plasmática antioxidante total depende preferentemente de la capacidad y cantidad de albúmina y de ácido úrico. Cuando se realiza en sangre total, la capacidad sanguínea antioxidante total, evalúa adicionalmente enzimas antioxidantes, glutatión y NADPH. El método CUPRAC tiene como fundamento el análisis de

la intensidad de corriente obtenida al oxidar al complejo cobre (I)-neocuproina, obteniendo de esta manera datos relacionados con la concentración de los antioxidantes.

En este estudio se analizaron diferentes marcadores de estrés oxidativo y la capacidad total antioxidante en suero con el objetivo de investigar una función en relación al daño generado por endometriosis.

## **MATERIAL Y METODOS**

Realizamos un estudio transversal entre febrero de 2011 a julio de 2012. En total se incluyeron 64 mujeres pacientes con diagnóstico de infertilidad en la consulta de Instituto Nacional de Perinatología. Este estudio recibió la aprobación por parte del comité de ciencias y el comité de ética de la dirección de investigación del Instituto. Las pacientes tenían que tener como antecedente un año de infertilidad y, que en su protocolo diagnóstico les fuera propuesto una laparoscopia diagnóstica independientemente si hubiera o no sospecha clínica de endometriosis para poderlas invitar a este estudio. Aquellas pacientes que nos otorgaron su consentimiento se obtuvo una muestra de sangre previo a su cirugía, y durante la cirugía se obtuvo una segunda muestra de líquido de fluido peritoneal. Ambas muestras fueron procesadas y almacenadas para su posterior análisis. Al término de la cirugía y según sus hallazgos fueron clasificadas dentro de los siguientes grupos 24 sin endometriosis constituyendo el grupo control, 29 con endometriosis grado I y II y el tercer grupo con 10 pacientes con endometriosis grado III y IV.

El diagnóstico de endometriosis y su clasificación fue realizado a través de visualización directa de acuerdo a los criterios de la Sociedad Americana de Medicina de la Reproducción.

Las células polimorfonucleares (PMN) y el plasma sanguíneo, se separaron mediante centrifugación de la muestra de sangre en un gradiente de densidad, utilizando el producto Polymorphprep™ siguiendo las instrucciones del fabricante ((NYCOMED PHARMA AS). El

plasma sanguíneo fue almacenado hasta su uso a -70 oC. Las células PMN se lavarán dos veces con solución isotónica PBS por centrifugación a 4 oC, 1000Xg/10 min. Los PMN se contaron con un hemocitómetro y fueron lisados resuspendiéndolas, a razón de 20X10<sup>6</sup> céls/mL, en la siguiente solución lítica: Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 que contuvo PMSF 0,15 mM y Tritón X-100 al 0.1%, a 4 oC.

Las muestras de fluido peritoneal fueron centrifugadas a 1000Xg durante 10 minutos a 4 oC, con el propósito de sedimentar las células y separar el fluido peritoneal libre de células. Los eritrocitos presentes en el paquete celular resultante, fueron eliminados mediante su lisis, con una solución específica para este propósito (EDTA 0.1 mM, NH<sub>4</sub>Cl 155 mM, NaHCO<sub>3</sub> 10 mM, pH 7.2-7.4). Los leucocitos resultantes se contaron con un hemocitómetro y fueron lisados como anteriormente se mencionó. El fluido libre de células se utilizó para determinar la concentración de nitritos y nitratos así como carbonilación de proteínas.

Las determinaciones bioquímicas realizadas fueron:

- Medición de nitritos y nitratos (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), productos finales del óxido nítrico en líquido del fluido peritoneal y plasma sanguíneo. Se midieron de acuerdo al método de Miranda y cols (22), el sobrenadante final obtenido se analizó en un espectrofotómetro a 545 nm. Nuestro rango de normalidad obtenido en nuestro laboratorio fue de 0.8 a 22.8 de nmoles/mL de nitritos/nitratos.
- Parámetros de estrés oxidativo.

