



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas  
Instituto Nacional de Perinatología  
Isidro Espinosa de los Reyes  
Ginecología y Obstetricia

**“Participación de la arginasa y estrés oxidativo en  
pacientes con endometriosis e infertilidad”**

**Tesis**

Que para obtener el grado de MAESTRO en:  
**CIENCIAS MÉDICAS**

PRESENTA  
**JORGE GARCÍA VARGAS**

D. C. ALBERTO MARTÍN GUZMÁN GRENFELL  
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES



MEXICO, D. F. ENERO 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

# “Participación de la arginasa y estrés oxidativo en pacientes con endometriosis e infertilidad”

D. C. JAVIER MANCILLA RAMÍREZ  
COORDINADOR DE LA SEDE  
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA

FIRMA EN REPRESENTACIÓN  
DR. RICARDO FIGUEROA DAMIAN  
SUPLENTE DEL COORDINADOR DE LA SEDE

---

D. C. ALBERTO MARTÍN GUZMÁN GRENFELL  
TUTOR ACADÉMICO

---

## ÍNDICE

<b>RESUMEN.....</b>	<b>4</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>6</b>
<b>DATOS GENERALES DEL PROYECTO.....</b>	<b>8</b>
<b>MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>12</b>
<b>Síntesis.....</b>	<b>12</b>
<b>Planteamiento del problema.....</b>	<b>13</b>
<b>Pregunta de investigación.....</b>	<b>14</b>
<b>Antecedentes.....</b>	<b>15</b>
<b>Justificación.....</b>	<b>20</b>
<b>Objetivo e hipótesis de trabajo.....</b>	<b>21</b>
<b>DISEÑO DEL ESTUDIO.....</b>	<b>22</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
<b>ASPECTOS ÉTICOS.....</b>	<b>37</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>54</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>40</b>
<b>CONCLUSIÓN.....</b>	<b>44</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>45</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>48</b>
<b>Consentimiento informado.....</b>	<b>48</b>
<b>Metodología para el reclutamiento de pacientes.....</b>	<b>53</b>
<b>Factibilidad y viabilidad.....</b>	<b>57</b>
<b>Cronograma.....</b>	<b>63</b>
<b>Gráficas.....</b>	<b>64</b>

## **RESUMEN**

### Objetivo

- Evaluar si existen diferencias en la actividad de enzima arginasa en relación a marcadores de estrés oxidativo en pacientes con infertilidad y endometriosis.

### Diseño

- Estudio experimental, tipo transversal.

### Lugar

- Coordinación de Infertilidad del Instituto Nacional de Perinatología.

### Pacientes

- 63 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.

### Mediciones principales

- Se cuantificó la actividad de enzima arginasa en todos los grupos. Además se midieron marcadores séricos de estrés oxidativo como productos de degradación de ácidos grasos como lipoperóxidos y malondialdehído, carbonilos, nitritos y nitratos así como la capacidad total antioxidante.

## Resultados

- Se encontró una tendencia hacia un aumento de actividad de enzima arginasa no significativa en pacientes sin endometriosis ( $7.27 \pm 3.43$ ), endometriosis grado I-II ( $8.95 \pm 4.23$ ) y endometriosis grado III-IV ( $10.3 \pm 4.96$ ).
- Las mujeres con endometriosis severa tuvieron una concentración mayor de nitritos y nitratos (14.11 versus 9.09,  $p = 0.004$ ) al comparar a mujeres sin endometriosis, marcador indirecto de producción de óxido nítrico, aumento que podría ser por un desacoplamiento de la sintasa de óxido nítrico, a favor de un aumento de la formación de peroxinitrito, un marcador de estrés oxidativo. No se encontraron diferencias significativas en otros marcadores de estrés oxidativo en el grupo de endometriosis contra sin endometriosis. La capacidad total antioxidante en plasma medido por CUPRAC no mostró diferencias significativas entre los grupos.

## Conclusión

- No hay diferencias en la actividad de la enzima arginasa. 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 está directamente involucrado con la actividad de enzima arginasa. No se 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, arginasa, endometriosis, infertilidad.

## ABSTRACT

### Objective

- To evaluate if there are differences in arginase enzyme activity in relationship with markers of oxidative stress in patients with infertility and endometriosis.

### Design

- Experimental, cross sectional study.

### Setting

- Infertility Department at National Institute of Perinatology.

### Patients

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

### Intervention (s)

- 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 measure (s)

- We measured arginase enzyme activity in all groups. Also we measured serum markers of oxidative stress, such as degradation products of fatty acids (lipoperoxides and malodialdehyde), carbonils, nitrites-nitrates and total antioxidant capacity.

### Result (s)

- We found a nonsignificant trend toward an increased activity of arginase enzyme, in patients without endometriosis ( $7.27 \pm 3.43$  nmol urea/min/mg of protein), endometriosis I-II ( $8.95 \pm 4.23$ ) and endometriosis III-IV ( $10.3 \pm 4.96$ ).

- Women with severe endometriosis versus women without endometriosis had 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 could be a reflect of an uncoupling of nitric oxide synthase that favours an increased peroxynitrite formation, a marker of oxidative stress. No significant differences were found in any other oxidative stress marker between the endometriosis group against without endometriosis. The plasma total antioxidant capacity measured by CUPRAC did not show significant differences between groups.

#### Conclusion (s)

- There is no differences in arginase enzyme activity. Our findings support evidence about altered balance between pro oxidant and antioxidant activities that generate oxidative stress in severe endometriosis, however this process was not in relation with arginase activity. Also, there was not differences in total antioxidant capacity which is important because this capacity constitutes a protection against oxidative stress so limiting any potential injury to the reproductive process.

#### Key words

- Oxidative stress, arginase, endometriosis, infertility.



## **DATOS GENERALES DEL PROYECTO**

**TITULO DEL PROYECTO:** Participación de la arginasa y estrés oxidativo en pacientes con endometriosis e infertilidad.

**ÁREA DE INVESTIGACION:** Básica.

**SUBÁREA DE INVESTIGACION:** Medicina Reproductiva.

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:** Estrés oxidativo.

**FECHA PROGRAMADA DE INICIO DEL PROTOCOLO:** 1 de marzo de 2011.

**FECHA PROGRAMADA DE TERMINACIÓN:** 30 de julio de 2012.

### **INVESTIGADOR PRINCIPAL:**

NOMBRE:

García	Vargas	Jorge
APELLIDO PATERNO	MATERNO	NOMBRE(S)

ADSCRIPCIÓN: Subdirección Académica y de Gestión Educativa.

CARGO: Médico Residente de Biología de la Reproducción Humana.

NIVEL MÁXIMO DE ESTUDIOS: Especialidad Médica.

PERTENECE AL INPer: Si.

PERTENECE AL SISTEMA NACIONAL DE INVESTIGADORES (SNI): No.

NOMBRE:

Guzmán	Grenfell	Alberto Martín
APELLIDO PATERNO	MATERNO	NOMBRE(S)

ADSCRIPCION: Subdirección de Investigación Biomédica.

CARGO Jefe del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.

NIVEL MAXIMO DE ESTUDIOS: Doctorado.

PERTENECE AL INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA: Si.

PERTENECE AL SISTEMA NACIONAL DE INVESTIGADORES (SNI): SI.

### **AUTORIZACIÓN OTORGADA PARA REALIZAR EL ESTUDIO EN EL ÁREA O DEPARTAMENTO**

DEPARTAMENTO: Coordinación de Infertilidad.

De la Jara	Díaz	Julio Francisco
APELLIDO PATERNO	MATERNO	NOMBRE(S)

SUBDIRECCIÓN: Medicina de la Reproducción.

Gaviño APELLIDO PATERNO	Gaviño MATERNO	Fernando NOMBRE(S)
----------------------------	-------------------	-----------------------

DEPARTAMENTO: Bioquímica y Biología Molecular.

Guzmán APELLIDO PATERNO	Grenfell MATERNO	Alberto Martín NOMBRE(S)
----------------------------	---------------------	-----------------------------

SUBDIRECCIÓN: Investigación Biomédica.

Cérbulo APELLIDO PATERNO	Vázquez MATERNO	Arturo NOMBRE(S)
-----------------------------	--------------------	---------------------

DIRECCIÓN: Dirección de Investigación.

Mejía APELLIDO PATERNO	Tobón MATERNO	Santiago NOMBRE(S)
---------------------------	------------------	-----------------------

#### CO-INVESTIGADORES.

1) NOMBRE:	De la Jara APELLIDO PATERNO	Díaz MATERNO	Julio Francisco NOMBRE(S)
------------	--------------------------------	-----------------	------------------------------

ADSCRIPCIÓN: Subdirección de Medicina Reproductiva.

CARGO: Jefe de la Coordinación de Infertilidad.

NIVEL MÁXIMO DE ESTUDIOS: Especialidad Médica.

PERTENECE AL INPer: Si.

PERTENECE AL SISTEMA NACIONAL DE INVESTIGADORES (SNI): No.

2) NOMBRE:	Cruz APELLIDO PATERNO	Orozco MATERNO	Oliver Paul NOMBRE(S)
------------	--------------------------	-------------------	--------------------------

ADSCRIPCIÓN: Subdirección de Medicina Reproductiva.

CARGO: Médico adscrito a la coordinación de infertilidad.

NIVEL MÁXIMO DE ESTUDIOS: Especialidad Médica.

PERTENECE AL INPer: Si.

PERTENECE AL SISTEMA NACIONAL DE INVESTIGADORES (SNI): No.

3) NOMBRE: Adame Pinacho Ricardo  
APELLIDO PATERNO MATERNO NOMBRE(S)

ADSCRIPCIÓN: Subdirección de Medicina Reproductiva.  
CARGO: Médico adscrito a la coordinación de infertilidad.  
NIVEL MÁXIMO DE ESTUDIOS: Especialidad Médica.  
PERTENECE AL INPer: Si.  
PERTENECE AL SISTEMA NACIONAL DE INVESTIGADORES (SNI): No.

4) NOMBRE: Aguayo González Patricia  
APELLIDO PATERNO MATERNO NOMBRE(S)

ADSCRIPCIÓN: Subdirección de Medicina Reproductiva.  
CARGO: Médico adscrito a la coordinación de infertilidad.  
NIVEL MÁXIMO DE ESTUDIOS: Especialidad Médica.  
PERTENECE AL INPer: Si.  
PERTENECE AL SISTEMA NACIONAL DE INVESTIGADORES (SNI): No.

5) NOMBRE: Torres Ramos Yessica Dorín  
APELLIDO PATERNO MATERNO NOMBRE(S)

ADSCRIPCIÓN: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.  
CARGO: Investigador en Ciencias Médicas B.  
NIVEL MÁXIMO DE ESTUDIOS: Doctora en Ciencias.  
PERTENECE AL INPer: Sí.  
PERTENECE AL SISTEMA NACIONAL DE INVESTIGADORES (SNI): Sí-Candidato.

