

Trabajos Originales

Relación entre la edad de la paciente y el estrés oxidativo del fluido folicular de pacientes con síndrome de ovario poliquístico, endometriosis y con baja respuesta ovárica

Relationship between age and oxidative stress in follicular fluid from patients with polycystic ovary syndrome, endometriosis and low responder patients

Daniela Colaci¹, Mónica Faut², Laura Kopcow¹, Fabio Sobral¹, Mariana Gómez Peña¹, Ignacio de Zúñiga¹, Alicia Motta²

¹ *Pregna Medicina Reproductiva, Beruti 2853 (1425) Buenos Aires, Argentina.*

² *Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO) UBA-CONICET, Facultad de Medicina, Paraguay 2155, Piso 17 (1121) Buenos Aires, Argentina.*

Resumen

En el presente trabajo, se estudió la relación entre la edad y el estrés oxidativo en fluidos foliculares provenientes de pacientes con infertilidad por síndrome de ovario poliquístico (SOP), endometriosis (EDT) y con baja respuesta ovárica (BR), N=15/grupo. El grupo de mujeres controles (N=15) estaba compuesto por pacientes que presentaban infertilidad por factor masculino o por diagnóstico de factor tubo-peritoneal. Encontramos que en mujeres controles mayores de 33 años, se producía un incremento del estrés oxidativo en los fluidos foliculares comparado con mujeres del mismo grupo pero menores de 33 años de edad. Tanto los fluidos foliculares de las pacientes del grupo SOP como de las de los grupos EDT y BR presentaban un incremento del estrés oxidativo con respecto a los controles. Cabe señalar que cuando estas pacientes pertenecían al grupo de más de 33 años de edad, el incremento del estrés oxidativo era más marcado que en las menores de 33 años. El estrés oxidativo se manifestó con una disminución en los niveles de defensas antioxidantes, pero cuando ese estrés oxidativo de los fluidos foliculares se hacía más importante, se producía un aumento de las defensas antioxidantes. De los tres grupos de pacientes estudiadas, SOP, EDT y BR, el último grupo, BR, fue el que presentó un estrés oxidativo más importante, aun en mujeres menores de 33 años de edad. Dado que aun en condiciones de estrés oxidativo importante, la oxidación lipídica no se modificó, podemos sugerir que los mayores daños estarían produciéndose en proteínas y ADN.

Palabras clave: síndrome de ovario poliquístico, endometriosis, pacientes con baja respuesta ovárica, estrés oxidativo, defensas antioxidantes, infertilidad.

Abstract

The present investigation studied the relationship between age and oxidative stress from infertile patients with polycystic ovary syndrome (SOP), endometriosis (EDT) and low responder patients (BR), N =15/group. The control group was formed by infertile couple by male causes or tube-peritoneal reasons. We found increased oxidative stress in follicular fluid from women who were more than 33 years old compared with those who were less than 33. In addition, the oxidative stress of the follicular fluids from patients with SOP, EDT and BR were higher than those from controls. The oxidative stress was characterized by the decrease of antioxidant defenses; however, when oxidative stress was increased, the antioxidant defenses were increased. Comparing the three pathologies, the group BR showed the most important oxidative stress, even when the patients were younger than 33 years old. In view that even in the presence of an important oxidant environment, the lipid peroxidation did not change, we suggest that the damage caused by the increased oxidative stress might be in proteins or DNA.

Key words: *polycystic ovary syndrome, endometriosis, low-responder patients, oxidative stress, antioxidant defenses, infertility.*

Introducción

La capacidad reproductiva de las mujeres decae luego de los 30 años de edad¹. Esto se atribuye a la disminución de la cantidad pero también de la calidad de la reserva de ovocitos². La mayoría de los folículos primordiales se forman durante la vida fetal, sin embargo, recientemente se han encontrado células germinales o *stem-cells* en ovario de mamíferos posnacimiento³. Luego del estímulo, los ovocitos primarios que permanecían detenidos comienzan su desarrollo hasta formar un folículo apto para ser ovulado. Este evento periódico se

repite aproximadamente hasta los 50 años de edad de la mujer y, como es de suponer, los ovocitos de mujeres de más edad se encuentran expuestos a un ambiente que se corresponde con un ovario “envejecido”⁴ y, por lo tanto, a factores que comprometen la microcirculación que rodea al ovocito en desarrollo⁵.

El metabolismo oxidativo es esencial para el funcionamiento de las gametas y el embrión porque a partir de él se produce energía e, inevitablemente, especies reactivas del oxígeno (ROS). A bajas concentraciones, las ROS actúan como mensajeros secundarios y modulan la expresión génica de procesos fisiológicos de las gametas y los embriones⁶, pero a altas concentraciones, la acumulación de ROS produce lo que se conoce como “estrés oxidativo”. Bajo estas condiciones de daño oxidativo, se generan daños a moléculas y estructuras que conducen a efectos deletéreos de la función celular. Se sabe que el daño peroxidativo está asociado al proceso de envejecimiento. De hecho, lo que se conoce como “*Teoría de las radicales libres del envejecimiento*” postula que el estrés oxidativo es la causa principal del envejecimiento celular y el daño a moléculas⁷. Es por ello que el estrés oxidativo es responsable, en parte, de la reducida capacidad reproductiva asociada al envejecimiento. Se ha demostrado que en ratones administrados con antioxidantes se revertía la disminución de la calidad ovocitaria como consecuencia de la edad avanzada⁸, y por el contrario, la exposición de ovocitos o embriones a agentes oxidantes genera las mismas condiciones adversas que las que se observan en ovocitos y embriones de ratones de edad avanzada⁹.