Estos se determinaron en las muestras de plasma sanguíneo y exclusivamente carbonilación en fluido peritoneal. Los lipohidroxi-peróxidos se medieron de acuerdo a El Saadani y col. (23) y el malondialdehído según la técnica de Gérard-Monnier y cols. (24).

La cantidad de carbonilos en las proteínas fue determinada con el uso de dinitrofenilhidrazina, la cual reacciona con los carbonilos formando las dinitrofenilhidrazonas correspondientes, según Dalle-Donne (25).

Dentro del análisis estadístico, las características sociodemográficas fueron expresadas en proporciones si eran variables categóricas y media con desviación estándar en el caso de variables cuantitativas. Se verificó la normalidad de datos con prueba de Kolmogorov Smirnov y prueba de Shapiro Wilks. Para comparar la concentración de medias entre 2 grupos se utilizó la prueba *t* de Student y en el supuesto de no cumplir con distribución paramétrica se utilizó la U de Mann – Whitney. Para la comparación de medias entre los 3 grupos se utilizó análisis de la varianza (ANOVA de 1 vía) y en el supuesto de no cumplir con distribución paramétrica se utilizó la prueba de Kruskal Wallis. El análisis se realizó con el paquete estadístico SPSS versión 20.0.

## RESULTADOS

Las características sociodemográficas se resumen en la tabla 1, así como en los gráficos 1, 2, 3 y 4.

Se asumió una distribución normal exclusivamente para lipohidroxi-peróxidos y para medición de CUPRAC en proteína, para lo cual utilizamos el estadístico de t de student para comparar medias entre 2 grupos y ANOVA para comparar medias entre los 3 grupos. Para la comparación de nitritos/nitratos en plasma, carbonilación en plasma, malondialdehído en plasma, CUPRAC en plasma, nitritos/nitratos en líquido peritoneal y carbonilación en plasma usamos el estadístico de U de Mann-Whitney para comparar medias entre 2 grupos y prueba de Kruskal Wallis para comparar medias entre los 3 grupos.

El grupo 1 los constituye las pacientes sin endometriosis, el grupo 2 pacientes con endometriosis grado I y II y finalmente el grupo 3 pacientes con endometriosis grado III y IV.

La primera parte del análisis medimos los marcadores séricos, encontramos una concentración de lipohidroxi-peróxidos similar entre los grupos de pacientes sin y con endometriosis ( $0.074 \pm 0.016$  versus  $0.076 \pm 0.019$  nmol/mL,  $p=0.70$ ), al comparar entre los 3 grupos encontramos una concentración de lipohidroxi-peróxidos ligeramente mayor en endometriosis severa, pero sin alcanzar diferencias significativas ( $0.074 \pm 0.016$  en grupo 1,  $0.073 \pm 0.016$  en grupo 2 y  $0.074 \pm 0.016$  en grupo 3,  $p=0.21$ ). En cuanto a la concentración de nitritos y nitratos no encontramos diferencias significativas ( $9.09 \pm 5.25$  versus  $9.38 \pm 5.45$  nmol/mL,  $p=0.79$ ), al comparar entre los 3 grupos encontramos una concentración mayor estadísticamente significativa en el grupo de endometriosis III y IV ( $9.09 \pm 5.25$  en grupo 1,  $7.75 \pm 4.60$  en grupo 2 y  $14.11 \pm 5.12$  en grupo 3,  $p=0.009$ ). Respecto a la concentración de carbonilos encontramos una concentración mayor en el grupo de

endometriosis pero sin diferencias significativas ( $1.88 \pm 0.58$  versus  $2.01 \pm 0.56$  nmol/mg de proteína,  $p=0.10$ ), al comparar entre los 3 grupos no encontramos diferencias significativas ( $1.88 \pm 0.58$  en grupo 1,  $2.04 \pm 1.61$  en grupo 2 y  $1.92 \pm 0.35$  en grupo 3,  $p=0.19$ ). Finalmente, el último parámetro sérico fue la medición de malondialdehído encontrando una muy leve diferencia a favor del grupo con endometriosis, pero no significativa ( $0.024 \pm 0.009$  versus  $0.026 \pm 0.012$  nmol/mL,  $p=0.79$ ), tampoco al comparar entre los 3 grupos encontramos una tendencia mayor en el grupo de endometriosis grado III y IV, pero sin diferencias significativas ( $0.024 \pm 0.009$  en grupo 1,  $0.025 \pm 0.011$  en grupo 2 y  $0.27 \pm 0.14$  en grupo 3,  $p=0.96$ )