6) NOMBRE: Montoya Estrada Araceli  
APELLIDO PATERNO MATERNO NOMBRE(S)

ADSCRIPCIÓN: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.  
CARGO: Investigador en Ciencias Médicas B.  
NIVEL MÁXIMO DE ESTUDIOS: Doctora en Ciencias.  
PERTENECE AL INPer: SI.  
PERTENECE AL SISTEMA NACIONAL DE INVESTIGADORES (SNI): Si.

7) NOMBRE: Jimémez Zambrano Graciela  
APELLIDO PATERNO MATERNO NOMBRE(S)

ADSCRIPCIÓN: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.

CARGO: Estudiante de Biología.

NIVEL MÁXIMO DE ESTUDIOS: Pasante de Licenciatura.

PERTENECE AL INPer: No.

PERTENECE AL SISTEMA NACIONAL DE INVESTIGADORES (SNI): No.

#### **DEPARTAMENTOS PARTICIPANTES.**

a) NOMBRE DEL DEPARTAMENTO: Coordinación de Infertilidad.

b) NOMBRE DEL DEPARTAMENTO: Bioquímica y Biología Molecular.

#### **INSTITUCIONES PARTICIPANTES.**

a) Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes

#### **INTENCIÓN DEL PROTOCOLO: APLICATIVA**

- Brazo de estudio: didáctico para proyecto de investigación de Maestría en Ciencias Médicas de la Universidad Nacional Autónoma de México – Dr. Jorge García Vargas, residente de 6to grado de Biología de la Reproducción Humana.

## **MARCO TEÓRICO**

### **SÍNTESIS DEL PROYECTO**

La endometriosis es una entidad crónica que afecta en mayor proporción a las mujeres en etapa reproductiva, está asociada a infertilidad y tiene 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. El incremento en la actividad de la enzima arginasa tiene un papel importante en la generación de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, al disminuir la L-arginina se genera un desacoplamiento de la óxido nítrico sintasa dando origen a la formación del anión superóxido y el radical peroxinitrito lo que incrementa el daño por estrés oxidativo. La intención de este estudio es establecer si existe asociación entre la actividad de la enzima arginasa y el estrés oxidativo en pacientes con endometriosis tanto a nivel sistémico como en el fluido peritoneal. Adicionalmente, se pretende establecer si estos hallazgos se correlacionan con la aparición y el grado de severidad de la enfermedad, lo cual contribuiría a profundizar en su fisiopatología para la búsqueda de alternativas terapéuticas a este problema de salud reproductiva.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Existen evidencias sustanciales de que el incremento en la actividad de la enzima arginasa extra-hepática tiene una importante contribución en la generación de especies reactivas tanto del oxígeno (anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo) como del nitrógeno (peroxinitrito y radical dióxido de nitrógeno) al disminuir la disponibilidad de L-arginina, lo que genera un desacoplamiento de la óxido nítrico sintasa (NOS), lo cual induce un incremento en la formación de anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) aumentando el daño a diversas biomoléculas y estructuras celulares por la condición de estrés oxidativo que se establece (1). Este mecanismo de daño ha sido documentado en diversas patologías, tales como diabetes, enfermedad cardiovascular y aterosclerosis, anemia hemolítica falciforme, disfunción eréctil y asma. Sin embargo, a pesar de que se ha señalado que en la endometriosis, el estrés oxidativo está presente y puede formar parte de los mecanismos fisiopatogénicos de esta enfermedad, no existen estudios de la posible participación de las arginasas extra-hepáticas en la endometriosis.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACION**

¿Existe diferencia en la actividad de arginasa en pacientes con infertilidad asociada a endometriosis en comparación con aquellas sin endometriosis?

## **ANTECEDENTES**

La endometriosis se define como la implantación de glándulas y estroma endometrial fuera de la cavidad uterina y del músculo uterino, usualmente en la pelvis, pero puede ocurrir en otro sitio. Se trata de una entidad crónica asociada con dolor pélvico, dismenorrea severa, dispareunia, infertilidad, o incluso puede ser asintomática y ser descubierta de manera incidental (8). El grupo más afectado es el que está en etapa reproductiva al ser una entidad estrógeno dependiente. La visualización directa se considera el estándar de oro para el diagnóstico de la enfermedad. Las lesiones con implantación en el peritoneo son caracterizadas por lesiones tipo nódulos o máculas en forma de polvo, en flama color rojo o con forma de disparo de arma de fuego; el color es variable desde rojizo, grisáceo, café oscuro, azul tenue o una combinación de éstos.

Los factores que conducen a la infertilidad en esta entidad son diversos y pueden actuar en los diferentes niveles del proceso de la reproducción, desde la folículo-genesis, la ovulación y la fecundación, hasta el transporte tubario e implantación del blastocito (5). Adicionalmente, hay evidencia de que existen alteraciones en el líquido peritoneal secundario a un aumento en el número de macrófagos y sus citocinas secretadas (10).

Se ha documentado que en mujeres con antecedente de infertilidad sometidas a laparoscopia se puede encontrar el hallazgo de endometriosis hasta en 50% de los casos (11). A pesar de los numerosos estudios publicados continúa siendo un tema controvertido en cuanto 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. El estado oxidativo y



citocinas pro inflamatorias del líquido peritoneal son importantes mediadores de la endometriosis. Muchos estudios investigaron esta correlación, pero los resultados son discrepantes (12).

### **Mecanismo fisiopatogénicos del estrés oxidativo en la endometriosis.**

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 el estrés oxidativo surge existe un desequilibrio y hay un exceso de las ERO lo que resulta en daño a diversas biomoléculas (13). 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, han sido documentada (9). Con base en ello, se ha postulado que el desarrollo de estrés oxidativo en la cavidad peritoneal puede ser uno de los vínculos en la cadena de eventos que llevan a infertilidad asociada a endometriosis (9).

El aumento en el número y la actividad de los macrófagos en la endometriosis se acompaña de una liberación mayor de citocinas y otros mediadores del sistema inmune tales como el óxido nítrico (NO) (14). El NO es un biorregulador con una gran diversidad de funciones incluyendo aspectos de la reproducción. En pequeñas cantidades el NO es importante en la función ovárica y la implantación embrionaria. Sin embargo, cantidades anormalmente altas de NO y de la enzima sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) se han observado en el endometrio de las mujeres con endometriosis (15). Esto se debe en parte a que los macrófagos peritoneales expresan cantidades más altas de NOS, tienen una mayor actividad de esta enzima, y ha 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 en el líquido peritoneal o el bloqueo de sus efectos mejoraría la

fertilidad en pacientes con endometriosis. Por ejemplo, se ha sugerido que con las técnicas de fertilización in vitro (FIV) se evitaría el contacto de los gametos y embriones con factores tóxicos peritoneales y oviductales, tales como ERO y peroxinitrito (16).

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 (10).

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 tubario, masculino o infertilidad desconocida (19). Los 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 (20). Otros marcadores se han encontrado en endometrio a través de examen microscópico con apoyo de fluorescencia, como el reporte de Azevedo y colaboradores, en el que describen que en pacientes con endometriosis se presenta un incremento en la producción de superóxido en comparación con controles (21).

## **La enzima arginasa y su participación en el estrés oxidativo.**

Estudios recientes han indicado que la enzima arginasa, la cual hidroliza el grupo amidino de la L-arginina en L-ornitina y urea, juega un papel importante en la fisiopatología de varias enfermedades. La arginasa existe en 2 isoformas: la arginasa I y II. La arginasa I se localiza en el citoplasma de las células y constituye la isoenzima más abundante en el hígado; mientras que la Arginasa II se encuentra en las mitocondrias de diversos tipos celulares incluyendo a los hepatocitos, pero sobretodo en tejidos extra hepáticos (22). El significado fisiológico que se ha atribuido a las arginasas extra hepáticas es el de regular la bio disponibilidad de L-arginina para otras vías metabólicas, tales como la regulación de la síntesis del NO y de los procesos de proliferación y remodelación celulares; de tal manera que cuando la actividad de la arginasa se encuentra incrementada, se disminuye la disponibilidad de arginina para la síntesis de NO y se favorece la formación de especies reactivas del oxígeno y, con ello, la alteración conocida como estrés oxidativo. Es por esto que actualmente se considera que diversas patologías que involucran alteraciones en el metabolismo del NO se encuentran asociadas a incrementos en la actividad de la enzima arginasa.

Previamente se ha comentado el papel que juega el NO en la infertilidad asociada a endometriosis, donde se ha encontrado niveles elevados del mismo (15). Los sistemas enzimáticos responsables de la formación del NO se conocen como óxido nítrico sintasa (NOS), y consideran por lo menos a 3 isoformas: nNOS (neuronal o tipo 1), iNOS (inducible o tipo 2) y la eNOS (endotelial o tipo 3) (23). El NO se conoce por ser uno de los factores relajantes vasculares derivado del endotelio vascular y como segundo mensajero en una gran cantidad de funciones. 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 disminución de la 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 ( $O_2^-$ ) 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<sub>2</sub>·-) o como peroxinitrito sintasa, respectivamente (24). El peroxinitrito es considerado como un fuerte pro oxidante similar al radical hidroxilo (25). La expresión de NOS en endometrio ectópico, como el caso de la adenomiosis, se ha demostrado durante todo el ciclo menstrual (26), en un estudio que 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 hormona reguladora de gonadotropinas (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, es decir tejido ectópico fuera de la cavidad endometrial y musculatura uterina, por lo que es de interés particular documentarlo y evidenciar la asociación teórica entre este radical tóxico generador de estrés oxidativo y el aumento en la actividad de la arginasa.

## **JUSTIFICACIÓN**

El estrés oxidativo es inducido cuando hay un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes. Esto tiene efectos perjudiciales en la fertilidad femenina afectando la ovulación, fertilización, desarrollo embrionario e implantación. Con el advenimiento de técnicas de laboratorio avanzadas durante la última década se ha permitido dilucidar de manera más profunda el importante papel que juega el estrés oxidativo en la fisiopatología de múltiples enfermedades. Se tiene evidencia de este desequilibrio en la endometriosis, enfermedad de particular importancia en el campo de la medicina de la reproducción por su impacto en la fertilidad. Los estudios previos ilustran esta asociación mediante la identificación de biomarcadores de estrés oxidativo en esta entidad crónica, vinculados en el desarrollo y gravedad de la enfermedad, que contribuyen a la cadena de eventos que llevan a infertilidad.