En el ovario, la fisiología de las ROS se encuentra finamente regulada por las defensas antioxidantes que involucran complejos enzimáticos y vitaminas¹⁰. La enzima superóxido dismutasa (SOD) remueve la producción de radical superóxido con la producción de peróxido de hidrógeno, luego el peróxido de hidrógeno se metaboliza por la enzima catalasa (CAT) o glutatión peroxidasa con la conversión de metabolito glutatión reducido (GSH) a oxidado (GSSG). La cadena de reacciones antioxidantes se completa luego que el GSSG se vuelve a reducir a GSH en presencia de NADPH (nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato). Por otra parte, la célula posee mecanismos de defensas antioxidantes que están dados por metabolitos, como el glutatión (GSH), enzimas (como la CAT y la SOD) o por vitaminas, como la vitamina C¹⁰.

Se ha demostrado que el estrés oxidativo está involucrado en patologías reproductivas femeninas como abortos recurrentes, preeclampsia, diabetes, embriopatías fetales, endometriosis, ovario poliquístico, entre otras, y también masculinas¹¹. Sin embargo, aún no está claro el papel de las ROS en las diferentes etiologías de infertilidad y cómo influye la edad de la paciente¹¹.

El síndrome de ovario poliquístico (SOP) es una patología heterogénea caracterizada por anovulación, hiperandrogenismo y una morfología ovárica característica que a la ecografía se observa como microfoliculos dispuestos en forma de corona. Si bien no se ha determinado aún la fisiopatología de esta entidad, se cree que el hiperandrogenismo del ovario conduciría a una resistencia de los múltiples folículos antrales al efecto de las gonadotropinas. Algunos estudios¹² han demostrado diferentes grados de actividad folicular oxidativa en pacientes con diagnóstico de SOP. Creemos que el desbalance oxido-reductivo intrafolicular podría conducir a daño celular y alterar la función folicular con el consiguiente efecto deletéreo sobre la calidad ovocitaria.

La EDT es una patología ginecológica frecuente, manifestada por una variedad de cuadros clínicos que abarcan desde pacientes asintomáticas a pacientes con dolor pelviano crónico e infertilidad. Debido a que la inflamación crónica juega un rol importante en la fisiopatología de la enfermedad, las ROS han sido implicadas en su fisiopatología^{13,14}.

Las pacientes con BR continúan siendo un enorme desafío en el campo de la reproducción asistida. Es escasa la bibliografía pertinente a marcadores que aumenten el conocimiento de la dinámica folicular en estas pacientes¹⁵.

Por todo lo expuesto, el presente trabajo tuvo como objetivo general establecer si la edad de las pacientes con diferentes patologías reproductivas es una condición adversa en la regulación del estrés oxidativo de fluidos foliculares.

Los objetivos específicos fueron:

Determinar en controles y en pacientes con SOP, EDT y BR el balance oxidante-antioxidante en fluidos foliculares. Establecer si la edad modifica estos parámetros.

Para cuantificar el estrés oxidativo, estudiar en los fluidos foliculares de los cuatro grupos la peroxidación lipídica (LPO) y, como mecanismos antioxidantes, la actividad de la SOD y los niveles de GSH total.

Materiales y métodos

Pacientes y tratamientos

Entre el 1° de febrero de 2009 y el 1° de noviembre del mismo año, se analizaron 60 ciclos (igual número de pacientes) del Programa de Fertilización Asistida del Instituto de Fertilidad *Pregna*. Las pacientes firmaron en todos los casos el consentimiento informado institucional. El trabajo fue aceptado por nuestro Comité de Docencia e Investigación. La totalidad de las pacientes fueron estudiadas según las Normas de diagnóstico y tratamiento de nuestro Manual de Procedimientos. Se

analizaron 4 grupos de 15 muestras cada uno. En todos los casos, se compararon los resultados de la patología de interés *versus* los controles. Definición de las etiologías de infertilidad: 1) SOP: definido según criterios de Rotterdam (*Rotterdam Consensus Workshop Group*, 2003¹²); 2) EDT: definida según criterio laparoscópico presente o pasado; 3) BR: definida como pacientes menores de 40 años y con menos de 5 ovocitos captados en la punción, sin otro diagnóstico aparente de infertilidad; 4) Controles: pacientes con infertilidad por factor masculino o diagnóstico de factor tubo-peritoneal diferente a EDT. La totalidad de las pacientes fueron estimuladas con FSH recombinante (Puregon®, Merck Organon o Gonal-F®, Merck-Serono) a dosis establecidas según criterio médico, con el agregado de LH urinaria (Menopur®, Ferring), según criterio. Todas las pacientes fueron inhibidas con esquemas fijos de antagonistas de la GnRH (Cetrotide® 0,25 mg Merck-Serono u Orgalutran® 0,25 mg Merck Organon) a dosis diaria, comenzando entre los días 6 o 7 del ciclo de estimulación (día 5-6 de medicación). Cuando las pacientes presentaron 3 o más folículos mayores de 18 mm, se les indicó 10.000 UI de gonadotrofina coriónica humana (hCG) (Pregnyl®, Merck Organon o Gonacor®, Ferring) o gonadotrofina coriónica recombinante en dosis de 250 mcg (Ovidrel®, Merck-Serono). Todas las punciones se realizaron entre 34 y 36 horas posteriores a la aplicación de la hCG. Todas las pacientes recibieron anestesia local con lidocaína al 1% en fondo de saco lateral vaginal, más el agregado de sedación anestésica con propofol por vía intravenosa a dosis ajustada por kg de peso. Para la punción transvaginal se utilizó un equipo Mindray Digiprince (DP3300) con sonda de 6,5 MHz transvaginal. Todas las punciones se realizaron con agujas simple vía (Monalisa® o Cook® 16 gauge). Para la recolección del líquido folicular, primeramente se realizó el lavado y purgado de la vía y la aguja. El volumen residual se descartó para la punción del primer folículo accesible (diámetro mayor de 18 mm). Los fluidos foliculares con sangrado importante fueron descartados y se procedió a punzar el primer folículo del ovario contralateral. Una vez aspirado, el líquido folicular fue entregado al laboratorio para la identificación del ovocito y su aislamiento.