En el grupo de nitritos y nitratos realizamos una prueba de post hoc de Tamhane asumiendo que se trata de una distribución no paramétrica y con n de sujetos diferentes para cada grupo, encontrando la diferencia de media con el nivel de significancia más alto entre el grupo de endometriosis I y II contra el grupo de endometriosis III y IV ( $p=0.11$ ). De la misma manera corrimos un ajuste de bondad de Bonferroni para distribución no paramétrica, encontrando la diferencia de media con el nivel de significancia más alto entre el grupo de endometriosis I y II contra el grupo de endometriosis III y IV ( $p=0.003$ ) (gráfico 5)

Al analizar la capacidad total antioxidante por método de CUPRAC en plasma encontramos una concentración ligeramente mayor en el grupo de endometriosis, pero sin diferencia clínicamente significativas ( $1.18 \pm 0.15$  versus  $1.20 \pm 0.18$  equiv TROLOX,  $p=0.75$ ), y al comparar entre los 3 grupos encontramos una tendencia mayor en el grupo de endometriosis grado III y IV, pero sin diferencias significativas ( $1.18 \pm 0.15$  en grupo 1,  $1.18 \pm 0.17$  en grupo 2 y  $1.24 \pm 0.20$  en grupo 3,  $p=0.88$ ). De la misma manera se midió la capacidad total antioxidante por método de CUPRAC en proteína sin encontrar diferencias entre el grupo sin endometriosis comparado con el grupo de endometriosis ( $0.0574 \pm 0.0063$  versus  $0.0576 \pm 0.0110$  equiv TROLOX,  $p=0.93$ ), y al comparar entre los 3 grupos encontramos una tendencia mayor en el grupo de endometriosis grado III y IV, pero sin diferencias significativas ( $0.0574 \pm 0.0063$  en grupo 1,  $0.0571 \pm 0.0113$  en grupo 2 y  $0.0591 \pm 0.0106$  en grupo 3,  $p=0.85$ ) (gráficos 6 y 7).

Dentro de las muestras de fluido peritoneal se midió la presencia de marcadores de estrés oxidativo, en el caso de nitritos/nitratos se encontró una tendencia mayor de concentración en el grupo de endometriosis, aunque sin diferencias estadísticamente significativas ( $1.55 \pm 0.25$  versus  $2.35 \pm 1.32$  nmol/mL,  $p=0.18$ ), al comparar entre los 3 grupos encontramos una tendencia de una concentración mayor en endometriosis grado III y IV pero sin diferencias estadísticamente significativa ( $1.55 \pm 0.25$  en grupo 1,  $2.29 \pm 1.36$  en grupo 2 y  $2.69 \pm 1.06$  en grupo 3,  $p=0.19$ ). El otro marcador utilizado en líquido de fluido peritoneal fue la carbonilación de proteínas encontramos una concentración mayor en el grupo de endometriosis pero sin diferencias significativas ( $5.24 \pm 4.14$  versus  $12.87 \pm 18.7$  nmol/mg de proteína,  $p=0.86$ ), al comparar entre los 3 grupos no encontramos diferencias significativas ( $5.24 \pm 4.14$  en grupo 1,  $15.04 \pm 19.85$  en grupo 2 y  $2.06 \pm 0.43$  en grupo 3,  $p=0.72$ ).