A pesar de los avances, aun no queda muy clara la fisiopatogenia de esta enfermedad. Uno de los mecanismos más importantes implicados en el estrés oxidativo está en relación al metabolismo del óxido nítrico. Actualmente se conoce que los mecanismos de regulación de las actividades de las NOS constitutivas son más bien complejos y que las actividades de las enzimas arginasas extra hepáticas constituyen un mecanismo adicional de control de la producción de NO, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. En especial, la actividad incrementada de la enzima arginasa está relacionada con un desacoplamiento de la NOS, lo que conlleva a una producción de los radicales superóxido y peroxinitrito, marcadores de estrés oxidativo con alto potencial tóxico a las células. Sin embargo, no existen estudios que vinculen la posible alteración en la actividad de arginasa extra hepáticas con las alteraciones del metabolismo del óxido nítrico en la endometriosis; esto podría tener utilidad para abrir nuevas líneas de investigación en búsqueda de alternativas terapéuticas para este problema de salud reproductiva.

## **OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO**

Primario:

1. Comparar la actividad de la enzima arginasa en pacientes infértiles con y sin endometriosis.

Secundarios:

1. Cuantificar la actividad de arginasa en células de sangre periférica de pacientes con infertilidad asociada a endometriosis y de un grupo control.
2. Debido a que los productos estables y finales del óxido nítrico son el nitrito y el nitrato, se cuantificarán estos aniones en el plasma de sangre periférica de las pacientes y del grupo control, como medida indirecta de la producción general de óxido nítrico para correlacionarlo con la actividad de la enzima arginasa.
3. Determinar el grado de estrés oxidativo (mediante medición de los parámetros de estrés oxidativo) en sangre periférica de pacientes con endometriosis y del grupo control y correlacionarlo con la actividad de la enzima arginasa.
4. Comparar la capacidad total antioxidante en plasma de sangre periférica de pacientes con infertilidad asociada a endometriosis y su contribución al estrés oxidativo.

## HIPÓTESIS

- *La actividad de enzima arginasa en pacientes con infertilidad es diferente en presencia o no de endometriosis.*

## **DISEÑO DEL ESTUDIO**

- TIPO DE INVESTIGACION. Observacional
  
- TIPO DE DISEÑO. Transversal
  
- CARACTERISTICAS DEL ESTUDIO
  - a) Por la participación del investigador ANALITICO
  
  - b) Por temporalidad del estudio TRANSVERSAL
  
  - c) Por la lectura de los datos PROLECTIVO
  
  - d) Por el análisis de datos ANALITICO

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Lugar**

El estudio se realizó dentro de las instalaciones del Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes, con la participación del personal médico adscrito a la Coordinación de Infertilidad e investigadores adscritos al Departamento de Bioquímica y Biología molecular.

### **Pacientes**

La selección, seguimiento e idoneidad de las pacientes para el estudio fue llevada a cabo por médicos adscritos a la coordinación de Infertilidad del Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes. Fueron invitadas a participar en el proyecto aquellas pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión referidos más adelante. A las pacientes se les realizó una evaluación integral e interdisciplinaria con enfoque clínico, para clínico e imagenológico, para determinar las causas de infertilidad. Fueron invitadas a participar todas aquellas pacientes que dentro de su protocolo de estudio y abordaje les fue propuesto una cirugía laparoscópica diagnóstica, con o sin sospecha clínica de endometriosis. El manejo de los pacientes fue realizado exclusivamente por los médicos tratantes, no implicando manipulación alguna para el manejo, es decir, en aquellas pacientes que aceptaron participar se determinaron los parámetros a medir en la sangre de las pacientes así como en una muestra del líquido de fluido peritoneal teniendo como oportunidad su cirugía programada.

### **Características sociodemográficas y clínicas**

Estos datos se extrajeron del expediente clínico de las pacientes para obtener información de las características sociodemográficas así como su historial clínico médico y reproductivo.



### **Obtención de las muestras sanguíneas**

Las muestras de sangre se obtuvieron a partir de una muestra de 4 mL de sangre periférica obtenida por venopunción cubital utilizando un tubo vacutainer con EDTA el día de la cirugía programada durante su canalización, el cual fue enviado inmediatamente al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular ubicado en la torre de investigación para su procesamiento.

### **Obtención del líquido de fluido peritoneal**

Esta muestra se obtuvo una vez que se ingreso a la cavidad abdominal mediante aspiración directa con el uso de una Bomba de Hamou sobre los fondos de saco en hueco pélvico. Con el propósito de eliminar sesgos, los cirujanos laparoscopistas fueron instruidos a realizar un examen completo de las pacientes con hallazgo de endometriosis durante la cirugía, independiente a objetivos particulares de la cirugía en turno. Posteriormente las muestras fueron enviadas inmediatamente al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.

### **Clasificación de la endometriosis**

La endometriosis se clasificó según el grado de invasión, en mínima, leve, moderada y severa, de acuerdo a la clasificación vigente de la Sociedad Americana de Medicina de la Reproducción. Para ello, los cirujanos laparoscopistas fueron instruidos para realizar reportes quirúrgicos estandarizados.

### **Etapas del ciclo menstrual**

El tiempo en el que se realizó la cirugía, es decir, el mismo día en que se tomaron las muestras, fue en la fase proliferativa, debido a que la cirugía fue programada en los primeros 10 días posteriores a la fecha de última menstruación.

### **Procesamiento de las muestras sanguíneas**

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 debidamente rotulado y almacenado hasta su uso a -70 °C. Las células PMN se lavaron dos veces con solución isotónica PBS por centrifugación a 4 °C, 1000Xg/10 min. Los PMN se contaron con un hemocitómetro y fueron lisados re suspendiéndolos, a razón de  $20 \times 10^6$  cel/mL, en la siguiente solución lítica: Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 conteniendo PMSF 0,15 mM y Tritón X-100 al 0.1%, a 4 °C. Se agito con Vortex durante 30 segundos y los lisados así obtenidos se almacenaron a -70 °C hasta su uso. El paquete de eritrocitos fue lavado 3 veces por centrifugación a 500 g durante 7 minutos, a 4 °C grados centígrados, utilizando el NaCl al 0.9%. El paquete resultante fue lisado por choque hipotónico con una solución de fosfatos 5mM a un pH de 8.0

### **Procesamiento de las muestras del líquido de fluido peritoneal**

Las muestras de fluido peritoneal fueron centrifugadas a 1000Xg durante 10 minutos a 4 °C, con el propósito de sedimentar las células y separar el fluido peritoneal libre de células. El fluido libre de células se utilizó para determinar la concentración de proteínas (método de Lowry) y los parámetros de estrés oxidativo (ver más adelante).

### **Determinaciones bioquímicas**

#### **Cuantificación de la actividad de la enzima arginasa**

La actividad se determinó en los lisados de polimorfonucleares obtenidos de acuerdo al método de Corraliza y Cols (27). Se mezclaron 25 µL de lisado con 25 µL de  $MnCl_2$  10 mM y se incubaron 10 minutos a 55 °C para activar a la enzima. Se utilizó un control sin lisado. Se adicionó a los tubos 50 µL de L-Arginina 0.5 M pH 9.7 y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Para la cuantificación de la urea liberada (desarrollo del color): se adicionó a los tubos 400 µL de mezcla ácida ( $H_2SO_4:H_3PO_4:H_2O$  (1:3:7)) y 25 µL

de SPF (isonitrosopropiofenona) al 4.5 %. Se colocó en baño de agua en ebullición durante 45 minutos. Se enfrió y centrifugó a 10,000 rpm/5 min y se procedió a realizar la lectura a 544 nm en un espectrofotómetro. Para los lisados de eritrocitos se utilizaron 10 mL y se desproteinizó con ácido tricloroacético de la incubación con el sustrato arginina para eliminar la hemoglobina que interfiere con la defeción de urea. Se realizó una curva estándar de urea para transformar las unidades de absorbencia a unidades de masa.

#### Medición de nitritos y nitratos ( $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ ), productos finales del óxido nítrico en líquido del fluido peritoneal y plasma sanguíneo

Se midieron de acuerdo al método de Miranda y cols.(29). En tubos eppendorf de 1.5 mL se adicionó secuencialmente: 50  $\mu\text{L}$  de plasma o líquido de fluido peritoneal, 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada, 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{VCl}_3$  al 0.8%, 50  $\mu\text{L}$  de ácido sulfanílico al 2 % y 50  $\mu\text{L}$  de N-etilene diamida al 0.1 %. Se agitó e incubó a 37  $^\circ\text{C}$  por 1 hora. Posteriormente se adicionó 300  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético al 20 % para desproteinizar, se centrifugó a 10,000 rpm/10 min y se procedió a la lectura del sobrenadante a 545 nm en un espectrofotómetro. Se realizó una curva estándar usando  $\text{NaNO}_3$  para transformar las unidades de absorbencia a unidades de masa.

#### Parámetros de estrés oxidativo

Estos se determinaron en las muestras de plasma sanguíneo. Los lipohidroperóxidos se midieron de acuerdo a el método de El Saadani y col. (32) y el malondialdehído según la técnica de Gérard-Monnier y cols. (33). Se adicionó secuencialmente a 20  $\mu\text{L}$  de plasma: 500  $\mu\text{L}$  de KI 1M y 500  $\mu\text{L}$  del reactivo M de Beckman (cat: 14106), se incubó por 30 minutos, protegiendo de la luz y se procedió a la lectura a 360 nm. Se utilizó una curva estándar con terbutilhidroperóxido para determinar las concentraciones de hidroperóxidos presentes en las muestras.

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 (34). A los 50  $\mu\text{L}$  de plasma, se

adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de dinitrofenilhidrazina 10 mM preparada en HCl 2.5 M. Se incubó por 60 minutos a temperatura ambiente y después se adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de tricloroacético al 20 %, se agitó y centrifugó a 3000 rpm y se desechó el sobrenadante. Se lavó el precipitado de proteínas con tricloroacético al 5 % en dos ocasiones. Finalmente se disolvió el paquete de proteínas con 500  $\mu\text{L}$  de guanidina 6M. Se procedió a la lectura a 360 nm y se determinó la concentración de carbonilos usando el coeficiente de extinción molar de la dinitrofenilhidrazina de 22,000  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ .

### **Capacidad total antioxidante.**

Esta se midió en las muestras de plasma sanguíneo de acuerdo al método descrito por Apak y colaboradores (21). Para ello, en tubos tipo Eppendorf de 1.5 mL se mezclaron secuencialmente: 599  $\mu\text{L}$  de solución de nitrato cúprico 10 mM, 490  $\mu\text{L}$  de neocuprina 7.5 mM y 10  $\mu\text{L}$  de plasma sanguíneo y se agitó inmediatamente. Se incubó a temperatura ambiente por 20 minutos y se leyó a 450 nm en un espectrofotómetro. Estas lecturas corresponden a la capacidad antioxidante aportada por los componentes no proteícos de plasma sanguíneo. Posteriormente, los tubos de incubaron a 50  $^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos, se dejaron enfriar y vueltos a la luz a la misma longitud de onda. Estas lecturas corresponden a la capacidad total antioxidante, incluyendo a la aportada por proteínas y ácido úrico.

### **Preservación y desecho de las muestras.**

Las muestras de líquido de fluido peritoneal y sangre se almacenaron a -70  $^{\circ}\text{C}$  en el departamento de Bioquímica y Biología Molecular hasta completar su análisis y obtener los resultados, por lo que posterior a ello las muestras se desecharán siguiendo los lineamientos de la norma oficial mexicana para el manejo de residuos biológicos-infecciosos (NOM-087-ECOL-SSA1-2002).

## DURACIÓN

18 meses

## UNIVERSO, UNIDADES DE OBSERVACIÓN, MÉTODOS DE MUESTREO, Y TAMAÑO DE LA MUESTRA.

Universo: todas las pacientes con antecedente de infertilidad que aceptaron participar previo consentimiento informado al protocolo de investigación. Todas con infertilidad, bajo sospecha clínica o no de endometriosis.

Unidades de observación: médicos adscritos a la coordinación de infertilidad y personal adscrito al Departamento de Bioquímica del INPerIER.

Métodos de muestreo: no aleatorio de casos consecutivos.

## TAMAÑO DE LA MUESTRA

- a) Antecedente de medición de enzima arginasa en población abierta
  - a. Tipo de variable: cuantitativa continua
  - b. Nivel de medición: nmoles de urea/min/mg de proteína
  - c. ***Arginasa 13.03 ± 7.32 nmol de urea/min/mg de proteína = grupo control***
  - d. ***Arginasa 22.72 ± 10.62 nmol de urea/min/mg de proteína = grupo expuesto***

Fuente:

Guzmán AM, Nieto N, Torres Y, Montoya A, Ramírez A, Ochoa L, Flores F, Hicks JJ (2011). *Increased platelet and erythrocyte arginase activity in chronic obstructive pulmonary disease associated with tobacco or wood smoke exposure. J Investig Med.59 (3):587-592*

### **Estudio para contraste de hipótesis = comparación de 2 medias**

- Con esta fórmula pretendemos comparar si las medias de la actividad de la enzima arginasa de las muestras son diferentes entre pacientes con endometriosis y sin endometriosis

$$n = \frac{2 (Z\alpha + Z\beta)^2 * (S)^2}{(d)^2}$$

Donde:

$n$  = Tamaño muestral

$Z\alpha$  = Valor Z correspondiente al riesgo deseado. El nivel de confianza o seguridad ( $1-\alpha$ ) prefijado da lugar a un coeficiente ( $Z \alpha$ ). Para una seguridad del 95% es igual a 1.645 en hipótesis de una cola y de 1.96 en hipótesis de dos colas.

$Z\beta$  = Valor Z correspondiente al riesgo deseado. Para una potencia del 90% es igual a 1.282

$S$  = Varianza combinada de la variable cuantitativa del grupo de referencia (arginasa) =  
Desviación estándar grupo control (7.32) + Desviación estándar grupo expuesto (10.62) = 17.94 / 2 es  
igual a 8.97 desviación estándar promedio del grupo ( $s$ )

$$S^2 \text{ varianza} = (8.97)^2 = 80.4609$$

$d$  = Valor mínimo de la diferencia que se desea detectar = 22.72 - 13.03 = 9.69

$$n = \frac{2 (Z\alpha + Z\beta)^2 * (S)^2}{(d)^2} \xrightarrow{\text{Sustitución}} \frac{n = 2 (1.96 + 1.282)^2 * (8.97)^2}{(9.69)^2} = 18.01$$

**Estimación del tamaño muestral: 18 pacientes por grupo**

## **CRITERIOS DE ENTRADA (INCLUSIÓN Y NO INCLUSIÓN)**

### **Inclusión:**

Mujeres en edad reproductiva entre 18 a 35 años, con infertilidad programadas para cirugía laparoscópica diagnóstica

- Edad reproductiva:
  - 18 a 35 años
    - > 18 años, dado que alcanzan la mayoría de edad para la autorización del consentimiento bajo información para ingreso al Instituto Nacional de Perinatología, en específico para seguimiento por la Coordinación de Infertilidad
    - < 35 años, dado que este es un requisito puntual médico administrativo para poder ser aceptada para apertura de expediente clínico dentro de la institución. Este punto de edad es determinada por la Coordinación de Infertilidad basado en el hecho de que después de los 35 años existe una declinación importante de la probabilidad de lograr un embarazo en este grupo de edad, con o sin tratamiento médico.
- Infertilidad
  - Se define como infertilidad a imposibilidad de concebir un embarazo posterior a 1 año de mantener relaciones sexuales con un adecuado curso intersexual, con una única pareja y sin uso de métodos de anticoncepción.
- Programadas para cirugía laparoscópica
  - Todas las pacientes que ingresan para seguimiento en la consulta de infertilidad, dentro de su abordaje se les propone realizar una cirugía laparoscópica con fines diagnósticos o terapéuticos de patologías asociadas a infertilidad. Esta cirugía es el paso último dentro del abordaje integral y posterior a ello se propone el plan de tratamiento y pronóstico para la búsqueda del embarazo.

- Cabe recordar como se menciona en los antecedentes, la probabilidad de diagnosticar endometriosis al momento de una cirugía laparoscópica en una paciente con infertilidad es del 40 al 50%. Dado este antecedentes, de las pacientes que sean invitadas a participar y acepten, la mitad de ellas tendrá endometriosis, a las cuales se tomarán las muestras para analizar, y la otra mitad de pacientes no tendrá endometriosis y se les tomarán las muestras para analizar las cuales servirán de grupo control para la comparación de los resultados.

**No inclusión:**

- Pacientes con enfermedades reumatológicas e infecciones agudas conocidas
- Pacientes que se administran de manera crónica medicamentos anti inflamatorios
- Tabaquismo
- Diabetes mellitus
  - El motivo de no incluir estas pacientes basado en estos 4 criterios, se debe a que es conocido por estudios previos que generan un desequilibrio en el sistema pro oxidante versus oxidante y tienen una tendencia al estrés oxidativo, por lo que generaría resultados falsos positivos en las pruebas de estrés oxidativo descritas

**CRITERIOS DE SALIDA (EXCLUSIÓN Y ELIMINACIÓN)**

Pacientes que abandonen el tratamiento y/o seguimiento por la Coordinación de Infertilidad, muestras de sangre hemolizadas y pacientes que por complicaciones operatorias no se le pueda tomar la muestra de fluido del líquido peritoneal.



## **VARIABLES EN ESTUDIO**

### VARIABLE INDEPENDIENTE

#### A. Endometriosis.

- a. Definición conceptual: presencia de glándulas endometriales y estroma fuera de la cavidad uterina y del miometrio. Estos implantes endometriales usualmente están localizados en la pelvis, pero pueden ocurrir en cualquier lugar del organismo. Se asocia con síntomas como dolor pélvico, dismenorrea severa y dispareunia o ser asintomática, también es un factor causal de infertilidad y puede ser descubierto incidentalmente en una cirugía.
- b. Definición operacional: se considera esta variable presente cuando haya sido hecho el diagnóstico por los médicos tratantes durante la cirugía laparoscópica, por visualización directa de los implantes endometriales de acuerdo a criterios revisados de la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva para el diagnóstico de endometriosis (revised ASRM, 1996). Esta se clasifica en mínima, leve, moderada o severa según características en la forma, localización, apariencia, extensión y grado de invasión.
- c. Tipo de variable: dicotómica.
- d. Nivel de medición: presente o ausente.

### VARIABLES DEPENDIENTES

#### B. Actividad de la enzima arginasa.

- a. Definición conceptual: las actividades enzimáticas se definen como la cantidad de producto formado (urea) por unidad de tiempo (minutos). La actividad específica considera también la cantidad de proteína utilizada, es decir, se expresa en nanomoles de urea /mg proteína
- b. Definición operacional: nmoles de urea/min/mg de proteína
- c. Tipo de variable: cuantitativa continua
- d. Nivel de medición: nmoles de urea/min/mg de proteína

C. Concentración de nitritos y nitratos.

- a. Definición conceptual: concentración de los aniones nitritos y nitratos capaces de reaccionar con los componentes de la mezcla de detección para desarrollar un color, el cual será medido espectrofotométricamente y cuya intensidad será directamente proporcional a su concentración.
- b. Definición operacional: nmoles de nitrito y nitratos / mL.
- c. Tipo de variable: cuantitativa continua.
- d. Nivel de medición: nmoles de nitrito y nitratos / mL.

D. Parámetros de estrés oxidativo

- a. Definición conceptual: estos parámetros incluyen: lipohidroperóxidos, malondialdehído y carbonilos. Los lipohidroperóxidos y el malondialdehído representan alteraciones en los diferentes lípidos inducidos por el estrés oxidativo, mientras que los carbonilos a las alteraciones en las proteínas.
- b. Definición operacional: nmoles del parámetro/mL ó /mg de proteína.
- c. Tipo de variable: cuantitativa continua.
- d. Nivel de medición: nmoles del parámetro/mL ó /mg de proteína.

E. Capacidad total antioxidante CUPRAC (Copper reducing antioxidant capacity)

- a. Definición conceptual: método que analiza la capacidad total antioxidante en plasma y proteínas basado en una reducción del complejo Cu (II) – Neocupreína al complejo altamente colorimétrico Cu (I) - Neocupreína por los antioxidantes presentes en la muestra
- b. Definición operacional: equivalentes trolox/mL de plasma o mg de proteína.
- c. Tipo de variable: cuantitativa continúa.
- d. Nivel de medición: equivalentes trolox/mL de plasma o mg de proteína.

## **PLAN DE ANÁLISIS.**

Valoración estadística: Se realizará el análisis estadístico con los paquetes PASW versión 18.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA). Las características sociodemográficas de la población caracterizaron con estadística descriptiva, proporciones para variables cualitativas y media con desviación estándar para variables cuantitativas. Se evaluará la normalidad en la distribución de los datos mediante prueba de Kolmogorov Smirnov y las diferencias entre sus medias será determinada con prueba *t* de Student o prueba de Wilcoxon en caso de no cumplir con supuestos de pruebas paramétricas.

La diferencia entre grupos de estratificación por clasificación de endometriosis fue evaluada con prueba de ANOVA o Kruskal Wallis de acuerdo a las características de la variable dependiente. Se ajustará el número de pacientes por grupo para una *p* de 0.05 en prueba de Kruskal Wallis.