Muestras de fluido folicular

Las muestras fueron congeladas inmediatamente después de finalizada la punción. Una vez obtenidas todas las muestras, se procedió a su descongelamiento y fueron centrifugadas a 3000 g durante 10 minutos a 4 °C. Se separaron las células de la granulosa del fluido folicular, el cual se almacenó a -80 °C en tubos de polipropileno estériles hasta su uso.

Determinación del índice de LPO

El estrés oxidativo es la acumulación de ROS de manera excesiva cuando los mecanismos antioxidantes fallan o se ven sobrepasados durante condiciones patológicas agudas o crónicas. Se puede manifestar como oxidación de lípidos (tal como es el caso de la LPO) que provoca daño y, por consiguiente, la alteración de la membrana celular. Esta alteración produce anomalías funcionales caracterizadas por la pérdida de la funcionalidad de receptores de membrana y, por lo tanto, una respuesta celular disminuida. Pero además, el estrés a través del aumento de las ROS puede inducir oxidación descontrolada de proteínas y daño al ADN celular. El daño a proteínas y a ADN no es evaluado por la técnica de LPO.

En resumen, el fundamento de esta técnica es: cuando el estado oxidativo de las células está incrementado se producen reacciones que involucran radicales libres sobre los ácidos grasos de las membranas. Estas reacciones tienen, entre sus subproductos, el malondialdehído (MDA)¹⁶.

La técnica de cuantificación de la LPO se basa en que el MDA (como dijimos, principal subproducto de la LPO) es capaz de reaccionar con ácido tiobarbitúrico (TBA) cuya reacción produce un reactivo de color que puede cuantificarse a 535 nm en espectrofotómetro. Los resultados se expresan en nmol/mg proteínas.

Determinación de la actividad de la enzima antioxidante SOD

El método utilizado para determinar la actividad de la SOD¹⁷ se basa en la habilidad que tiene esta enzima para inhibir la autooxidación de la epinefrina a pH=10,2 y a una temperatura de 30 °C. La oxidación de la epinefrina es seguida por la formación del adrenocromo, que tiene un máximo de absorbencia a 480 nm. Los resultados se expresan en UI/mg proteína.

Determinación de los niveles de metabolito antioxidante GSH

Como hemos mencionado, las células son capaces de contrarrestar el estrés oxidativo mediante mecanismos antioxidantes, entre ellos se encuentra el GSH. El método¹⁷ se basa en la reacción de reducción del ácido 5,5,-ditiobis-2 nitrobenzoico (DTNB), llevada a cabo por el GSH, en medio reductor. Al reducirse, el DTNB forma compuestos coloreados, que es posible cuantificar a 412 nm. Los resultados se expresan en micromol/mg proteína.

Cabe destacar que ante una respuesta al estrés oxidativo, las defensas antioxidantes se ven disminuidas debido a que se consumen en respuesta a la cadena de mecanismos antioxidantes. Sin embargo, cuando la situación de estrés es más severa, estos mecanismos an-

tioxidantes se activan de tal manera que se observa un incremento de las defensas antioxidantes con respecto a situaciones de estrés controlado.

Concentración de proteínas

Las proteínas fueron determinadas en el fluido folicular de los cuatro grupos mediante la técnica de Bradford.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa InStat (GraphPAD software, San Diego, CA, USA) y el test de análisis de la varianza (ANOVA) corregido con Bonferroni de comparaciones múltiples. Se consideraron significativas las diferencias entre medianas de P<0,05.

Resultados

Efecto de la edad sobre el estrés oxidativo en pacientes con infertilidad a causa del SOP, la EDT y la BR

En la Tabla 1 pueden compararse los niveles de estrés oxidativo (LPO, y de las defensas antioxidantes SOD y GSH) de los fluidos foliculares correspondientes a los grupos controles, SOP, EDT y BR y clasificados por edad de las pacientes. Analizando la Tabla, vemos que en el grupo perteneciente a las pacientes controles, a mayor edad (grupo control >33 años), las defensas antioxidantes disminuyen significativamente con respecto a controles ≤33 años. La disminución más marcada es la de la actividad de la SOD, lo que implica un aumento en la acumulación de radical superóxido (sustrato de la SOD). Asimismo, el hecho de que las mujeres >33 años

presenten una disminución en los niveles de GSH generaría la acumulación de peróxido de hidrógeno.

