

**NIVELES DE OXIDACIÓN PROTEICA Y ACTIVIDAD SUPERÓXIDO
DISMUTASA EN PACIENTES CON INFERTILIDAD A ASOCIADA
ENDOMETRIOSIS**

JOHANA PATRICIA MÁRQUEZ LÁZARO

UNIVERSIDAD DE CARTAGENA
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRIA EN BIOQUIMICA
CARTAGENA DE INDIAS. D. T. H. Y C.

2013

**NIVELES DE OXIDACIÓN PROTEICA Y ACTIVIDAD SUPERÓXIDO
DISMUTASA EN PACIENTES CON INFERTILIDAD ASOCIADA A
ENDOMETRIOSIS**

JOHANA PATRICIA MÁRQUEZ LÁZARO

Química

Tutor: MARICELA DEL CARMEN VIOLA RHENALS. Doctor en Ciencias mención Bioquímica

Cotutor: ALVARO DE JESUS MONTERROSA CASTRO. Especialista en Ginecología y

Obstetricia. Especialista en Biomedicina de la Reproducción

UNIVERSIDAD DE CARTAGENA

FACULTAD DE MEDICINA

MAESTRIA EN BIOQUIMICA

CARTAGENA DE INDIAS. D. T. H. Y C.

2013

Nota de aceptación

Presidente del Jurado

Jurado

Jurado

CARTAGENA DE INDIAS. D. T. H. Y C., Mayo de 2013

Cartagena, Mayo 10 de 2013

Doctora

RITA MAGOLA SIERRA MERLANO

Jefe Departamento de Postgrado y Educación Continua

Facultad de Medicina

Universidad de Cartagena

L.C.

Apreciada Dra. Sierra:

La presente tiene como fin el dar a conocer la nota cuantitativa y cualitativa del proyecto de investigación a cargo de la estudiante de Maestría en Bioquímica JOHANA PATRICIA MARQUEZ LAZARO, bajo mi tutoría.

El trabajo tiene como título: **NIVELES DE OXIDACIÓN PROTEICA Y ACTIVIDAD SUPERÓXIDO DISMUTASA EN PACIENTES CON INFERTILIDAD ASOCIADA A ENDOMETRIOSIS**

NOTA CUALITATIVA: LAUREADA

NOTA CUANTITATIVA: 4.9

Atentamente,

MARICELA DEL CARMEN VIOLA RHENALS

Docente Maestría en Bioquímica

Facultad de Medicina

Cartagena, Mayo 10 de 2013

Señores

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION

Facultad de Medicina

Universidad de Cartagena

L.C.

Apreciados señores:

Por medio de la presente, autorizo que nuestro trabajo de investigación titulado "**NIVELES DE OXIDACIÓN PROTEICA Y ACTIVIDAD SUPERÓXIDO DISMUTASA EN PACIENTES CON INFERTILIDAD ASOCIADA A ENDOMETRIOSIS**", sea digitalizado y colocado en la web en formato PDF para la consulta de toda la comunidad científica.

Atentamente,

JOHANA PATRICIA MARQUEZ LAZARO

Estudiante Maestría en Bioquímica

c.c. 1.100.682.532 de Cartagena

MARICELA DEL CARMEN VIOLA RHENALS

Docente Maestría en Bioquímica

Facultad de Medicina

Cartagena, Mayo 10 de 2013

Señores

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION

Facultad de Medicina

Universidad de Cartagena

L.C.

Apreciados señores:

Por medio de la presente, cedemos los derechos de propiedad intelectual del trabajo de investigación de nuestra autoría, titulado "**NIVELES DE OXIDACIÓN PROTEICA Y ACTIVIDAD SUPERÓXIDO DISMUTASA EN PACIENTES CON INFERTILIDAD ASOCIADA A ENDOMETRIOSIS**", a la Universidad de Cartagena para la consulta y préstamos a la biblioteca únicamente con fines académicos y/o investigativos, descartándose cualquier fin comercial, permitiendo de esta manera su acceso al público.

Hacemos énfasis en que conservamos el derecho como autores, de registrar nuestra investigación como obra inédita y la facultad, de poder publicarlo en cualquier otro medio.

Atentamente,

JOHANA PATRICIA MARQUEZ LAZARO

Estudiante Maestría en Bioquímica

c.c. 1.100.682.532 de Cartagena

MARICELA DEL CARMEN VIOLA RHENALS

Docente Maestría en Bioquímica

Facultad de Medicina

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por permitirme concluir esta etapa y abrirme el inicio de otra, también por darme la fuerza para continuar aun cuando pensaba que no lo podía lograr.

A mi madre Yaneth, por darme la vida, porque gracias a su anegación como madre he podido alcanzar las metas que me he propuesto.

A mi padre Luis, por su apoyo y por darme la vida.

A mis hermanas Rudy y Luisa, por ser cómplices en esta aventura y por creer que soy un modelo a seguir.

A mis tías, Ada, Graciela y Miladis, por apoyarme en el logro de mis metas.

A la Dra. Maricela Viola, por abrirme las puertas de su grupo y acompañarme en este viaje, pero sobre todo por su amistad.

Al Dr. Juan C Drosos, por su amistad y por recordarme que lo que me propongan lo puedo alcanzar.

A mis amigos: Leidy, Martika, Migue, Will y Gueto, por estar conmigo en los momentos que mas los he necesitado y por las locuras compartidas.

A la Sra. Digna, por ser como mi segunda madre, eso resume todo.