<b>Objetivos</b>	<b>Hipótesis</b>	<b>Técnica estadística</b>
Establecer si la actividad de la enzima arginasa en polimorfonucleares y eritrocitos de sangre periférica es diferente en pacientes con endometriosis e infertilidad respecto a pacientes sin endometriosis e infertilidad.	La actividad de la enzima arginasa esta incrementada en pacientes con endometriosis.	2 grupos: T student no pareada U de Mann-Whitney  3 grupos: ANOVA o Kruskal Wallis
Determinar si existen diferencias en la capacidad total antioxidante en plasma de pacientes con endometriosis e infertilidad respecto a pacientes sin endometriosis e infertilidad	La capacidad total antioxidante esta disminuida en pacientes con endometriosis.	2 grupos: T student no pareada U de Mann-Whitney  3 grupos: ANOVA o Kruskal Wallis

<p>Medir y comparar parámetros de estrés oxidativo [grupos carbonilo, malondialdehído (MDA), lipohidroperóxidos (LOOH)] I y plasma de pacientes con endometriosis e infertilidad respecto a pacientes sin endometriosis e infertilidad</p>	<p>Los parámetros de estrés oxidativo están aumentados en pacientes con endometriosis</p>	<p>2 grupos: T student no pareada U de Mann-Whitney</p> <p>3 grupos: ANOVA o Kruskall Wallis</p>
<p>Cuantificación de nitritos y nitratos en líquido del fluido peritoneal y plasma sanguíneo de pacientes con endometriosis e infertilidad respecto a pacientes sin endometriosis e infertilidad</p>	<p>La concentración de nitritos y nitratos están aumentados en ambos compartimentos en pacientes con endometriosis</p>	<p>2 grupos: T student no pareada U de Mann-Whitney</p> <p>3 grupos: ANOVA o Kruskall Wallis</p>

## **ASPECTOS ÉTICOS**

De acuerdo al artículo 17 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, la participación de los pacientes en este estudio conlleva un tipo de riesgo: riesgo mínimo

## RESULTADOS

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

Se obtuvo un total de 63 pacientes, de estas 24 pacientes fueron diagnosticadas sin endometriosis, 39 con endometriosis, de estas ultimo grupo 29 pacientes con endometriosis grado I-II y 10 pacientes con endometriosis grado III-IV. Con este grupo de pacientes cumplimos con las estimaciones del tamaño de muestra calculado.

Se asumió una distribución normal exclusivamente para actividad de arginasa en eritrocitos, lipohidroxiperóxidos 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 actividad de arginasa en polimorfonucleares, 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 Kruskall 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.

Los resultados del objetivo primario que fue la actividad de enzima arginasa, no pudimos encontrar diferencias en pacientes sin endometriosis y con endometriosis, tanto en la actividad en eritrocitos ( $7.27 \pm 3.43$  versus  $9.31 \pm 4.40$  nmoles urea/min/mg proteína;  $p=0.06$ ) como tampoco en la actividad en polimorfonucleares ( $146.9 \pm 73.1$  versus  $155.7 \pm 118.4$  nmoles urea/min/mg proteína;  $p=0.59$ ). Al comparar estas medias en 3 grupos encontramos una tendencia no significativa hacia un aumento de actividad de arginasa ( $7.27 \pm 3.43$  en grupo 1,  $8.95 \pm 4.23$  en grupo 2 y  $10.3 \pm 4.96$  en grupo 3;  $p=0.12$ ) en eritrocitos.

Dentro del análisis medimos los marcadores séricos, encontramos una concentración de lipohidroperóxidos 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 lipohidroperóxidos 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  $0.084 \pm 0.026$  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  $9.38 \pm 5.41$  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 post hoc 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). De la misma manera corrimos la prueba de Tamhane asumiendo que se trata de una distribución no paramétrica con un número de sujetos diferentes para cada grupo, ubicando esta diferencia de medias con el nivel de significancia más alto entre el grupo de endometriosis I y II contra el grupo de endometriosis III y IV;  $p=0.11$ .

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;  $p=0.72$ ).



## **DISCUSIÓN**

La endometriosis es una entidad crónica que afecta en mayor proporción a mujeres en su etapa reproductiva y que está asociada a infertilidad y tiene 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 (1). Los oxidantes son compuestos electrofílicos que tienen afección por los electrones y que tienen afinidad para reaccionar con macromoléculas nucleofílicas, muchas de ellas de la mayor importancia biológica. La intención de este estudio fue la de establecer si existe un incremento dado por estrés oxidativo asociada a un aumento de la actividad de la enzima arginasa en el contexto de la presencia de endometriosis y su grado de severidad de la enfermedad, lo cual contribuiría a profundizar en su fisiopatología. Este mecanismo de daño ha sido documentado en diversas patologías, tales como diabetes (2,3), enfermedad cardiovascular y aterosclerosis (4), anemia hemolítica falciforme (5), disfunción eréctil (6) y asma (7).

Queda claro en estudios previos la evidencia de como el estrés oxidativo juega un papel importante dentro del desarrollo y progresión de la endometriosis (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).

El significado fisiológico que se ha atribuido a la enzima arginasa es el de regular la bio disponibilidad de L-arginina para otras vías metabólicas, como la regulación de la síntesis del óxido nítrico (NO) y de los procesos de proliferación y remodelación celulares; de tal manera que cuando la actividad de la arginasa se encuentra incrementada, se disminuye la disponibilidad de arginina para la síntesis de óxido nítrico y se favorece la formación de especies reactivas del oxígeno y con ello, la alteración conocida como estrés oxidativo. Es por esto que actualmente se considera que diversas patologías que involucran alteraciones en el metabolismo del óxido nítrico se encuentran

asociadas a incrementos en la actividad de la enzima arginasa (22, 30, 31). En nuestro estudio encontramos una tendencia no significativa a la elevación de la actividad de la enzima arginasa en eritrocitos acompañando al fenómeno de estrés oxidativo dado en la endometriosis, sin embargo no alcanzan diferencias estadísticamente significativas.

Encontramos datos de un desbalance del sistema oxidante y antioxidante a favor de un aumento en la concentración de nitritos y nitratos a nivel sistémico en el grupo de endometriosis severa, lo cual no se evidencio a nivel del fluido peritoneal. Este aumento en presencia de nitritos y nitratos son un reflejo indirecto de una disminución en la producción de óxido nítrico (30, 31). Incluso existe el antecedente de esta asociación, Sankaralingam y colaboradores en 2010, publicaron su estudio donde demuestran un aumento de la actividad de enzima arginasa asociado como disparador de estrés oxidativo, observaron un aumento en la generación de nitritos y nitratos correlacionada a un aumento de la arginasa. La explicación de que esta disminución en la producción de óxido nítrico podría estar dada 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, causando 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 el desarrollo ovocitario con la resultante incapacidad de fertilizar.

Respecto a la medición de otros marcadores de estrés oxidativo como el malondialdehído y los lipohidroperóxidos, productos de la peroxidación de lípidos de las membranas celulares (31) y la concentración de carbonilos de residuos en proteínas, que es un indicador de la daño a proteínas (25), no mostraron diferencias en su concentración en nuestros diferentes grupos de pacientes con infertilidad asociada o no a endometriosis.

A nivel de líquido peritoneal cuantificamos la presencia de carbonilación en proteínas así como la concentración de nitritos y nitratos, sin encontrar diferencias entre grupos. Esta última medición de nitritos y nitratos, contrasta con nuestros hallazgos a nivel sistémico donde si existe diferencias significativas hacia un aumento en la concentración de nitritos y nitratos en el grupo de endometriosis severa, por lo que la ausencia de este elevación en líquido peritoneal estaría explicada por 2 formas, una es que existe un sistema antioxidante efectivo a nivel local que podría proteger a los ovocitos y órganos reproductivos con tendencia a disminuir este daño y la otra que es que al ser moléculas inestables, decaen rápidamente su concentración en fluidos corporales en comparación con la sangre (32). Este contraste en la diferencia de concentración entre fluidos, es indicativo de que esta concentración medida es diferente ya que se da en tiempo específico bajo condiciones de estabilidad dentro del proceso dinámico que es el estrés oxidativo.

Por otro lado a pesar de este aumento de la presencia de nitritos y nitratos, un marcador indirecto de desacoplamiento de la sintasa del óxido nítrico, nuestro resultados demuestran que la capacidad total antioxidante no se ve afectada a nivel sistémico. La respuesta a este desequilibrio a favor de oxidación se puede evaluar de manera indirecta por la capacidad total antioxidante, que es una prueba que mide los efectos antioxidantes combinados de las defensas no enzimáticas en fluidos biológicos. La evaluación de este indicador en plasma ha sido desarrollada y validada por Apak y colaboradores (21), a través del método de CUPRAC, que se basa en la reducción del complejo de hierro (II)-neocupreína, esta prueba tiene las ventajas de ser estable, accesible, selectiva y que responde a una gran cantidad de antioxidantes biológicamente importantes. 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. 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 decir, 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, como los hallazgos que reportaron Prieto y colaboradores (26) en 2012, donde midieron la capacidad total antioxidante a nivel líquido folicular encontrándola disminuida en paciente con endometriosis.

Finalmente nuestros resultados representan una oportunidad para evaluar nuevas técnicas de medición de la enzima arginasa en tejido endometrial ectópico, propio de la endometriosis, teniendo como antecedente esta tendencia no significativa hacia un aumento de su actividad a nivel sistémico, desconocemos si pudiera alcanzar diferencias significativas a través de su medición local. De manera secundaria, aunque nuestro estudio no es propio para realizar inferencias de causalidad del papel que juegan este aumento en la concentración de nitritos y nitratos, puede incentivar la generación hipótesis acerca del efecto de terapias en estudios con diseños diferentes.

## **CONCLUSIÓN**

No hay diferencias en la actividad de la enzima arginasa. 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 esta directamente involucrado con la actividad de enzima arginasa. No se 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

## **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, Régnard Kheira, Moze-Henry N, Jean-Claude Y, Chaudiere J. Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4 hydroxyalkenals.