En mujeres con SOP, a mayor edad de las pacientes se observa mayor estrés oxidativo de los fluidos foliculares tal como lo indica el incremento de la LPO, y como respuesta a este estrés oxidativo generado, se produce el aumento en las defensas antioxidantes SOD y GSH.

En pacientes diagnosticadas con EDT, si bien no existe diferencia significativa en la LPO con respecto a la edad, las defensas antioxidantes se encuentran alteradas, con una disminución de la actividad de SOD y un aumento del GSH en pacientes >33 años con respecto a las mujeres ≤33 años de edad.

No se encontraron diferencias significativas en la LPO entre pacientes BR ≤33 o >33 años. Tampoco se vieron diferencias significativas en los niveles de antioxidantes SOD y GSH entre los grupos ≤33 y >33 años de edad, en los fluidos foliculares de estas pacientes.

El estrés oxidativo en pacientes con infertilidad a causa del SOP, la EDT y la BR

La Figura 1 muestra la LPO en mujeres con SOP, EDT y BR en el fluido folicular de pacientes ≤33 años. Las pacientes con SOP presentan una disminución significativa de LPO (Fig. 1a vs. b) con respecto a los controles. Esto puede deberse al establecimiento de un importante estado proinflamatorio que presentan estas pacientes, que se tradujo en un aumento significativo en la producción de prostaglandinas en el fluido folicular (datos no presentados). Más aún, se ha demostrado que en condiciones de estrés oxidativo acompañado con es-

	Control ≤33	Control >33	SOP ≤33	SOP >33	EDT ≤33	EDT >33	BR ≤33	BR >33
LPO	1,42 ± 0,08	1,44±0,05	1,23±0,024	1,44±0,04 P<0,0001 vs. SOP ≤33	1,57 ± 0,069	1,63 ± 0,07	1,43 ± 0,023	1,33 ± 0,02
SOD	6,22 ± 1,26	0,32±0,11 P<0,0001 vs. control ≤33	0,86±0,07 P<0,0001 vs. control ≤33	5,75±0,06 P<0,0001 vs. control >33 y vs. SOP ≤33	0,76±0,02 P<0,0001 vs. control ≤33	0,64±0,04 P<0,0003 vs. control >33 y vs. EDT ≤33	7,25 ± 0,70	7,36 ± 0,80
GSH	0,00450 ± 0,0009	0,00360 ± 0,00026 P<0,001 vs. control ≤33	0,0033 ± 0,0001 vs. control ≤33	0,0166 ± 0,0001 P<0,0001 vs. control >33 y vs. SOP ≤33	0,0060 ± 0,0002 P<0,0001 vs. control ≤33	0,0070±0,0002 P<0,0001 vs. control >33 y EDT ≤33	0,008 ± 0,0009	0,0070 ± 0,0009

Tabla 1. Comparación del estrés oxidativo y mecanismos antioxidantes en fluido folicular de mujeres con distintas patologías reproductivas: SOP, EDT y BR. Controles: pacientes con infertilidad por factor masculino o diagnóstico de factor tubo-peritoneal diferente a endometriosis. Los estímulos se detallan en la sección Materiales y métodos. LPO: índice de peroxidación lipídica (nmol/mg proteína); GSH: niveles de antioxidante glutatión (micromol/mg proteína); SOD: niveles de antioxidante superóxido dismutasa (UI/mg proteína); N=15 pacientes por grupo; se utilizó ANOVA test.

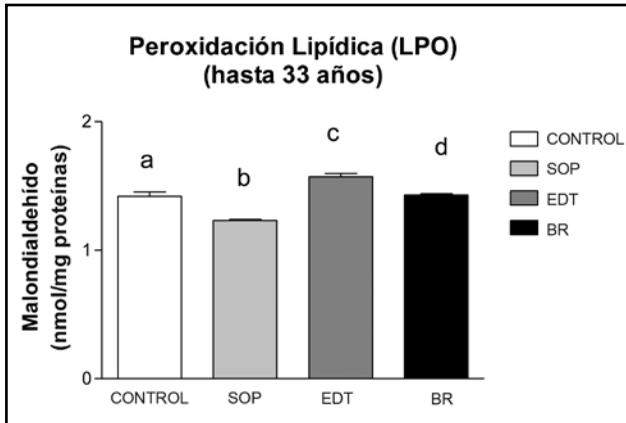


Figura 1. Determinación del índice de LPO en fluido folicular de pacientes menores de 33 años de edad con distintas patologías reproductivas: SOP, EDT y BR. Controles: pacientes con infertilidad por factor masculino o diagnóstico de factor tubo-peritoneal diferente a endometriosis. Los estímulos se detallan en la sección Materiales y métodos. Cada columna representa la mediana + desviación estándar de N=15 pacientes por grupo, se utilizó ANOVA test para análisis de diferencias significativas, a vs. b ($P<0,001$); a vs. c ($P<0,001$).