A mis compañeros de laboratorio por los ratos de tertulia y trabajo compartidos.

A los docentes del área de Bioquímica, por contribuir a mi formación académica.

CONFLICTO DE INTERES: Ninguno

FINANCIACION: Quinta Convocatoria para la financiación de proyectos de investigación, para grupos de investigación clasificados por el Departamento Administrativo de Ciencia y Tecnología e Innovación – COLCIENCIAS – en las categorías A1, A, B, C, y D avalados por la Universidad de Cartagena.

NIVELES DE OXIDACIÓN PROTEICA Y ACTIVIDAD SUPERÓXIDO DISMUTASA EN PACIENTES CON INFERTILIDAD A ASOCIADA ENDOMETRIOSIS

Johana Patricia Márquez Lázaro (1)

Maricela Viola-Rhenals (2)

Álvaro Monterrosa Castro (3)

(1) Química. Candidata a Magister en Bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad de Cartagena. Colombia

(2) Química Farmacéutica. Doctor en Ciencias Mención Bioquímica. Docente. Facultad de Medicina. Universidad de Cartagena. Colombia

(3) Médico. Especialista en Ginecología y Obstetricia. Especialista en Biomedicina de la Reproducción. Docente. Facultad de Medicina. Universidad de Cartagena. Colombia

RESUMEN

INTRODUCCION: La endometriosis consiste en la aparición y crecimiento de tejido endometrial fuera del útero, sobre todo en la cavidad pélvica, ovarios, ligamentos uterinos, vejiga urinaria, intestino, entre otros y afecta a más del 50% de las mujeres con infertilidad.

OBJETIVO: Evaluar la presencia de estrés oxidativo en muestras de plasma y tejido endometrial de sujetos con infertilidad asociada a endometriosis.

METODOLOGÍA: Estudio descriptivo doble ciego en sujetos con infertilidad del programa Fertilizar de la Ciudad de Cartagena- Colombia, elegidos a conveniencia. Se tomaron muestras de tejido endometrial y plasma de cada una de las pacientes. El nivel de oxidación proteica fue cuantificado usando el método colorimétrico 2,4 DNPH y la actividad enzimática superóxido dismutasa (SOD) en gel nativo de poliacrilamida fueron evaluados.

RESULTADOS: Los resultados muestran que las pacientes nulíparas con endometriosis presentan actividad enzimática para las dos isoformas de SOD, mientras que pacientes nulíparas sin endometriosis solo para la isoforma MnSOD evidenciado en tejido endometrial y no en plasma. Existe significancia estadística en los niveles de oxidación proteica en la muestra de tejido endometrial de ambos grupos, no siendo así en las muestras de plasma, estando estos niveles incrementados en pacientes con endometriosis.

CONCLUSIÓN: Nuestro estudio propone que existe una diferencia en los niveles de estrés oxidativo en las pacientes infértiles con endometriosis que permitirían diferenciarlas de un grupo de mujeres infértiles sin esta patología. Actualmente, la endometriosis es de diagnóstico laparoscópico, por lo que sería conveniente la estandarización de un método menos invasivo como lo es la toma de tejido endometrial que permita su diagnóstico.

Palabras claves: estrés oxidativo, endometriosis, infertilidad, oxidación proteica, actividad superóxido dismutasa.

INTRODUCCION

La endometriosis consiste en la aparición y crecimiento de tejido endometrial fuera del útero, más frecuentemente en la cavidad pélvica, ovarios, ligamentos uterinos, vejiga urinaria, intestino, entre otros. La endometriosis afecta entre el 6 al 10% de las mujeres en edad reproductiva, al 50 a 60% de las mujeres con dolor pélvico y a más del 50% de las mujeres con infertilidad siendo la edad promedio de diagnóstico 28 años [1,2].

La endometriosis es compleja y multifactorial, a pesar de ser una de las de las enfermedades ginecológicas más estudiadas, su etiología aún sigue siendo desconocida. Los síntomas van desde dolor pélvico crónico, menstruación dolorosa, coito doloroso, infertilidad e incluso en algunos casos cáncer [3-5]. En un intento por explicar su patogénesis se han planteado varias teorías, siendo la más aceptada la de la implantación o menstruación retrograda. [4-6].

Recientemente se ha implicado al estrés oxidativo en la patogénesis de ésta enfermedad, éste ocurre cuando hay un desbalance entre las especies reactivas de oxígeno (ROS de sus siglas en inglés *Reactive Oxygen Species*) que pueden ser producidas a una velocidad rápida y la capacidad de respuesta del sistema de defensa antioxidante que los neutraliza [7,8]. Se ha evidenciado que en la endometriosis pélvica los ROS pueden provenir de los eritrocitos, el tejido endometrial apoptótico y los fagocitos mononucleares, resultantes de la menstruación retrograda lo que trae consigo el daño a macromoléculas y la consecuente formación de peróxidos lipídicos, proteínas oxidadas y daños en el ADN [1,7].

Pocos son los estudios que describen el papel del estrés oxidativo en esta condición y los datos publicados aún no son concluyentes. En los últimos años, se ha ido incrementando el número de investigaciones que los relacionan. Estos trabajos generalmente emplean muestras de sangre, fluido folicular, tejido endometrial o líquido peritoneal, evaluando en ellas peroxidación lipídica y actividad de enzimas antioxidantes como por ejemplo Catalasa (CAT), Superóxido dismutasa (SOD), niveles de 8-hidroxi-2-deoxiguanosina, Glutación peroxidasa (GPx), e incluso niveles de glutación (GSH) y vitamina E, los cuales son antioxidantes no enzimáticos [8-15].