## **DISCUSION**

La endometriosis es una entidad crónica que afecta en mayor proporción a mujeres en su etapa reproductiva, y que está asociada a infertilidad y con una prevalencia de hasta 30-50%. Los mecanismos fisiopatogénicos de la enfermedad no son del todo claros, aunque el estrés oxidativo se ha postulado como uno de estos mecanismos. Un desequilibrio entre los pro oxidantes con las barreras anti oxidantes va acompañado de la generación de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno. La intención de este estudio es la de establecer si existe un incremento dado por estrés oxidativo a través de la medición de marcadores y la capacidad del organismo para contrarrestar estos efectos nivel sistémico en el contexto de la presencia de endometriosis y su grado de severidad de la enfermedad, lo cual contribuiría a profundizar en su fisiopatología.

Queda claro que por los estudios previos se ha evidenciado como el estrés oxidativo juega un papel importante dentro del desarrollo y progresión de esta enfermedad (3, 9, 10, 17, 18). Incluso se ha demostrado que actualmente con el advenimiento de técnica de reproducción asistida de alta complejidad como la fertilización in vitro, uno de los grupos

que tiene peores resultados para lograr un embarazo, son aquellas pacientes con endometriosis dado por una mala calidad ovocitaria, en la cual estaría implicado el fenómeno de estrés oxidativo (26).

En nuestro estudio pudimos evidenciar la presencia de estrés oxidativo a través de un aumento en presencia de nitritos y nitratos, los cuales son marcadores indirectos de una disminución en la producción de óxido nítrico. El grupo con mayor actividad fue el de endometriosis severa con una concentración media de  $14.11 \pm 5.12$  nmol/mL comparado con pacientes sin endometriosis en la cual encontramos una concentración media de  $9.09 \pm 5.25$  (p=0.009). Esta disminución en la producción nítrico esta dado por un desacoplamiento en la sintasa del óxido nítrico con la concomitante formación de anión superóxido ( $O_2^-$ ) y de peroxinitrito ( $ONOO^-$ ); es decir en condiciones en que la disponibilidad de L-arginina es reducida, las NOS se comportan como NADPH oxidasa (formadora de  $O_2^-$ ) o como peroxinitrito sintasa, respectivamente (14). El peroxinitrito es considerado como un fuerte pro oxidante similar al radical hidroxilo (15). Este tipo de radical es capaz de generar daño oxidativo y muerte celular.

El peroxinitrito así como otro tipo de especies reactivas de oxígeno pueden ser neutralizados por el propio sistema. Ante un determinado insulto oxidativo, como el generado en el proceso inflamatorio de la endometriosis, los organismos suelen adaptarse rápidamente. Sin embargo aquellas sustancias que se escapan de sistemas naturales de defensa antioxidante producen daños irremediables a moléculas como el ADN, molécula esencial en los ovocitos, los cuales son células indivisibles, este daño puede causar un entrecruzamiento de proteínas, intercambio de cromátides, apertura de anillos, liberación de bases y rompimiento de cadenas (27) que una vez dañadas tendrían inevitablemente consecuencias irremediables para desarrollarse y poder fertilizar.

Dentro de los objetivos de este estudio fue evaluar si la capacidad total antioxidante estaría alterada por el aumento de alguno de los marcadores de estrés oxidativo, que en nuestro estudio en particular estuvo dado por el aumento en la presencia de nitritos y nitratos. La capacidad antioxidante total nos refleja la respuesta en conjunto antioxidante

ante cada agresor oxidativo. Nuestra medición fue hecha en plasma y proteínas del plasma. En el plasma, depende principalmente de la cantidad de albúmina y de ácido úrico (27). Nuestros resultados arrojaron que no hay diferencias en la capacidad total antioxidante en pacientes sin endometriosis o aquellas que tienen endometriosis independiente al grado de severidad de la enfermedad.

Es preciso acotar que aunque por publicaciones previas se ha documentado una asociación entre estrés oxidativo y endometriosis, en nuestro caso solo encontramos un criterio como la concentración aumentada de nitritos y nitratos. En presencia de endometriosis en las que queda de manifiesto este daño por oxidación, ha hecho que grupo de investigadores dirijan esfuerzos para realizar estudios que evalúen el impacto con tratamientos antioxidantes (28).