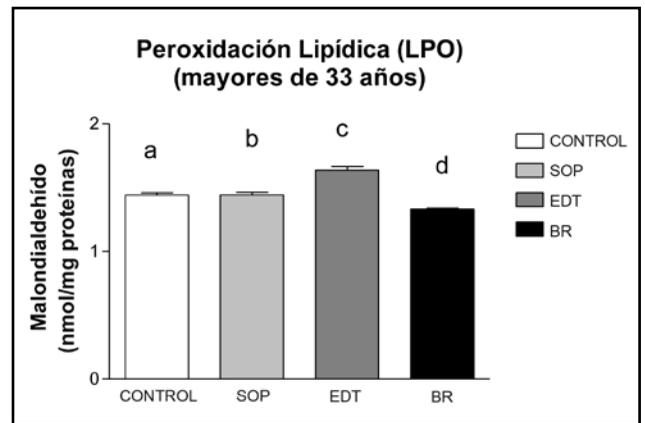


Figura 2. Determinación del índice de LPO en fluido folicular de pacientes mayores de 33 años de edad con distintas patologías reproductivas: SOP, EDT y BR. Controles: pacientes con infertilidad por factor masculino o diagnóstico de factor tubo-peritoneal diferente a endometriosis. Los estímulos se detallan en la sección Materiales y métodos. Cada columna representa la mediana + desviación estándar de N=15 pacientes por grupo, se utilizó ANOVA test para análisis de diferencias significativas, a vs. c ($P<0,001$); a vs. d ($P<0,001$).

tado proinflamatorio, se produce una disminución de la LPO en un efecto de retroalimentación negativa debido a la alta producción de prostaglandinas. En fluido folicular de pacientes con EDT se encontró un aumento (Fig. 1a vs. c) de LPO con respecto a los controles. Cuando las pacientes eran >33 años (Fig. 2), en el grupo con SOP se vio que el índice LPO es igual que en los controles, mientras que en mujeres con EDT se incrementa la LPO (Fig. 2a vs. c) con respecto a los controles. La LPO se vio disminuida en pacientes con BR (Fig. 2a vs. d) con respecto a los controles. Sugerimos que en el grupo de pacientes EDT la LPO se debería a la presencia de alto estrés oxidativo en el fluido folicular mientras que en el caso de las pacientes BR, además de estrés oxidativo, se encontraría un importante estado proinflamatorio que produciría una disminución de la LPO.

La Figura 3 muestra los niveles del antioxidante SOD, que en el grupo de pacientes con SOP y EDT ≤ 33 años de edad se encuentra disminuido (Fig. 3a vs. b y a vs. c, respectivamente) con respecto a los controles. En el caso de las pacientes BR ≤ 33 años, se ve que la actividad SOD está incrementada debido a la activación del camino de la SOD en estas pacientes (no se ve incremento de la LPO). En el caso de las pacientes >33 años, se ve activación de las defensas antioxidantes que se traduce en un incremento de SOD con respecto a los controles, en pacientes con SOP y BR (Fig. 4a vs. b y a vs. d, respectivamente).

Con respecto al GSH, se encontró que en pacientes con SOP ≤ 33 años de edad se producía una disminución (Fig. 5a vs. b) con respecto a los controles,

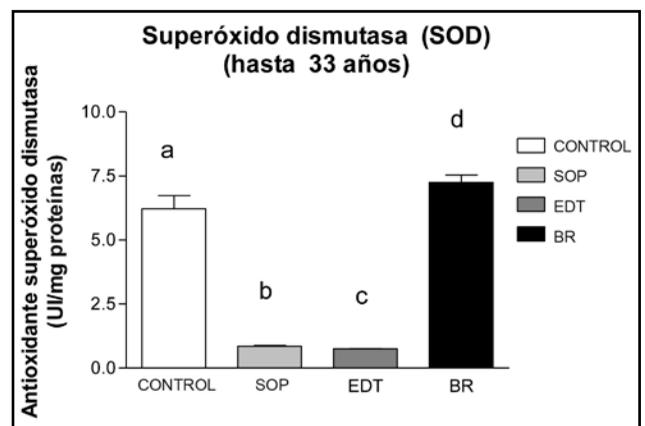


Figura 3. Determinación de la actividad de la enzima SOD en fluido folicular de pacientes menores de 33 años de edad con distintas patologías reproductivas: SOP, EDT y BR. Controles: pacientes con infertilidad por factor masculino o diagnóstico de factor tubo-peritoneal diferente a endometriosis. Los estímulos se detallan en la sección Materiales y métodos. Cada columna representa la mediana + desviación estándar de N=15 pacientes por grupo, se utilizó ANOVA test para análisis de diferencias significativas, a vs. b ($P<0,0001$); a vs. c ($P<0,0001$); a vs. d ($P<0,05$).

mientras que en pacientes EDT y BR se encontró un incremento (Fig. 5a vs. c y a vs. d, respectivamente) con respecto a los controles. Cuando las pacientes eran >33 años, el GSH se incrementó (Fig. 6a vs. b, a vs. c, a vs. d) con respecto a los controles. Estos resultados demuestran una importante activación del sistema antioxidante en este grupo de pacientes.