Ottay y *col* (1999) demostraron una expresión elevada de la enzima Cu/ZnSOD y de GPx en tejido endometrial de pacientes con endometriosis, independiente de la fase del ciclo menstrual en el que se encontrara la paciente [12]. En 2004, Oner-Lyidogany y *col* evaluaron la actividad de SOD en tejido endometrial ectópico y eutópico, demostrando el aumento en el tejido endometrial anormal [14]. El estudio de Slater y *col* en 2005 evaluaron los productos de oxidación en células endometriales de pacientes con y sin endometriosis en términos de niveles de 8-hidroxi-2-deoxiguanosina, encontrando que estos niveles eran mayor en las pacientes con endometriosis; concluyendo que los daños en el DNA pueden conducir a la transformación maligna de la endometriosis (carcinogénesis) [15]. Lambrinouadaki y *col*, (2009) cuantificaron, en pacientes con endometriosis, la expresión de la proteína de choque térmico HSP70b, como marcador de respuesta a estrés oxidativo y como medida indirecta de la oxidación de proteínas, encontrando que la expresión de esta proteína, estaba aumentada, pero que ese aumento no dependía del estadio de la enfermedad.[16].

En el mismo año, Ngo y col/ encontraron en el líneas celulares primarias de tejido endometrial eutópico de pacientes con endometriosis un incremento de la actividad SOD versus células endometriales normales, relacionando de esta forma al estrés oxidativo con endometriosis [17]. Prieto y col/ (2012) concluyen que las pacientes con endometriosis presentan bajos niveles de la enzima SOD en suero, lo que sugiere una baja capacidad antioxidante en estas mujeres. [13]

Aunque estos estudios evidencian el papel del estrés oxidativo con la endometriosis ninguno de ellos es concluyente, debido posiblemente a diferentes variables asociadas a la muestra empleada que pueden hacerla heterogénea como el tipo de muestra, edad de las pacientes, grupo control empleado, factores genéticos y étnicos asociados, entre otros, además de que sólo son estudiados pocos marcadores en cada caso siendo relevante la evaluación del mayor número de marcadores oxidativos en la misma muestra bajo los mismos parámetros.

En el presente estudio se evalúa, en una población sociodemográfica y ginecológicamente homogénea, la actividad superóxido dismutasa y niveles de oxidación proteica en muestras de plasma y tejido endometrial eutópico de pacientes con infertilidad asociada a endometriosis vs pacientes con infértiles no asociada a endometriosis. Esta investigación marca la pauta para la búsqueda de marcadores de estrés oxidativo que puedan favorecer al posible diagnóstico de ésta enfermedad, de forma menos invasiva y asequible a toda mujer en edad fértil. Además se espera que favorezca al potencial de estudios “*in vitro*” de agentes terapéuticos antioxidantes que puedan influir sobre esta enfermedad con el fin de mejorar la calidad de vida de las mujeres que la padecen.

MATERIALES Y MÉTODOS

POBLACIÓN DE ESTUDIO

Los sujetos en estudio fueron pacientes que asistieron a procedimiento laparoscópico debido a un diagnóstico presuntivo de infertilidad asociada a endometriosis, entre los meses de marzo a noviembre de 2012.

A todos los sujetos incluidos en el estudio se les explicó el objetivo de la investigación, se les realizó una encuesta de características sociodemográficas y ginecológicas (Anexo 1) y se les solicitó la firma de un consentimiento informado de acuerdo a las disposiciones éticas vigentes (Anexo 2). Pacientes con diagnóstico presuntivo de infertilidad (más de un año sin gestación) que firmaron el consentimiento informado fueron incluidas en el estudio. Pacientes con dislipidemias, enfermedades cardiovasculares, enfermedad reumatoide o lupus y que no firmaran el consentimiento informado fueron excluidas del estudio.

El estudio doble ciego permitió agrupar teniendo en cuenta los resultados del procedimiento laparoscópico, a los sujetos de la siguiente forma: de 38 pacientes infértiles, 22 fueron denominadas grupo A y las otras 16 en el grupo B. A partir de éstas, se estudió además el comportamiento oxidativo de pacientes nulíparas la cuales fueron 29 sujetos: 13 pacientes nulíparas provenientes del grupo B y 16 pacientes nulíparas del grupo A. Las muestras tomadas a cada paciente fueron plasma y tejido endometrial.

RECOLECCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

Las muestras empleadas en esta investigación fueron plasma y tejido endometrial, obtenidas de los sujetos antes del procedimiento laparoscópico.