Hemos constatado en nuestro estudio que parte de este daño, no tiene implicaciones sistémicas en este grupo de pacientes, al no alterarse la capacidad total antioxidante, lo cual reflejaría que este daño por estrés oxidativo es dado por un fenómeno que tendría expresión limitada a nivel local.

Dentro de las limitaciones de este estudio, dado su diseño transversal, no refleja causalidad, por lo que generar hipótesis acerca de la implicación con resultados reproductivos, habría la necesidad de realizar más estudios con los diseños apropiados para establecer hipótesis de asociación y riesgos con resultados reproductivos. Dada la facilidad y rapidez de las pruebas de capacidad antioxidante, aunado a que integran de manera global la evaluación de los sistemas amortiguadores antioxidantes y su estatus temporal, las hace muy adecuadas como pruebas diagnósticas.

## **CONCLUSION**

Existe evidencia de un aumento en la concentración de nitritos y nitratos en pacientes con endometriosis severa generando un vínculo adicional al mecanismo fisiopatológico que engloba al estrés oxidativo. Sin embargo, la capacidad total antioxidante medido a nivel sistémico no tiene cambios, lo cual reflejaría que la enfermedad pudiera tener

repercusiones limitadas solo a nivel local. Se requiere estudios que evalúen la presencia de marcadores de estrés oxidativo en asociación con la capacidad total antioxidante a nivel local como tejido endometrial ectópico y que se asocie con resultados reproductivos para establecer si existe un vínculo que permitan establecer una base sólida respecto a la forma en que el estrés oxidativo pudiera afectar.

## REFERENCIAS

1. Giudice LC. Clinical practice: Endometriosis. Review. *N Engl J Med* 2010;362(25):2389-98.
2. Gupta S, Goldberg JM, Aziz N, Goldberg E, Krajcir N, Agarwal A. Pathogenic mechanisms in endometriosis-associated infertility. *Fertil Steril* 2008; 90 (2) 247-57.
3. Szczepanska M, Kozlik J, Skrzypczak J and Mikolajczyk M Oxidative stress may be a piece in the endometriosis puzzle. *Fertil Steril* 2003; 79, 1288–1293.
4. Barnhart K, Dunsmoor-Su R, Coutifaris C. Effect of endometriosis on in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2002;77:1148–55.
5. Gupta S, Agarwal A, Krajcir N, Alvarez JG. Role of oxidative stress in endometriosis. *Reprod Biomed* 2006; 13 (1) 126–134.
6. Maarsingh H, Zaagsma J, Meurs H. Arginine homeostasis in allergic asthma. *Eur J Pharmacol* 2008; 585: 375-84.
7. Dong M, Shi Y, Cheng Q, Hao M. Increased nitric oxide in peritoneal fluid from women with idiopathic infertility and endometriosis. *J Reprod Med* 2001;46:887–91.
8. Khorram O, Lessey BA. Alterations in expression of endometrial endothelial nitric oxide synthase and alpha(v)beta(3) integrin in women with endometriosis. *Fertil Steril* 2002;78:860–4.
9. Osborn BH, Haney AF, Misukonis MA, Weinberg JB. Inducible nitric oxide synthase expression by peritoneal macrophages in endometriosis-associated infertility. *Fertil Steril* 2002;77:46–51.
10. Baylis C, Vallance P. Measurement of nitrite and nitrate levels in plasma and urine – what dose this measure tell us about the activity of the endogenous nitric oxide system? *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 1998; 7: 59-62.
11. Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG, Dikalov S. Interactions of peroxynitrite with uric acid in the presence of ascorbate and thiols: Implications for uncoupling endothelial nitric oxide synthase. *Biochem Pharmacol* 2005; 70: 343–54.
12. Yu H, Liu J, Liu X, Zang T, Luo G, Shen J. Kinetic studies on the glutathione peroxidase activity of selenium-containing glutathione transferase. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2005; 141: 382–9.