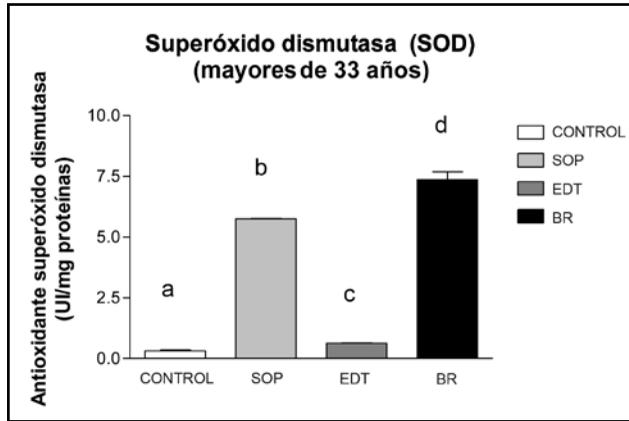


Figura 4. Determinación de la actividad de la enzima SOD en fluido folicular de pacientes mayores de 33 años de edad con distintas patologías reproductivas SOP, EDT y BR. Controles: pacientes con infertilidad por factor masculino o diagnóstico de factor tubo-peritoneal diferente a endometriosis. Los estímulos se detallan en la sección Materiales y métodos. Cada columna representa la mediana + desviación estándar de N=15 pacientes por grupo, se utilizó ANOVA test para análisis de diferencias significativas, a vs. b ($P<0,0001$); a vs. d ($P<0,0001$).

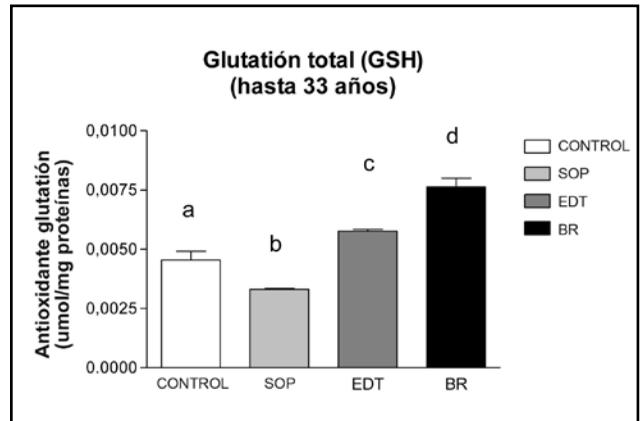


Figura 5. Determinación de los niveles de GSH total en fluido folicular de pacientes menores de 33 años de edad con distintas patologías reproductivas: SOP, EDT y BR. Controles: pacientes con infertilidad por factor masculino o diagnóstico de factor tubo-peritoneal diferente a endometriosis. Los estímulos se detallan en la sección Materiales y métodos. Cada columna representa la mediana + desviación estándar de N=15 pacientes por grupo, se utilizó ANOVA test para análisis de diferencias significativas, a vs. b ($P<0,001$); a vs. c ($P<0,001$); a vs. d ($P<0,001$).

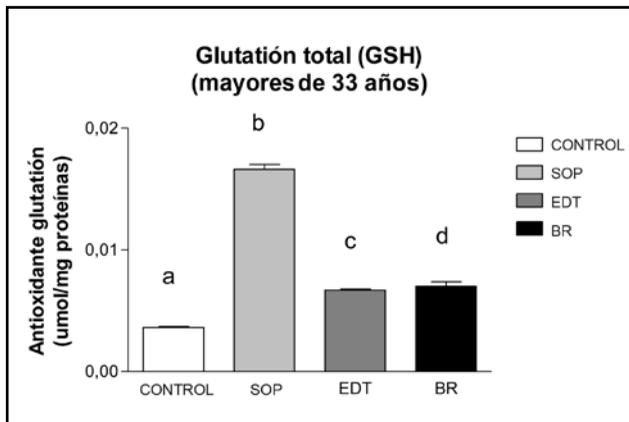


Figura 6. Determinación de los niveles de GSH total en fluido folicular de pacientes mayores de 33 años de edad con distintas patologías reproductivas: SOP, EDT y BR. Controles: pacientes con infertilidad por factor masculino o diagnóstico de factor tubo-peritoneal diferente a endometriosis. Los estímulos se detallan en la sección Materiales y métodos. Cada columna representa la mediana + desviación estándar de N=15 pacientes por grupo, se utilizó ANOVA test para análisis de diferencias significativas, a vs. b ($P<0,0001$); a vs. c ($P<0,001$); a vs. d ($P<0,001$).

Discusión y conclusiones

El estrés oxidativo está relacionado con un número importante de patologías tales como enfermedades cardiovasculares, diabetes, cáncer, patologías neurodegenerativas y envejecimiento, entre otras. Particularmente, se ha demostrado una correlación entre el estrés y la infertilidad tanto del tipo femenino como masculino¹⁻¹⁸. La funcionalidad ovárica declina con la edad y, como consecuencia, disminuye la capacidad del ovocito

para ser fecundado¹⁹. Se ha demostrado que el estudio del fluido folicular representa una herramienta excelente para la evaluación del ovocito²⁰.

En el presente trabajo hemos comparado el estrés oxidativo en el fluido folicular de pacientes con tres patologías de infertilidad: SOP, EDT y BR. Dos de ellas (SOP, EDT) son responsables de causar infertilidad en un porcentaje importante de mujeres en edad reproductiva, mientras que las pacientes con BR representan un desafío importante en el campo de la fertilización asistida. Aspiramos a encontrar marcadores de diagnóstico que nos permitan prever el éxito o fracaso de los tratamientos. Para ello, hemos realizado un análisis teniendo en cuenta si la edad de la paciente es un factor negativo en cada una de estas patologías con respecto a la inducción de estrés.