Muestras de plasma

Las muestras de plasma fueron obtenidas a partir de sangre tomada en tubos heparinizados al momento de canalizar a las pacientes, mantenidas en refrigeración para su transporte al laboratorio. Se centrifugaron a 5000 rpm por 10 minutos con el fin de obtener una fracción correspondiente al plasma y la otra de eritrocitos. El plasma y los eritrocitos se almacenaron a -80°C, hasta posteriores ensayos. [18]

Muestras de tejido endometrial

Las muestras de tejido endometrial fueron tomadas mediante una biopsia realizada con una cureta de Novak y almacenadas en tubos que contenían solución salina, estas muestras fueron refrigeradas para su transporte al laboratorio. Para la obtención de una fracción rica en proteínas fueron homogeneizadas con ayuda de un homogeneizador de tejidos manual Wheaton de 0,2 mL empleando buffer RIPA. El homogeneizado fue centrifugado a 8500 rpm por 20 minutos a 4°C, el sobrenadante cuya fracción corresponde a una fracción proteica se almacenó a -80°C hasta la realización de los ensayos. [19]

ENSAYOS BIOQUÍMICOS

Ensayo de oxidación proteica

La oxidación proteica fue medida en términos de proteínas carboniladas, usando el ensayo colorimétrico con 2,4 dinitrofenilhidrazina (2,4 DNPH). Este ensayo se basa en la capacidad de los radicales libres encontrados intracelularmente de oxidar proteínas, la cuales pueden formar

un complejo con el reactivo 2,4-dinitrofenil hidrazina, permitiendo cuantificar colorimétricamente a 370 nm las proteínas oxidadas posiblemente debido a un proceso de estrés oxidativo.

Para este ensayo 4000 µg de proteína de plasma y 150µg de proteína de tejido endometrial previamente cuantificados por el método de Bradford, fueron empleados. Esta alícuota conteniendo proteínas fue reaccionada con ácido tricloroacético (TCA) al 10%, seguido de centrifugación a 5000 rpm por 5 minutos, para precipitar las proteínas. El precipitado obtenido fue disuelto en una solución 2,4 DNPH 10mM en HCl 2M e incubado por 30 minutos a temperatura ambiente, a fin de obtener el derivado hidrazona de proteínas oxidadas que fue precipitado nuevamente con TCA al 10%. El precipitado obtenido se lavó con solución etanol/ acetona (1:1) para retirar el exceso de DNPH. El precipitado final fue disuelto en Dodecilsulfato sulfato de sodio al 2% seguido de sonicación por 10 minutos [20,21]. La solución obtenida fue empleada para la cuantificación de las proteínas oxidadas a 370nm contra un blanco de HCl 2M en placas de 96 pozos. Este ensayo se realizó por triplicado a tres replicas. Los resultados fueron expresados en ng de proteína oxidada por µg de proteína total en la muestra.

Ensayo de actividad enzimática superóxido dismutasa

Este ensayo fue llevado a cabo en geles nativos de poliacrilamida al 12%, en el cual el gel de apilamiento al 5% conteniendo Riboflavina, fue polimerizado por medio de una reacción fotoactivada. En este ensayo no se realizó normalización de carga de proteínas en cada pozo debido a que solo se evaluó presencia y/o ausencia de las bandas correspondientes a cada una de las isoformas de la enzima.

La actividad de la enzima fue evaluada en geles nativos, evidenciada como bandas acromáticas sobre un fondo oscuro, producto de la competencia entre la enzima y el Nitrobluetetrazolium (NBT) por los iones superóxido ($O_2^{\cdot-}$).

Para éste ensayo, 200µg de proteína de plasma o 25 µg tejido endometrial fueron sembrados en cada pozo para la corrida electroforética. Una vez terminada se procedió a teñir el gel, incubando con NBT 2.43mM, y luego con una solución Riboflavina 0.28µM y TEMED 28mM en buffer fosfato 50mM pH 8.0. Después de exponer el gel a la luz blanca se observó la aparición de bandas acromáticas indicando la actividad de la enzima superóxido dismutasa [22]. Este ensayo fue realizado por triplicado.

ANALISIS ESTADISTICO

Los datos fueron analizados con el paquete estadístico STATA versión 11.0. Los datos de oxidación proteica no tuvieron una distribución normal, por lo que la significancia estadística fue determinada con el test de U - Mann - Whitney y las variables cualitativas fueron comparadas usando el test ji- X^2 . Los valores de p menores a 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Homogeneidad en las variables del grupo en estudio: Pacientes infértiles

A partir de la encuesta aplicada a los sujetos de este estudio, se obtuvo información personal, ginecológica, obstétrica y antecedentes familiares relacionado con infertilidad. Estos datos fueron analizados a fin de obtener las características sociodemográficas y/o ginecológicas para cada grupo.

Los resultados obtenidos son mostrados en la Figura 1, se observa las variables continuas: edad, edad de menarquía, inicio vida marital, días de ciclo menstrual y días con la menstruación están expresadas como la media \pm la desviación estándar (media \pm DE) y de las variables categóricas: gestaciones, abortos, presencia de coágulos en la menstruación, atraso de más de cuarenta días, presencia de flujo vaginal, dolor menstrual, familiares con infertilidad y endometriosis en términos de porcentaje.

El test estadístico usado para comparar todas las variables encuestadas evidenció que no existían significancia estadística entre los dos grupos (valores de $p > 0,05$), como se observa en la figura, indicando que la población en estudio es representativamente homogénea, permitiendo que los resultados obtenidos de los diferentes ensayos para ambos grupos puedan ser más fácilmente comparables. (Tabla 1)

Elevada oxidación de proteínas en muestras de tejido endometrial y no en plasma de pacientes del grupo A sugieren estrés oxidativo

La oxidación proteica en términos de carbonilación es un marcador de estrés oxidativo empleado para la determinación de la extensión del daño oxidativo causado por las especies reactivas a las proteínas en condiciones tanto *in vivo* como *in vitro*. Con el fin de evaluar la posible presencia de estrés oxidativo, este marcador fue cuantificado en las muestras de plasma y tejido endometrial para ambos grupos en estudio.