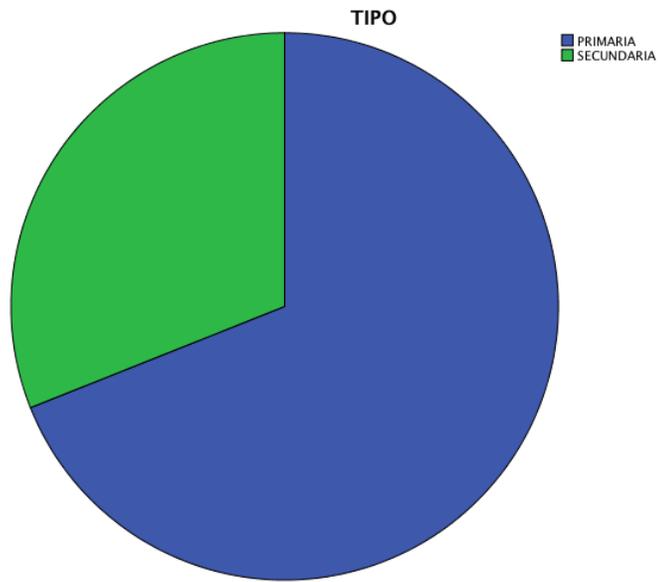
13. Murphy AA, Palinski W, Rankin S, Morales AJ, Parthasarathy S. Macrophage scavenger receptor(s) and oxidatively modified proteins in endometriosis. *Fertil Steril* 1998;69:1085–91.
14. Weaver J, Porasuphatana S, Tsai P, Pou S, Roman LJ, Rosen GM. A comparative study of neuronal and inducible nitric oxide synthases: generation of nitric oxide, superoxide, and hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1726: 302-8.
15. Hippeli S, Elstner EF. Transitional metal ion-catalyzed oxygen activation during pathogenic processes. *FEBS Lett* 1999;443:1–7.
16. Kamada Y, Nakatsuka M, Asagiri K et al. GnRH agonist suppressed expression of nitric oxide synthases and generation of peroxynitrite in adenomyosis. *Hum Reprod* 2000; 15, 2512–2519.
17. Alpay Z, Saed GM, Diamond MP. Female infertility and free radicals: potential role in adhesions and endometriosis. *J Soc Gynecol Invest* 2006;13:390–8.
18. Saito H, Seino T, Kaneko T, Nakahara K, Toya M, Kurachi H. Endometriosis and oocyte quality. *Gynecol Obstet Invest* 2002;53(Suppl 1):46–51.
19. Donabela FC, Andrade Az, Rodrigues JK, Dib LA, Jordao JJ, Navarro PA. Serum markers of oxidative stress in infertile women with endometriosis and controls. *Fertil Steril* 2010;94 (4, sup 1) S40.
20. Azevedo AC, Ormanji MS, Fraietta R, de Freitas V. Detection of oxidative stress levels in patients with and without endometriosis by analysis of confocal microscopy images using a superoxide probe. *Fertil Steril* 2003; 94 (4 sup 1) S203.
21. Apak R, Güçlü K, Ozyürek M, Karademir SE, Altun M. Total antioxidant capacity assay of human serum using copper(II)-neocuproine as chromogenic oxidant: the CUPRAC method. *Free Radic Res.* 2005 Sep;39(9):949-61.
22. Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide: Biol Chem.* 2001; 5: 62-71.
23. El-Saadani M, Esterbauer H, El-Sayed, Gober M, Nassar AY, Jurgens G. A spectrophotometric assay for lipid peroxides in serum lipoproteins using a commercially available reagent. *J Lip Res* 1989; 30:627-630-

24. Gérard-Monnier D, Erdelmeir I, RégnardKheira, Moze-Henry N, Jean-Claude Y, Chaudiere J. Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondaldehyde and 4 hidroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol* 1998; 11:1176-1183.
25. Dalle-Done I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl
26. Prieto L, Quesada JF, Cambero O, Pacheco A, Pellicer A, Codoceo R, Garcia-Velasco JA. Analysis of follicular fluid and serum markers of oxidative stress in women with infertility related to endometriosis. *Fertil Steril*. 2012 Jul;98(1):126-30. Epub 2012 May 10.
27. Chirino YI, Orozco-Ibarra M, Pedraza-Chaverri J. Role of peroxynitrite anion in different diseases. *Rev Invest Clin*. 2006 Jul-Aug;58(4):350-8.
28. Mier-Cabrera J, Genera-García M, De la Jara-Díaz J, Perichart-Perera O, Vadillo-Ortega F, Hernández-Guerrero C. Effect of vitamins C and E supplementation on peripheral oxidative stress markers and pregnancy rate in women with endometriosis. *Int J Gynaecol Obstet*. 2008 Mar;100(3):252-6. Epub 2007 Nov 19.