En coincidencia con trabajos previos¹⁻⁹, nuestros resultados muestran que el estrés oxidativo que se produce en el microambiente ovocitario se incrementa con la edad. Esto lo vimos no solo en pacientes diagnosticadas con SOP y EDT, sino también en el grupo de controles (bajo programas de reproducción asistida por infertilidad masculina y/o diagnóstico de factor tubo-peritoneal). En el grupo de pacientes BR, el estrés oxidativo no se modifica con la edad, es posible que otros parámetros, y no la inducción de estrés oxidativo, puedan ser más determinantes en la calidad ovocitaria. Otra posibilidad es que el estrés oxidativo que se alcanza ya en el grupo de mujeres ≤ 33 años sea tan alto que no se vea modificación con la edad, como si hubiera llegado a un tope. De hecho tampoco se modifican las defensas antioxidantes con la edad.

Demostremos por primera vez que el estrés oxidativo presente en el fluido folicular de todas las pacientes (grupos SOP, EDT y BR) se genera en forma preponderante como daño a proteínas y/o al ADN, puesto que, aun en el caso de estrés importante (el cual se reflejó en alteraciones de los mecanismos antioxidantes), no se vio modificación en el índice LPO (el cual evalúa daño a lípidos). Esto es importante a la hora de seleccionar parámetros determinativos de la calidad ovocitaria, estimamos que las defensas antioxidantes SOD y GSH reflejan de una manera más acertada el estrés del microambiente ovocitario.

Cabe aclarar que demostramos también por primera vez que en aquellas condiciones donde el estrés oxidativo está muy incrementado (como es el caso del grupo de pacientes SOP ≤ 33 años y BR > 33 años), el índice LPO se vio disminuido. Esta aparente paradoja necesita un análisis más profundo. Esto es, en esas condiciones patológicas, hemos establecido que además del estado prooxidativo, se genera un importante estado proinflamatorio reflejado en un aumento importante en la síntesis de prostaglandinas (datos no mostrados). De hecho, se ha demostrado que durante la regresión luteal inducida por estradiol en cuerpos lúteos humanos, se genera estrés oxidativo pero en lugar de aumento, se produjo disminución de la LPO²¹. Los autores sugieren que esto es consecuencia de la exacerbación del metabolismo de las prostaglandinas²¹.

Del análisis de nuestros resultados se desprende que, en condiciones de estrés oxidativo "controlado", las defensas antioxidantes se consumen y, por lo tanto, disminuyen (SOD en SOP y EDT en pacientes ≤ 33 años, GSH en pacientes SOP ≤ 33 años). Por otra parte, cuando el estrés oxidativo resulta "descontrolado", se produce activación de las defensas antioxidantes y, por lo tanto, un incremento de las defensas (SOD en BR ≤ 33 años, SOD en SOP y BR en pacientes > 33 años, GSH en EDT y BR en el grupo de pacientes ≤ 33 años y en SOP, EDT, BR en pacientes > 33 años).

Finalmente, queremos destacar que de las tres patologías estudiadas, las pacientes del grupo BR fueron las que presentaron una condición de estrés oxidativo más severo.

Concluimos que la edad es importante para tener en cuenta, según sea la patología SOP y EDT, no así en el caso de las BR. Que la determinación de las defensas antioxidantes, más que la peroxidación lipídica, podría ser un excelente método para evaluar el estado o la posible respuesta ovocitaria.

Referencias

1. te Velde ER, Pearson PL. The variability of female reproductive ageing. *Hum Reprod Update* 2002; 8:141-154.
2. Ottolenghi C, Uda M, Hamatani T, Crisponi L, Garcia JL, Ko M, Pilia G, Sforza C, Schlessinger D, Forabosco

- A. Aging of oocyte, ovary and human reproduction. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1034:17-131.
3. Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 2004; 428:145-150.
4. Tarin JJ, Perez-Albala S, Cano A. Consequences on offspring of abnormal function in ageing gametes. *Hum Reprod Update* 2000; 6:532-549.
5. Friedman CI, Danforth DR, Herbosa-Encarnacion C, Arbogast L, Alak BM, Seifer DB. Follicular fluid vascular endothelial growth factor concentrations are elevated in women of advanced reproductive age undergoing ovulation induction. *Fertil Steril* 1997; 68:607-612.
6. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82:47-95.
7. Harman D. Free radical theory of aging. *Free Radical Diseases*. Age 1984; 57:111-131.
8. Tarin JJ, Perez-Albala S, Cano A. Oral antioxidants counteract the negative effects of female aging on oocyte quantity and quality in the mouse. *Mol Reprod Dev* 2002; 61:385-397.
9. Liu L, Trimarchi JR, Keefe DL. Involvement of mitochondria in oxidative stress-induced cell death in mouse zygotes. *Biol Reprod* 2000; 62:1745-1753.
10. Tatone C, Carbone MC, Falone S, Aimola P, Giardinelli AG, Caserta D, Marci R, Pandolfi A, Ragnelli AM, Amicrelli F. Age-dependent changes in the expression of superoxide dismutases and catalase are associated with ultrastructural modifications in human granulosa cells. *Mol Hum Reprod* 2006; 12:655-660.
11. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol and Endocrinology* 2005; 3:28-48.
12. Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2004; 81(1):19-25.
13. Gupta S, Agarwal A, Krajcir N. Role of oxidative stress in endometriosis. *RBM online* 2006; 13:126-134.
14. Wong Y, Sharma RK, Falcone T. Importance of reactive oxygen species in the peritoneal fluid of women with endometriosis or idiopathic infertility. *Fertil Steril* 1997; 68:826-830.
15. Eichenlaub-Ritter U, Vogt E, Yin H. Spinallles, mitochondria and redox potential in ageing oocytes. *RBM online* 2003; 8:45-58.
16. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978; 52:302-310.
17. Sander V, Piehl L, Facorro GB, Rubín de Celis E, Motta AB. Regulation of functional and regressing stages of corpus luteum development in mice. Role of reactive oxygen species. *Reproduction Fertility and Development* 2008; 20:760-769.