- 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 peroxy nitrite 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.
  29. <http://faculty.virginia.edu/kruskalwallis/paper/A%20comparison%20of%20the%20Exact%20Kruskal-v4.pdf>
  30. Sankaralingam S, Xu H, Davidge S. Arginase contributes to endothelial cell oxidative stress in response to plasma from women with preeclampsia. *Cardiovascular Research* (2010) 85, 194–203
  31. Guzmán AM, Nieto N, Torres Y, Montoya A, Ramírez A, Ochoa L, Flores F, Hicks JJ (2011). Increased platelet and erythrocyte arginase activity in chronic obstructive pulmonary disease associated with tobacco or wood smoke exposure. *J Investig Med*.59 (3):587-592
  32. Grau M, Hendgen-Cotta UB, Brouzos P, Drexhage C, Rassaf T, Lauer T, Dejam A, Kelm M, Kleinbongard P. Recent methodological advances in the analysis of nitrite in the human circulation: nitrite as a biochemical parameter of the L-arginine/NO pathway. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* (2007) May 15, 851 (1-2): 106-23.



## ANEXOS

### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Estimada paciente del Instituto Nacional de Perinatología:

Le estamos invitando a Usted por medio de esta carta a participar en un estudio de investigación que se desarrolla en este Instituto. Los problemas de infertilidad en las parejas son un problema importante de salud en nuestra población, es por esto que el Instituto Nacional de Perinatología realiza estudios que buscan las causas que generan estos problemas de infertilidad.

En este proyecto de investigación estudiaremos las causas que originan la endometriosis, que significa la presencia de tejido endometrial (este es el tejido que recubre por dentro su útero o matriz, recubriéndola la cavidad donde se forman los embarazos), y en esta enfermedad se encuentra de manera anormal la presencia de este tejido por fuera del mismo útero en cualquier sitio diferente de todo su organismo, en la mayoría de los casos en órganos localizados a nivel de su pelvis y que tienen una función de reproductiva como es el embarazo, estos órganos son el ovario, las trompas de Falopio y peritoneo que es el tejido que recubre el abdomen por dentro, entre otros. Esta enfermedad provoca infertilidad alterando en diferentes pasos el fenómeno reproductivo, es decir el logro de un embarazo, desde la liberación del óvulo por parte de su ovario hasta la implantación del huevo o cigoto en su útero o matriz.

Esta enfermedad se sospecha su presencia por la presencia de: infertilidad, dolor durante las relaciones sexuales, dolor durante la menstruación y/o dolor pélvico crónico. En el caso de infertilidad, por investigaciones previas realizadas en nuestro Instituto y en otras hospitales del mundo se conoce que llega estar presente hasta en la mitad de los casos, es decir 1 de cada 2 pacientes con problemas de infertilidad. Su médico tratante dentro de la búsqueda de las causas que originan su infertilidad, le ha propuesto una cirugía con fines diagnósticos denominada laparoscopia diagnóstica de la cual Usted ha otorgado su consentimiento. Es través de esta cirugía, donde el médico puede corroborar o descartar la presencia de la enfermedad conocida como

endometriosis, ya que la única forma de diagnosticar esta enfermedad es través de la visualización directa por parte de su médico durante la cirugía.

Nuestra intención es investigar si algunas sustancias de su organismo, conocidos como marcadores de estrés oxidativo, están asociadas como causas que originan esta enfermedad de endometriosis. De corroborarse estos hallazgos que planteamos, contribuiría de manera importante a conocer los mecanismos que originan este problema y como afecta el hecho de no poder lograr un embarazo, lo cual podría tener utilidad para proponer nuevas investigaciones en búsqueda de alternativas de tratamiento a este problema de salud reproductiva.

Para conocer y tratar las causas que ocasionan su infertilidad, su médico tratante le propuso realizar un estudio llamado laparoscopia diagnóstica de la cual Usted ha otorgado su consentimiento. Esto la convierte en candidata para poder invitarla a participar en nuestro estudio.

Si usted acepta participar en nuestro protocolo, se le tomaran dos muestras el día de su cirugía. La primera muestra para recolectar es de sangre (aproximadamente de 10 mililitros, equivalente a 1 cucharada). Esta toma de muestra de sangre venosa es similar a la que se le toma para cualquier estudio de laboratorio. Se realizará un aseo de la piel con alcohol para tomar la muestra con una aguja convencional. Es importante mencionar que se aprovechara el momento para recolectar la muestra de sangre cuando su enfermera asignada a su cama en hospitalización la canaliza en su vena para colocarle una solución (suero) el día de su cirugía previamente a su ingreso a quirófano, esto con el fin de no exponerla a un nuevo riesgo por una nueva punción para recolectar la muestra.

Ya en quirófano, durante la cirugía, dentro de su abdomen y su pelvis, el tejido que recubre se le conoce como peritoneo y este secreta un líquido conocido como fluido peritoneal, el cual se encuentra libre, y que continuamente se secreta y se reabsorbe. En la mujer este líquido tiende a acumularse dentro de la parte más baja, justo por detrás de su útero o matriz, en un área anatómicamente conocida como fondo de saco de Douglas. En la cirugía de manera habitual su médico tratante explora esa área junto a otras del abdomen en búsqueda intencionada de alteraciones. En este momento su médico tratante aspira este líquido hacia afuera de la cavidad de

la pelvis para poder observar con detalle el área anatómica, y este líquido se desecha en un recolector existente en quirófano, en este momento, a partir de este líquido recolectado, tomamos una muestra del mismo, aproximadamente entre 5 a 10 mL equivalente media o una cucharada, y es enviada junta a la muestra de sangre previamente recolectada para su análisis al laboratorio.

La toma de la muestra de líquido peritoneal no tiene un riesgo adicional a los ya explicados por su médico tratante secundario al procedimiento de cirugía. Estas muestras serán procesadas y almacenadas hasta el análisis completo de las sustancias antes señaladas, para después ser desechadas de acuerdo a las indicaciones del manejo de materiales biológicos. Las molestias ocasionadas por la toma de sangre son dolor en el sitio del piquete, además probablemente sienta un poco de ardor por el alcohol. Así mismo está reportado como complicación muy rara que pueda fugarse parte de la sangre previa a su coagulación a través del sitio piquete formando una colección de sangre entre los tejidos conocido como hematoma o “moretón”, el cual se reabsorbe en un periodo de 4 a 6 semanas y no requiere algún otro tipo de tratamiento médico.

Estos exámenes realizados para este proyecto de investigación no tendrán ningún costo para usted. Los costos generados por el abordaje de su problema de infertilidad serán cubiertos por Usted, es decir las consultas, medicamentos, estudios de laboratorio y procedimientos quirúrgicos según lo dictamine el Instituto ya que estos estudios no pertenecen al proyecto de investigación. El seguimiento que se dará a su problema de infertilidad será el estándar del Instituto y el apropiado para su condición. El participar en este estudio no motivará ningún cambio en el manejo médico. De la misma forma, si usted decide rechazar la invitación o en algún momento desea abandonar el estudio, no se modificará la atención institucional.

Como resultado de esta investigación, no esperamos un beneficio directo a Usted, pero los conocimientos generados a partir de este estudio contribuirán al conocimiento de las causas que originan esta enfermedad y podrán beneficiar en el futuro a las mujeres con problemas de infertilidad, similar al suyo.

Todos los datos en el estudio tienen un carácter estrictamente confidencial, y no serán dados a conocer bajo ninguna circunstancia si usted no lo autoriza específicamente. Cualquier duda o aclaración surgida posteriormente en relación a este estudio de investigación acerca de los procedimientos, riesgos, beneficios o cualquier asunto competente al proyecto de investigación puede ser aclarada por el Dr. Julio Francisco de la Jara Díaz en la Coordinación de Infertilidad dentro del Instituto o través del teléfono 55-20-99-00, extensión 239 y 341.

Cualquier queja o asunto competente a este proyecto de investigación que la deje insatisfecha puede acudir a:

- **Dirección de Investigación** ubicada en el quinto piso de la torre de Investigación o través del teléfono 55 20 99 00 extensión 160 y 662
- **Dirección General** ubicada en el primer piso del edificio administrativo ubicado adjunto al área de consulta externa o través del teléfono 55 20 99 00 extensión 108 y 109

El resultado del análisis de las muestras no se incluirán en su expediente ya que estas pruebas son de carácter experimental y no tendrán significado dentro de su tratamiento de infertilidad.

Este consentimiento bajo información tiene la finalidad que en caso de que Usted acepte a participar en el estudio, nos autorice su participación en la investigación, con pleno conocimiento de la naturaleza de los procedimientos y riesgos a los que se someterá, con la capacidad de libre elección y sin coacción alguna.

## **AUTORIZACIÓN DE PARTICIPACIÓN**

YO \_\_\_\_\_

Nombre del participante o de su representante legal

Declaro libremente que estoy de acuerdo en participar en esta investigación cuyo objetivo, procedimientos, beneficios, y riesgos se especifican en el apartado A de este documento.

Es de mi conocimiento que los investigadores me han ofrecido aclarar cualquier duda o contestar cualquier pregunta que, al momento de firmar la presente, no hubiese expresado o que surja durante el desarrollo de la investigación.

Se me ha manifestado que puedo retirar mi consentimiento de participar en cualquier momento sin que ello signifique que la atención médica que se me proporcione, se vea afectada por este hecho.

Se me ha informado que el participar en este estudio no afectará el costo de la atención médica que se me deba brindar y que toda la información que se otorgue sobre mi identidad y participación será confidencial, excepto cuando yo lo autorice. Para los fines que convengan, firmo la presente junto al investigador que me informó y dos testigos, conservando una copia del consentimiento informado y la información otorgada para obtener mi autorización.

México D.F. a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_.

	NOMBRE	FIRMA
PARTICIPANTE	_____	_____
Dirección	_____	
REPRESENTANTE	_____	_____
Dirección	_____	
INVESTIGADOR	_____	_____
Dirección	_____	
TESTIGO	_____	_____
Dirección	_____	
TESTIGO	_____	_____
Dirección	_____	

## **RECLUTAMIENTO DE PACIENTES**

### ANEXO A

#### PROCEDIMIENTO PARA LA INVITACIÓN A PARTICIPAR EN EL ESTUDIO

Área donde se invitará a participar a la paciente:

Consulta Externa

Área donde se ratificara de su participación:

Hospitalización en quinto piso de Ginecología en el Instituto Nacional de Perinatología

Área donde se realiza la toma de muestra bajo consentimiento:

- Muestra sanguínea:
  - o Hospitalización en quinto piso de Ginecología en el Instituto Nacional de Perinatología
  - o Toma de 10 ml de sangre durante la punción realizada para realizar una canalización previa intravenosa el día de su cirugía programada
- Muestra de líquido de fluido peritoneal
  - o Quirófanos de cirugía laparoscópica del área quirúrgica del hospital
  - o Metodología se especifica previamente en la metodología del estudio

Condiciones:

1. Sólo se invitará a participar en el proyecto a pacientes del Instituto que no cursen con:
  - o Pacientes con enfermedades reumatológicas e infecciones agudas conocidas y aquellas que se administran de manera crónica medicamentos anti inflamatorios.
  - o Tabaquismo
  - o Diabetes mellitus
  - o Alteraciones del ciclo menstrual
  
2. El momento oportuno para invitar a la paciente es cuando su médico tratante le propone realizar una cirugía laparoscópica tanto como por fines diagnósticos como por fines terapéuticos. Las pacientes que acepten esta cirugía, serán abordadas posterior al término de su consulta con su médico tratante dentro de un consultorio diferente en el área de la consulta externa por el Dr. Jorge García Vargas, médico residente de Biología de la Reproducción Humana, lo que evitaría algún tipo de dependencia, ascendencia o subordinación del sujeto de investigación hacia el médico tratante o investigador. Se realizará una entrevista inicial en la cual se planteará a la paciente la existencia del proyecto de investigación y se preguntará si está interesada en participar.
  