En la Figura 2, se observan los niveles de oxidación proteica expresados en términos de la media \pm desviación estándar tanto para las muestras de plasma (Figura 2A) y tejido endometrial (Figura 2B). El test estadístico empleado para comparar los dos grupos sugiere que no existe significancia estadística en los niveles de oxidación proteica en plasma ($p=0,1099$), sin embargo las muestras de tejido endometrial mostraron significancia estadística ($p=0,0007$).

En la Figura 2A y 2B, se observan los resultados de este ensayo, siendo $11,3 \pm 4,10$ ng de proteína oxidada / μ g de proteína total para el grupo B vs $10,15 \pm 2,82$ ng de proteína oxidada / μ g de proteína total para el grupo A. También se evidencia que las muestras de tejido endometrial del grupo A tienen niveles más elevados de oxidación proteica que el grupo B ($46,09 \pm 65,43$ ng de proteína oxidada / μ g de proteína total vs $10,84 \pm 4,54$ ng de proteína oxidada / μ g de proteína total). En la Figura 2B se observa una gran variabilidad en los niveles de oxidación de proteínas de las pacientes del grupo A, la cual se ve representada en el alto valor

de la desviación estándar reportada ($\pm 65,43$), esto puede ser el resultado de la patología asociada a este grupo.

Las muestras de plasma no evidencian actividad superóxido dismutasa

Con el fin de evaluar la actividad de la enzima superóxido dismutasa en las muestras de plasma y tejido endometrial, se realizaron pruebas con muestras tomadas al azar. Los geles nativos obtenidos evidenciaron que las muestras de plasma no mostraron actividad para SOD, sin embargo las muestras de tejido endometrial evidenciaron actividad para las dos isoformas de SOD (Figura 3)

Disminuida actividad Cu/ZnSOD en tejido endometrial de sujetos sólo grupo B

El estrés oxidativo es un proceso celular caracterizado por el desbalance entre las especies reactivas de oxígeno que pueden dañar macromoléculas y el sistema de defensa antioxidante celular. Debido a que existe un elevado nivel de oxidación proteica en las pacientes con endometriosis y que además este se evidencia en muestras de tejido endometrial y no en plasma, se evaluó el estado antioxidante mediante la evaluación de presencia o ausencia de actividad de las dos isoformas de la enzima superóxido dismutasa, Cu/ZnSOD (citósolica), MnSOD (mitocondrial).

En la Figura 4, se puede observar los geles nativos de poliacrilamida al 12% con los resultados para la actividad enzimática. Se evidencia que todos los sujetos del grupo A, mostraron actividad para las dos isoformas de SOD, sin embargo, sólo el 19% de los sujetos del grupo B mostró

actividad para la isoforma Cu/ZnSOD, habiendo en algunos casos ausencia total de ésta isoforma.

Al evaluar estadísticamente la presencia de actividad de SOD se encontró que existía significancia estadística en ambos grupos ($p=0,0031$), indicando así una actividad diferencial entre las isoformas de SOD para ambos grupos. Estos datos junto con los obtenidos anteriormente sugieren la presencia de un proceso de estrés oxidativo marcado en sujetos del grupo A cuando se compara con los del grupo B.

Homogeneidad en el nuevo grupo en estudio: Pacientes nulíparas

Al analizar las muestras en las que no existía actividad de la isoforma Cu/ZnSOD, se pudo comprobar que si se realizaba un estudio más riguroso de los sujetos que nunca habían tenido la oportunidad de gestar ni de abortar, es decir nulíparas, se obtienen resultados prometedores para la posible asociación entre estrés oxidativo, infertilidad y endometriosis. Por este motivo fue considerado evaluar el comportamiento a un nuevo grupo que fue nombrado como nulíparas, quedando conformado entonces por 16 pacientes nulíparas del grupo A y 13 pacientes nulíparas del grupo B.

Con el objetivo de conocer si el grupo de nulíparas era homogéneo, las características sociodemográficas fueron evaluadas. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5, las variables continuas: edad, edad de menarquía, inicio vida marital, días de ciclo menstrual y días con la menstruación están expresadas como la media \pm la desviación estándar (media \pm DE) y de las variables categóricas: gestaciones, abortos, presencia de coágulos en la menstruación,

atraso de más de cuarenta días, presencia de flujo vaginal, dolor menstrual, familiares con infertilidad y endometriosis en términos de porcentaje.

El test estadístico usado para comparar las variables evidenció que no existía significancia estadística entre ambos grupos (valores de $p > 0,05$), indicando, que esta población al igual que la original es también representativamente homogénea (Tabla 2)

Elevada oxidación de proteínas en muestras de tejido endometrial y no en plasma de pacientes nulíparas del grupo A sugieren estrés oxidativo en esta patología

En la Figura 6 se observan los niveles de oxidación proteica expresados en términos de la media \pm la desviación estándar tanto de las muestras de plasma y tejido endometrial de ambos grupos (Figura 6A y 6B respectivamente), además de una tabla que resume los datos obtenidos para cada grupo (parte inferior). El test estadístico usado para comparar los dos grupos mostró que existe significancia estadística en los niveles de oxidación proteica de las muestras de tejido endometrial de ambos grupos ($p = 0,0005$), sin embargo en las muestras de plasma no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,1190$), teniendo un comportamiento semejante al de la población de pacientes infértiles.