18. Aurrekoetxea I, Ruiz-Sanz JI, Ruiz del Agua A, Navarro R, Hernández ML, Matorras R, Prieto B, Ruiz-Larrea MB. Serum oxidizability and antioxidant status in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2010; 94:1279-86.

19. Tatone C, Amicarelli F, Carbone C, Monteleone P, Caserta D, Marci R, Artini PG, Piomboni P, Focarelli R. Cellular and molecular aspects of ovarian follicle ageing. *Hum Reprod Update* 2008; 14:131-142.

20. Carbone M, Tatone C, Delle Monache S, Marci R, Caserta D, Colonna R, Amicarelli F. Antioxidant enzymatic defenses in human follicular fluid: characterization and age-dependent changes. *Mol Hum Reprod* 2003; 11:639-643.

21. Vega M, Castillo T, Retamales I, Las Heras J, Devoto L, Videla LA. Steroidogenic capacity and oxidative stress-related parameters in human cell regression. *Free Rad Biol Med* 1994; 17:493-499.

Trabajo original

Uso de anticonceptivos orales (ACO) como pretratamiento en protocolos de estímulo con antagonistas GnRH: estudio prospectivo aleatorizado

Oral contraceptive pretreatment (OCP) achieves better pregnancy rates in IVF (in vitro fertilization) antagonists GnRH flexible protocols: a prospective randomized study

Dres. Luciana Porrati, Martín Vilela, María Inés Viglierchio, Alberto Valcarcel, Eduardo Lombardi †, Guillermo Marconi

Instituto de Ginecología y Fertilidad (IFER), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

E-mail: ifer@ifere.com.ar; lucianaporatti@botmail.com

Resumen

Objetivo: comparar resultados de FIV (fertilización in vitro) con pretratamiento con ACO y sin él.

Diseño: estudio prospectivo, aleatorizado.

Metodología: 150 pacientes con indicación de FIV.

Inclusión: Mujeres <39 años, 1º FIV, FSH <12 mUI/ml.

Exclusión: SOP (síndrome de ovario poliquístico), cirugía ovárica o TESE (biopsia testicular).

Grupo A (N=75): pretratamiento con 0,02 mg de etinilestradiol y 0,1 mg de levonorgestrel durante 21 días en ciclo previo. Estimulación: FSH recombinante 200 UI/día desde el día 2-3 del ciclo.

Grupo B (N=75): igual esquema, sin pretratamiento.

Ambos grupos: antagonistas de GnRH (cetrotrelax 0,25 mg subcutáneo, protocolo flexible), comenzando con folículo de 14 mm, continuando diariamente hasta día de hCG (250 µg).

Análisis estadístico: test de χ^2 , t-test.

Resultados: se asignaron 75 pacientes a cada grupo. Se cancelaron 7 ciclos (4 grupo A y 3 grupo B). No se observó diferencia significativa en dosis de gonadotropinas, Nº de días de estímulo, ovocitos captados, tasa de fertilización, Nº de embriones, tasa de embriones de buena calidad, ni tasa de implantación.

La tasa de embarazo fue significativamente mayor en el grupo A.

Conclusión: el tratamiento previo con ACO en ciclos de estimulación con antagonistas de GnRH no afecta el número ni la calidad de los ovocitos. En nuestra experiencia, aumentó significativamente la tasa de embarazo.

Permite, además, programar el ciclo sin interferir con la respuesta ovárica. Constituye una herramienta valiosa en este tipo de protocolos de estimulación ovárica.

Palabras clave: antagonistas GnRH, FIV, estimulación ovárica, anticonceptivos en ciclo previo.

Abstract

Objective: To compare IVF performance in antagonist GnRH cycles with and without oral contraceptive pre-treatment.

Design: Prospective, randomized, controlled study.

Material and Methods

150 patients with IVF indication.

Inclusion criteria: Age ≤ 39 , first IVF attempt, FSH ≤ 12 mIU/ml. **Exclusion criteria:** PC (polycystic ovarian syndrome), ovarian surgery and TESE (testicular biopsy).

Group A (N=75): April® (0.02 mg etinilestradiol – 0.1 mg levonorgestrel) for 21 days in the preceding cycle. Follicular development was induced rFSH of 200 IU/day from cycle day 2-3.

Group B (N=75): Same stimulation protocol, non OCP pre-treatment.