3. La entrevista introductoria será iniciada con la frase: “Señora XX, mi nombre es XX, soy médico residente del servicio de Biología de la Reproducción Humana, estamos realizando una investigación en el Instituto propuesta por la Coordinación de Infertilidad a la cual quiero invitarla a participar, es importante decirle que su participación o la negación a hacerlo no modifica en absolutamente nada el trato y los cuidados hospitalarios que le brindaremos, si Usted me permite su tiempo le explicare con detalle”
  - Si la paciente niega esta petición inicialmente, agradecemos su atención y damos por terminada la conversación

- Si la paciente no tiene tiempo en ese momento, se le hará extensa una invitación para acordar un momento oportuno para explicarle del proyecto siempre y cuando esta fecha acordada sea previo a su cirugía programada y sólo en fechas en que la paciente tenga que venir al Instituto por alguna indicación de su seguimiento, por ejemplo, cuando viene para toma de laboratorio, estudios de imagen, citas con trabajo social, valoración pre operatoria, previamente programados, esto con la finalidad de no hacerla venir exclusivamente al Instituto solo para invitarla al proyecto, más bien aprovechar la oportunidad cuando la paciente tenga que acudir por algún otra situación
  - Si la paciente accede a la petición, se le invitara a pasar a un consultorio anexo libre dentro del área de la consulta externa donde se le explicara a detalle el procedimiento.
4. La permanencia en el proyecto se hará una vez ratificada su participación en el servicio de hospitalización el día previo a su cirugía.
  5. El investigador que invita a participar a la paciente se mantendrá ajeno al manejo médico y quirúrgico de la misma.

## ANEXO B

### EXPLICACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN Y ENTREGA DE APARTADO DE INFORMACIÓN

- Al principio a la paciente se le explicará que dentro de la misión y visión del Instituto, uno de sus pilares es la investigación, que permita resolver problemas nacionales de salud reproductiva y perinatal de alta complejidad a través de investigaciones científicas de alto nivel de excelencia que permita el desarrollo de modelos de atención e innovación tecnológica para la salud.
- Explicado esto, le damos a conocer que basados en esta primicia la Coordinación de Infertilidad en conjunto con el departamento de Bioquímica del Instituto han elaborado un protocolo de investigación que tiene la finalidad de contribuir al conocimiento del origen y mecanismo de daño de la enfermedad denominada endometriosis.
- Enseguida se le da a conocer qué es la endometriosis, las causas probables, los daños y sintomatología que causa, su asociación y su prevalencia en pacientes que tienen infertilidad.
- Le explicamos en lenguaje práctico y coloquial nuestra hipótesis acerca de la asociación entre el estrés oxidativo disparado por la enzima arginasa en pacientes con endometriosis e infertilidad y le externamos la justificación del porqué queremos realizar este proyecto.
- Se le explica por qué es candidata al proyecto según nuestros criterios de inclusión y exclusión.
- Se le explica la forma como se hará el estudio, la recolección de muestras a estudiar
- Se le da a conocer los riesgos de recolectar las muestras los cuales se especifican en el apartado de información y que en caso de presentarse como las abordaremos.
- Se le externa de manera clara de que no se espera beneficios directos del estudio en este momento.
- Se le explica que en caso de aceptar a participar en el proyecto, esta información así como los datos obtenidos serán manejadas en forma confidencial y que estos no serán dados a conocer bajo ninguna circunstancias a menos que la paciente lo autorice.
- Se le explica que si acepta, se obtendrán las características sociodemográficas de manera retrospectiva a través de la revisión del expediente clínico por el equipo humano desarrollador del proyecto con el fin de describir de manera más detallada los resultados, los cuales se mantendrá de manera confidencial y no serán expuestos a menos que la paciente lo autorice.
- Respecto a las muestras biológicas obtenidas, una vez procesados los análisis resultantes, estas serán desechadas siguiendo la normatividad descrita en la norma oficial mexicana en relación al desecho de residuos biológicos.
- Una vez explicado a través de comunicación verbal la propuesta de investigación, se le extiende una copia del consentimiento informado e información proporcionada en el cual se declara por escrito lo previamente explicado para que lo lea con detenimiento, y se le comentará la opción de que puede leerlo, razonarlo y decidir acerca de su participación en el proyecto. Se le explica que si la paciente desea aceptar a participar en el estudio, se puede pasar a la firma de la autorización y consentimiento informado. En caso de duda en su decisión, se le ofrecen aclararlas y se le planteara la alternativa de que puede llevarse una copia por escrito del mismo a su domicilio para tomarse el tiempo que considere pertinente si lo desea así para decidir su participación en el estudio.



## ANEXO C

### EXPLICACIÓN DEL CONTENIDO Y PETICIÓN DEL CONSENTIMIENTO BAJO INFORMACIÓN

- Se le da a conocer en qué consiste el consentimiento informado en términos legales, el cual se define como un acuerdo por escrito, mediante el cual el sujeto de investigación (la paciente) o, en su caso, su representante legal autoriza su participación en la investigación, con pleno conocimiento de la naturaleza de los procedimientos y riesgos a los que se someterá, con la capacidad de libre elección y sin coacción alguna.
- Se le extiende una copia del consentimiento informado donde se declara por escrito todo lo previamente explicado.
- Se le explica a la paciente que el consentimiento informado es basado en recomendaciones de la normatividad vigente al reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación en Seres Humanos y que éste ha sido aprobado y asesorado por el Comité de Bioética del Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes.
- Se le explica que si acepta a participar en el estudio se tiene que firmar el consentimiento informado por la paciente, por el investigador y un par de testigos más.
- Así mismo si la paciente acepta participar en el estudio, se le da a conocer la posibilidad que en cualquier momento ya no desea participar y/o abandonar el estudio, no condicionará ni modificará en lo absoluto su atención dentro de la institución.
- En caso de que la paciente le sea imposibilitado leer o es analfabeta, será acompañado y asesorado por un representante legal o tutor designado por la paciente para asesorarla. En caso de confirmar su participación en el estudio, y no supiese firmar, la paciente podrá imprimir su huella digital y en su nombre firmará otra persona que la paciente designe.

ANEXO C  
ACLARACIÓN DE DUDAS

- Se le dará a conocer que cualquier duda puede contactar al Dr. Julio Francisco de la Jara Díaz en la Coordinación de Infertilidad situada en el tercer piso de Hospitalización y por el Dr. Alberto Martín Guzmán Grenfell en el departamento de Bioquímica y Biología Molecular situado en el tercer piso de la Torre de Investigación, ambos dentro del Instituto o través del teléfono 55-20-99-00, extensión 239 y 341 respectivamente.

## **ORGANIZACIÓN, FACTIBILIDAD Y VIABILIDAD DEL ESTUDIO**

¿SE REQUIERIERON RECURSOS HUMANOS O MATERIALES NO EXISTENTES EN EL INSTITUTO PARA LA REALIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN?

Si. Anticuerpos contra arginasa, Polymorphprep y los reactivos para las determinaciones de los parámetros de estrés oxidativo.

¿SE REQUIERIO CAPACITACIÓN AL PERSONAL QUE PARTICIPARÁ EN EL ESTUDIO?

No

¿QUÉ TIPO DE FINANCIAMIENTO REQUIERE ESTE PROTOCOLO?

Interno

**P R E S U P U E S T O S O L I C I T A D O**

**Título del Protocolo:** Participación de la arginasa y del estrés oxidativo en pacientes con endometriosis.

**Investigadores responsables:** Dr. Alberto Martín Guzmán Grenfell / Dr. Jorge García Vargas

<b>Sub Cuenta</b>	<b>CONCEPTO</b>	<b>NÚMERO</b>	<b>COSTO UNITARIO (paciente, caso, muestra, encuesta, etc.)</b>	<b>COSTO SUBTOTAL</b>
<b>01</b>	<b>Unidad de Investigación</b> <b>01.1. Pacientes</b>  <b>01.1.1. Hospitalización día/cama</b> <b>01.1.2. Consulta médica</b> <b>01.2. Otros (especificar)</b>	A determinar 0 0 0	----- \$ 0.00 \$ 0.00 \$ 0.00	\$ 0.00
<b>02</b>	<b>Personal auxiliar</b> <b>02.1. Médico</b> <b>02.2. Enfermería</b> <b>02.3. Secretarial</b> <b>02.4. Capturista</b> <b>02.5. Encuestador</b> <b>02.6. Otros (especificar)</b>	6 0 0 1 0 0	\$ 0.00 ----- ----- \$ 0.00 \$ 0.00 -----	\$ 0.00
<b>03</b>	<b>Exámenes de laboratorio</b>	0	-----	\$ 0.00
<b>04</b>	<b>Estudios de gabinete</b>	0	-----	\$ 0.00
<b>05</b>	<b>Estudios especiales (describir)</b>	0	-----	\$ 0.00

<b>06</b>	<b>Materiales y equipo:</b>		
	Polymorphprep para la separación de células 100 mL X 10	\$ 20, 000	
		\$ 8, 600	
	Anticuerpo Anti-Arginasa I, 200 µg X 2	\$ 8, 600	
	Anticuerpo Anti-Arginasa II, 200 µg X 2	\$ 2, 500	
	Anticuerpos secundario-HRP Anti IgG conejo 1 mL	\$ 2, 500	
	Anticuerpos secundario-HRP Anti IgG cabra 1 mL	\$ 2, 500	
		\$ 9, 000	
	Anticuerpos secundario-HRP Anti IgG ratón 1 mL	\$ 6, 000	
		\$ 2, 000	
	Anticuerpo Anti-Tyr-Nitro 100 µg X 2	\$ 2, 000	
	Anticuerpo Anti-Actina 100 µg	\$ 2, 200	
	Inhibidores de proteasas	\$ 1, 900	
	Etándares de peso molecular para electroforesis	\$ 6, 000	
		\$ 2, 500	
	Acido tricloroacético 500 g	\$ 1, 800	
	A-Isonitrosopropiofenona 50g	\$ 3, 000	
		\$ 11, 000	
	Trizma base 1Kg X 2	\$ 1, 800	
	Albúmina bovino 50g	\$ 2, 500	
	\$ 2, 500		
Glicina 1 Kg X 2	\$ 8, 300		
	\$ 8, 300		
CHOL-(CHOD-PAD) Roche Kit 12X65 mL	\$ 8, 300		
Azul de tetrazolio 250 mg	\$ 3, 200		

	<p>5,5-Ditiobis-nitrobenzóico 10 g</p> <p>Hepes 250g</p> <p>ECL Plus Western Blotting Reagent</p> <p>N<sup>W</sup>-Hydroxy.nor-Arginine (Nor-NOHA) 50 mg</p> <p>Cloruro de Vanadio 25g X 2:</p>			
<b>07</b>	<b>Otros (especificar)</b>	0	-----	\$ 0.00

08	Honorarios de investigadores	0	-----	\$ 0.00
			<b>COSTO DIRECTO</b>	\$ 118, 700 pesos
09	Instituto Nacional de Perinatología (20% del costo directo) para proyectos con financiamiento externo			
			<b>COSTO TOTAL</b>	\$ 118, 700 pesos

## CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Participación de la arginasa y del estrés oxidativo en pacientes con endometriosis e infertilidad.