En la Figura 6A se puede observar que no existen diferencias en las medias de los niveles de oxidación proteica en las muestras de plasma de ambos grupos: $9,98 \pm 3,79$ ng de proteína oxidada / μg de proteína total para las del grupo B vs $11,87 \pm 3,89$ ng de proteína oxidada / μg de proteína total para las del grupo A.

En la Figura 6B se observa que las pacientes nulíparas del grupo A tienen niveles más altos de oxidación proteica que las pacientes nulíparas del grupo B ($43,85 \pm 70,13$ ng de proteína oxidada / μg de proteína total vs $6,85 \pm 8,42$ ng de proteína oxidada / μg de proteína total respectivamente). En esta figura se muestra además que los niveles de oxidación proteica de las pacientes nulíparas del grupo A es semejante al de la población general de infértiles, presentando alta variabilidad, la cual se ve representada en el alto valor de la desviación estándar reportada ($\pm 70,13$).

En cuanto a las pacientes nulíparas del grupo B, se observa que los valores individuales de oxidación proteica presentan un comportamiento homogéneo, es decir, que estos se encuentran cerca del valor de la media.

Todos estos datos sugieren que el comportamiento de los niveles de oxidación proteica encontrados en éstas pacientes, sigue el mismo patrón observado en la población general de pacientes infértiles, indicando así la presencia de estrés oxidativo en el tejido endometrial de las pacientes infértiles del grupo A independiente del estado de nuliparidez o antecedentes de embarazos o abortos. Estos datos de altos niveles de oxidación proteica en pacientes nulíparas del grupo A pudieran tener una influencia en la fecundación, implantación y/o alteraciones asociadas a la fertilidad.

Ausencia total de actividad de isoforma Cu/ZnSOD en pacientes nulíparas del grupo B

Una vez organizados los geles nativos de actividad superóxido dismutasa para las pacientes nulíparas, se observó que todas de las pacientes del grupo A presentaron actividad para las dos

isoformas de SOD, no siendo así para las pacientes del grupo B, en las que sólo se evidenció actividad de la isoforma MnSOD (Figura 7).

Estos resultados sugieren una posible relación directamente proporcional entre los altos niveles de oxidación proteica y la actividad de las isoformas de SOD en las pacientes nulíparas del grupo A.

Estos hallazgos podrían favorecer la hipótesis de la presencia de estrés oxidativo en el tejido endometrial y no en plasma de éstas pacientes con el consecuente daño severo en las macromoléculas de las células endometriales, lo cual favorecería el proceso de infertilidad.

DISCUSIÓN

La endometriosis es definida como la presencia de tejido endometrial fuera de la cavidad uterina y es considerada como una condición ginecológica benigna, sin embargo en algunos casos puede ser agresiva. La patogénesis de la endometriosis es compleja y multifactorial. A pesar de ser una de las enfermedades ginecológicas más estudiadas, su patogénesis sigue siendo aún desconocida.

Las anomalías intrínsecas del endometrio se consideran que pueden estar asociadas con la endometriosis, incluida la expresión anormal de genes, modificación de respuesta endometrial a hormonas como la progesterona, incrementada densidad nerviosa y estrés oxidativo. La evaluación del endometrio en pacientes con endometriosis es una importante línea de investigación, por lo cual se ha sugerido que el estudio del endometrio eutópico pueda ayudar a lograr este objetivo. [4]

A fin de aportar información que pudiera evidenciar la importancia del tejido endometrial eutópico en el desarrollo de endometriosis, en este estudio se pretendió comprobar la hipótesis de la relación entre el estrés oxidativo y dicha enfermedad.

Los altos niveles de oxidación proteica encontrados en el tejido endometrial de las pacientes infértiles y nulíparas del grupo A vs pacientes infértiles y nulíparas grupo B, así como la actividad diferencial de las isoformas de la enzima superóxido dismutasa, proporcionan evidencia de la posible presencia de un proceso oxidativo en el endometrio de estas mujeres.

Aun cuando las características sociodemográficas y ginecológicas no nos permiten diferenciar los grupos en estudios, se puede sugerir a partir de los resultados de los marcadores estudiados que los sujetos del grupo A pudieran ser las pacientes con infertilidad asociada a endometriosis y las del grupo B, las pacientes infértiles sin endometriosis.

Esta afirmación se soporta en los hallazgos reportados por Otay *Col* (1999), los cuales encontraron una alta expresión de las isoformas de Cu/ZnSOD y MnSOD en el tejido eutópico de pacientes con endometriosis, independientemente del estadio del ciclo menstrual. Por otro lado Ngo y *Col* (2009) utilizando líneas celulares primarias encontraron una alta expresión de SOD en tejido endometrial de pacientes con endometriosis versus un control sano. [12,17]

En cuanto a los niveles de oxidación proteica, dada en términos de proteínas carboniladas hasta el momento no se ha reportado en la literatura la asociación de este marcador con endometriosis lo cual brinda a ésta investigación un componente innovador y un nuevo campo de estudio, diferente a los ya reportados (peroxidación lipídica, capacidad antioxidante, niveles de vitamina E entre otros).

Todo esto no permite decir que los datos de este trabajo no se pueden totalmente soportar o favorecer con los de la literatura, sin embargo, el hecho de que el valor máximo del rango de oxidación proteica en el grupo B sea aproximadamente 14 a 10 veces más pequeño que el rango del grupo A, evidencia una diferencia derivada del estrés oxidativo entre los grupos en estudios (Figura 2 y 4), permitiendo así que este marcador pueda ser usado para diferenciar los grupos en estudio.