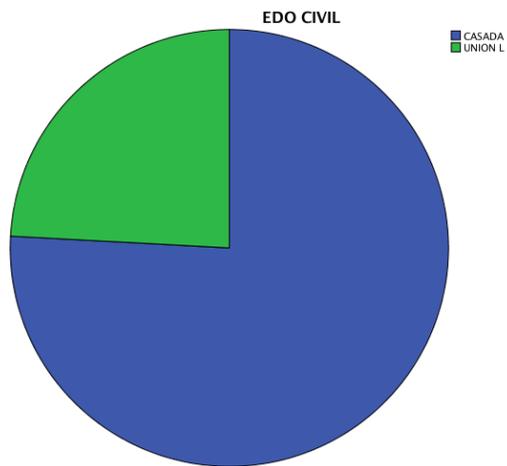
**TABLA 1**

<b>Características sociodemográficas</b>	<b>Media/DE</b>
Edad	31 ± 4.7
Peso	63.5 ± 7.9
IMC	25.3 ± 3.0
Talla	157 ± 29.4
Menarca	12 ± 1.4
Duración de infertilidad	4.0 ± 2.7

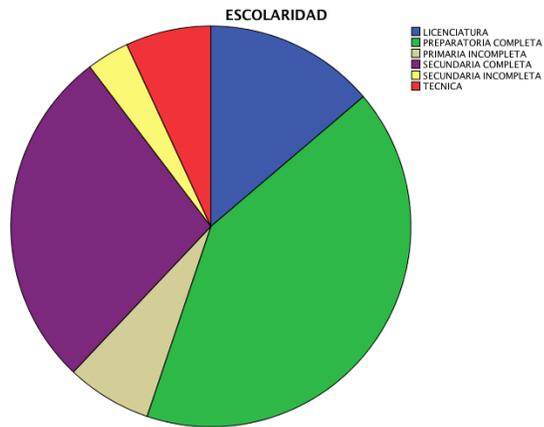
**GRAFICO 1. Tipo de Infertilidad.**



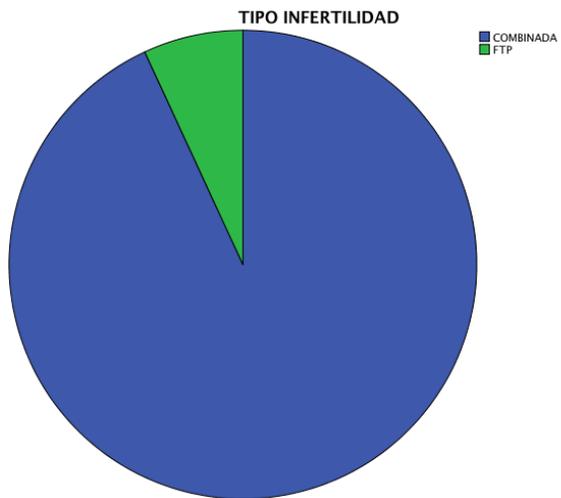
**GRAFICO 2. Estado civil.**



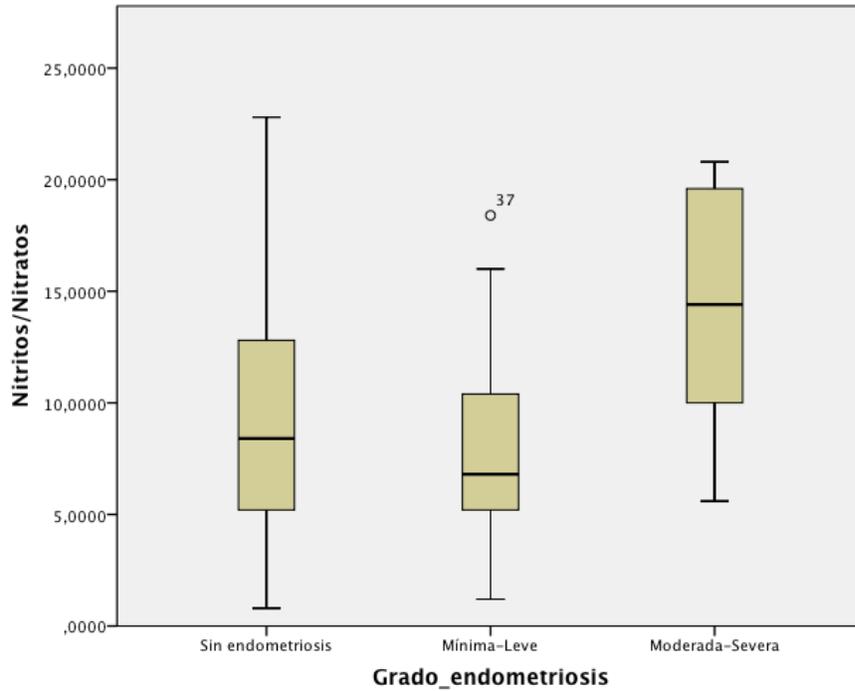
**GRAFICO 3. Escolaridad.**



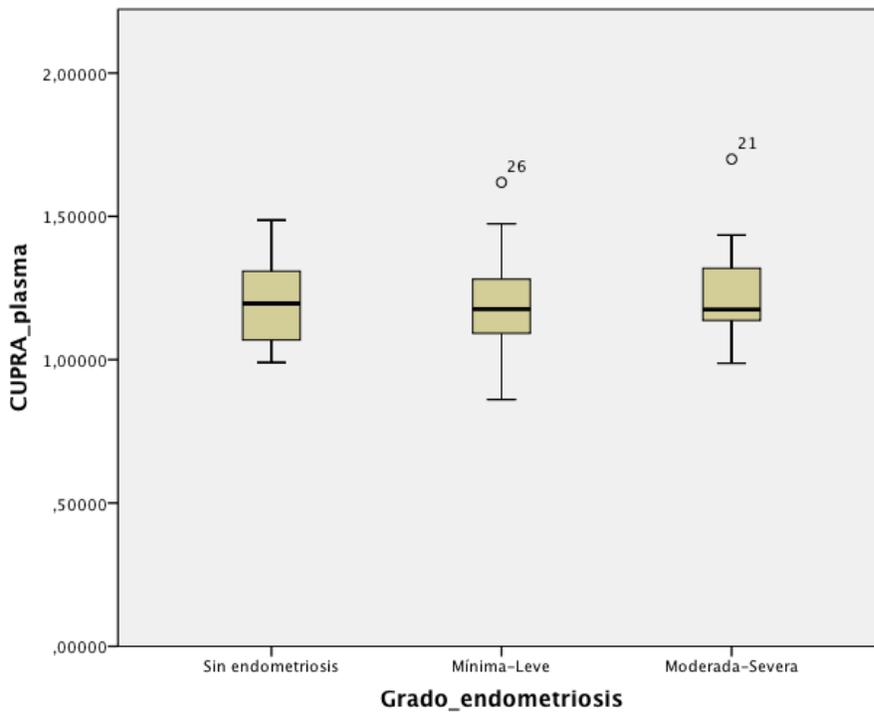
**GRÁFICA 4. Causa**



**GRÁFICA 5. Concentraciones de nitritos y nitratos en suero según presencia o ausencia de endometriosis**



**GRÁFICA 6. Concentraciones de capacidad total antioxidante medido por método CUPRAC en plasma según presencia o ausencia de endometriosis**



**GRÁFICA 7. Causa Concentraciones de capacidad total antioxidante medido por método CUPRAC en proteínas según presencia o ausencia de endometriosis**