FECHA DE INICIO: 01 de marzo de 2011

FECHA DE TERMINACIÓN: 31 de julio de 2012

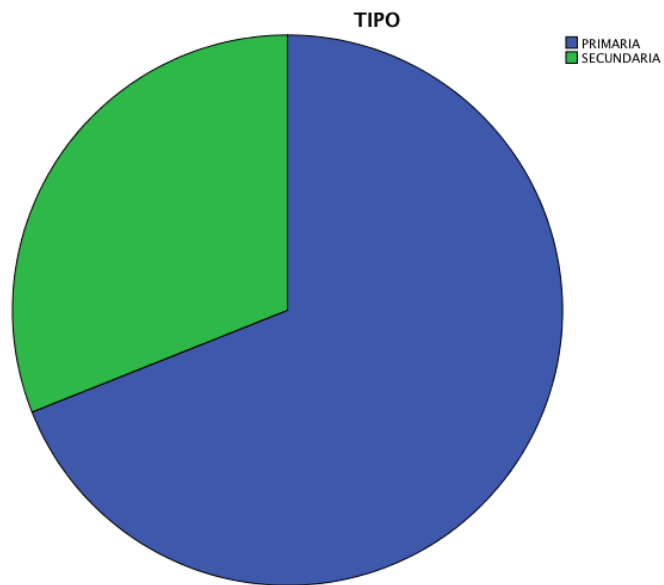
Nº	ACTIVIDAD	MES CALENDARIO PROGRAMADO																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
	DISEÑO Y DESARROLLO TÉCNICO	X	X																
	VALIDACIÓN DE INSTRUMENTOS		X	X	X														
	RECOLECCIÓN DE DATOS			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X					
	CODIFICACIÓN			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X						
	PROCESAMIENTO DE DATOS							X	X	X	X	X	X						
	ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN									X	X	X	X	X	X				
	REDACCIÓN DEL INFORME FINAL														X	X	X	X	
	ELABORACIÓN DE ARTÍCULO																		X



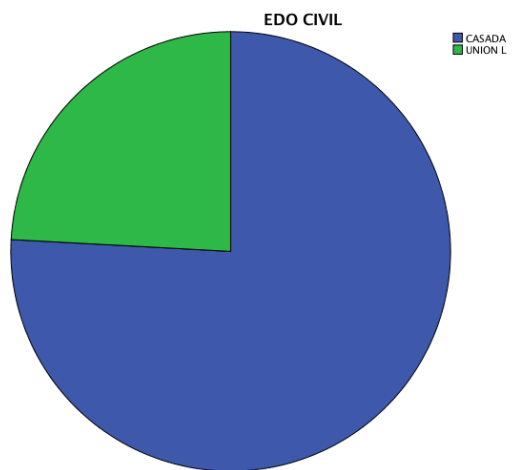
**TABLA 1**

Características sociodemográficas	Sin endometriosis	Endometriosis
Edad en años	32 ± 4.9	31 ± 5.8
Peso en kilogramos	62.8 ± 6.5	64.0 ± 8.0
Índice de masa corporal (talla m <sup>2</sup> /peso)	25.5 ± 2.9	26.4 ± 3.1
Talla en centímetros	157 ± 2.9	156 ± 3.7
Menarca en años	12 ± 3.6	12 ± 1.4
Duración de infertilidad en años	3.9 ± 2.4	4.0 ± 2.7

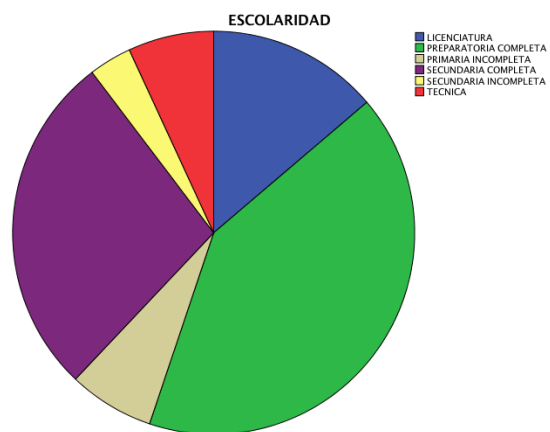
**GRAFICO 1. Tipo de Infertilidad.**



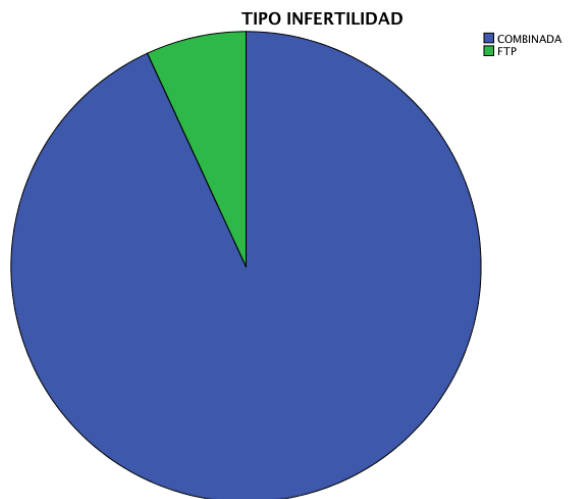
**GRAFICO 2. Estado civil.**



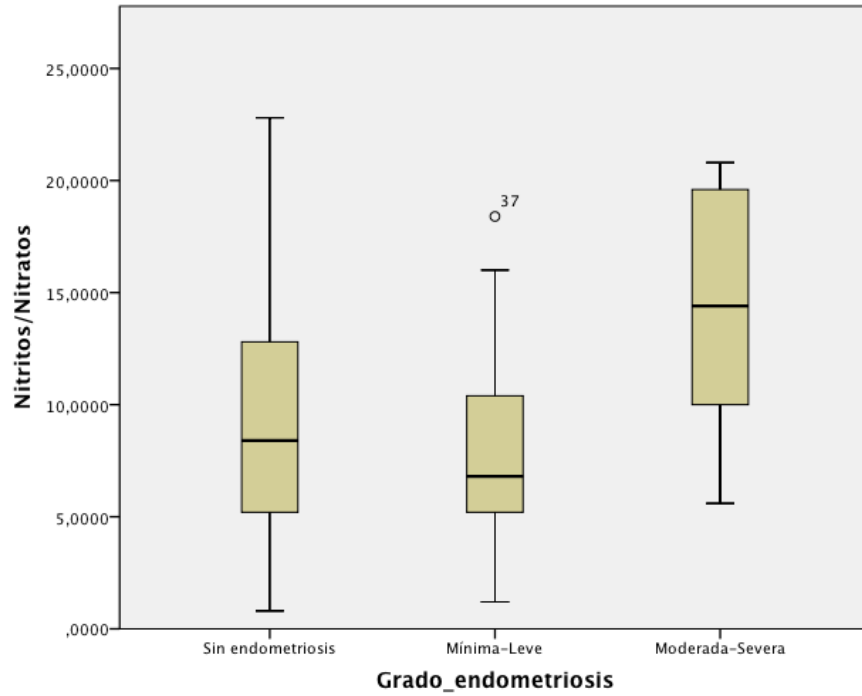
**GRAFICO 3. Escolaridad.**



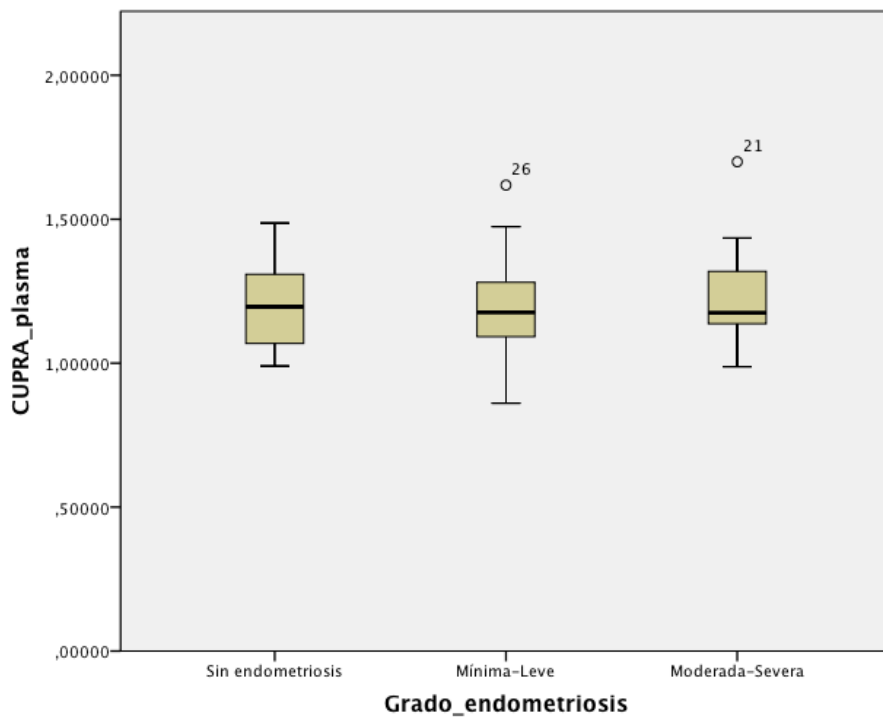
**GRÁFICA 4. Causa**



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



**GRÁFICA 6. Concentraciones de capacidad total antioxidante en plasma según presencia o ausencia de endometriosis reportada en equivalentes Trolox.**



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