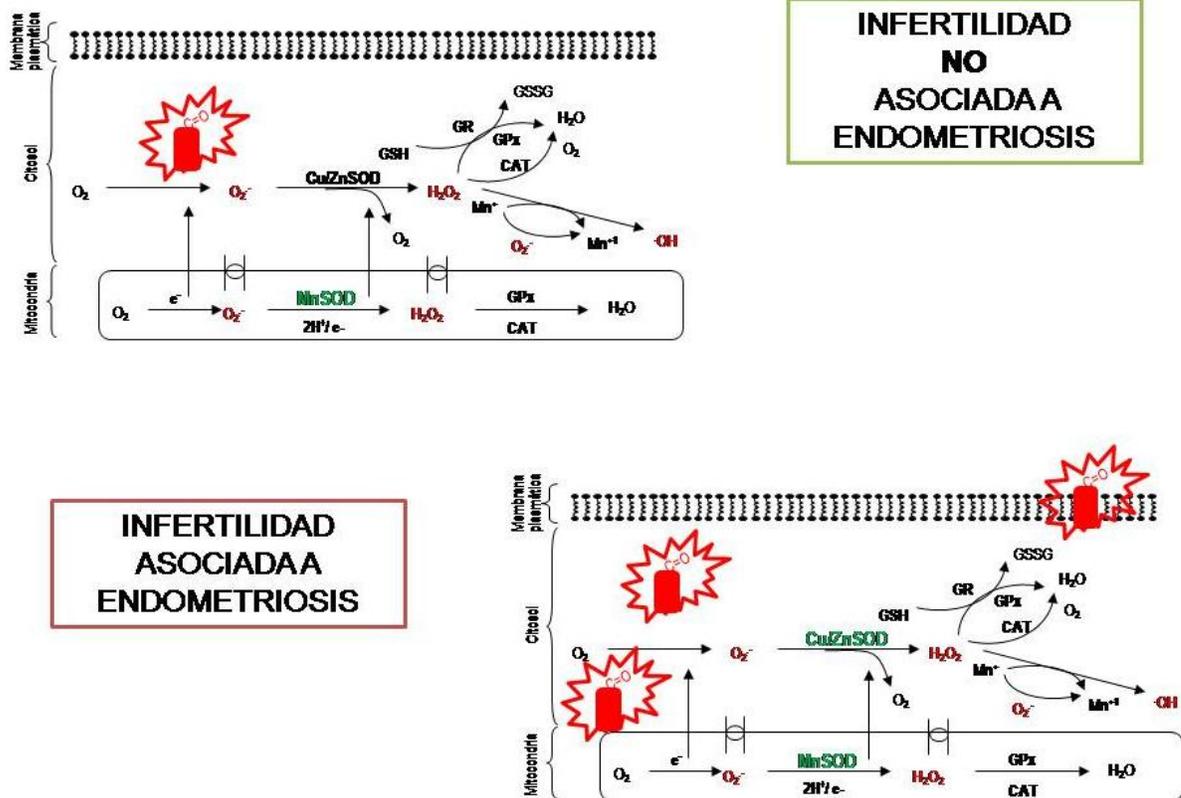
Además de lo anterior, este marcador también pueden ser empleado como una medida indirecta de las condiciones medioambientales del tejido endometrial, ya que las proteínas son las macromoléculas más abundantes en las células y por ende los blancos más fáciles de atacar por parte de los ROS, por tanto, se sugiere que los altos niveles de oxidación proteica presentes en el grupo A estén asociados con las condiciones microambientales poco aptas para una implantación embrionaria, de ahí que su infertilidad pueda estar asociada a este fenómeno [23,24]

Por otro lado, la variabilidad individual de los niveles de oxidación proteica encontrados en el grupo A, posiblemente pueden estar relacionados con el estadio de la enfermedad, sin embargo se sugiere la realización de estudios donde se considere éste parámetro, a fin de apoyar o no dicha hipótesis, de tal forma que se pueda proponer el uso de los niveles de oxidación proteica como un posible marcador para el diagnóstico de endometriosis o evolución de la enfermedad ante un eventual tratamiento, usando como muestra una biopsia de tejido endometrial que resultaría menos invasiva que el procedimiento laparoscópico o en su defecto que dicho marcador pueda hacer parte de una batería de marcadores de estrés oxidativo que puedan implementarse como un nuevo método de diagnóstico.

CONCLUSIONES

- Muestras de tejido endometrial eutópico y no de plasma pudieran ser las más adecuadas para el estudio del ambiente oxidativo en este grupo en estudio, constituyéndose en un método menos invasivo, útil para el diagnóstico y seguimiento de las enfermedad y sus tratamientos comparado con las técnicas tradicionales
- Se encontró diferencias significativas en los resultados bioquímicos de los niveles de oxidación proteica y actividad superóxido dismutasa entre pacientes infértiles con y sin endometriosis, estando aumentados en las pacientes con endometriosis.
- Existe una actividad diferencial de las isoformas de la enzima superóxido dismutasa entre los grupos en estudios.
- Pacientes nulíparas con endometriosis tienen niveles de oxidación proteica mas alta y expresión de las dos isoformas de la enzima superóxido dismutasa, mientras que las que no tienen endometriosis tienen bajos niveles de oxidación proteica y actividad solo de la isoforma CuZnSOD.
- Por primera vez se presenta un reporte bioquímico de la relación de estrés oxidativo e infertilidad asociada a endometriosis basado en resultados de oxidación de proteínas y actividad superóxido dismutasa.

La siguiente gráfica se esquematiza un posible modelo para la relación estrés oxidativo y endometriosis.



ESTOS ESTUDIOS ENFATIZAN LA RELEVANCIA DE LOS CAMBIOS REDOX
 EN EL ENDOMETRIO EUTOPICO DE MUJERES CON INFERTILIDAD
 ASOCIADA A ENDOMETRIOSIS Y LA NECESIDAD DE REALIZAR ESTUDIOS
 CON OTROS MARCADORES OXIDATIVOS PARA LA BÚSQUEDA DE
 MARCADORES BIOLÓGICOS CON UTILIDAD DIAGNOSTICA, PRONOSTICA Y
 FARMACOLOGICA

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Gupta S, Agarwal A, KrajcirN, Alvarez J. Role of oxidative stress in endometriosis. *Reprod. BioMed Online*. 2006; 13(1): 126-134
2. Giudice L. Endometriosis. *New Engl J Med*. 2010; 362:2389-2398
3. Giudice L, Kao L. Endometriosis. *Lancet*. 2004; 364:1789–1799.
4. Carvalho L, Podgaec S, Bellodi-Privato M, Falcone T, Simoes M. Role of eutopic endometrium in pelvic Endometriosis. *J. Minim Inv Gynecol*. 2011;18 (4):419-427
5. Vinatier D, Orazi G, Cosson M, Dufour P. Theories of endometriosis. *Eur J Obst Gynecol Rep Biol*. 2001; 96: 21-34.
6. Brosens I, Brosens J, Benagiano G. The eutopic endometrium in endometriosis: are the changes of clinical significance?. *Rep BioMed Online*. 2012; 24:496– 502
7. Polak G, Wertel I, Barczynski B, Kwasniewski W, Bednarek W, Kotarski J. Increased levels of oxidative stress markers in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Eur J Obst Gynecol Rep Biol*. 2013. Article in press.
8. Seeber BE, Czech T, Buchner H, Barnhart KT, SegerCh, Daxenbichler G, Wildt L, Dieplinger H. The vitamin E-binding protein afamin is altered significantly in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fert Ster*. 2010;94(7):2923-2926.
9. Szczepanska M, Kozlik J, Skrzypczak J, Mikołajczyk M. Oxidative stress may be a piece in the endometriosis puzzle. *Fert Ster*. 2003;79(6):1288-1293
10. Petean C, Ferriani R, Dos Reis R, De Moura M, Jordoa A, De Albuquerque P. Lipid peroxidation and vitamin E in serum and follicular fluid of infertile women with peritoneal

endometriosis submitted to controlled ovarian hyperstimulation: a pilot study. *Fert Ster.* 2008;90(6):2080-2085.

11. Kavtaradze N, Dominguez C, Rock J, Parthasarathy S, Murphy A. Vitamin E and C supplementation reduces endometriosis related pelvic pain. *Fert Ster.* 2003;80 Supple 3:221-222.

12 .Ota H, Igarashi S, Hatazawa J, Tanaka T. Immunohistochemical assessment of superoxide dismutase expression in the endometrium in endometriosis and adenomyosis. *Fert Ster.* 1999;72(1):129-134.

13. Prieto L, Quesada J, Cambero O, Pacheco A, Pellicer A, Codoceo R, Garcia-Velasco J. Analysis of follicular fluid and serum markers of oxidative stress in women with infertility related to endometriosis. *Fert Ster.* 2012;98(1):126-130.

14. Oner-Iyidogan Y, Kocak H, Gurdol F, Korkmaz D, Buyru F. Indices of oxidative stress in eutopic and ectopic endometria of women with endometriosis. *Gynecol Obstet Invest.* 2004;57:214–217.

15. Slater M, Quagliotto G, Cooper M, Murphy C. Endometriotic cells exhibit metaplastic change and oxidative DNA damage as well as decreased function, compared to normal endometrium. *J. Mol Histol.* 2005; 36: 257–263

16. Lambrinoudaki I, Augoulea A, Christodoulakos G, Economou E, Kaparos G, Kontoravdis A, Papadias C, Creatsas G. Measurable serum markers of oxidative stress response in women with endometriosis. *Fert Ster.* 2009;91(1):46-50.

17. Ngo C, Chereau C, Nicco C, Weill B, Chapron C, Batteux F. Reactive oxygen species controls endometriosis progression. *Am J Pathol.* 2009; 175:225–234.

18. Fong J, Lin M. Elevated lipid peroxidation and disturbed antioxidant enzyme activities in plasma and erythrocytes of patients with uterine cervicitis and myoma. *Clin Biochem.*1999; 32: 189-192
19. Pejic S, Todorovic A, Stojiljkovic V, Cvetkovic D, Lucic N, Radojicic R, Saicic Z, Pajovic S. Superoxide dismutase and lipid hydroperoxides in blood and endometrial tissue of patients with benign, hyperplastic and malignant endometrium. *Anais Acad Bras Cienc.* 2008;80(3):515-522.
20. HamidiAlamdari D, Kostidou E, Paletas K, Sarigianni M, Konstas A, Karapiperidou A, Koliakos G. High sensitivity enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method for measuring protein carbonyl in samples with low amounts of protein. *Free Rad Biol Med.* 2005; (39): 1362-1367
21. Maders L, Bagatini M, Santos K, Spanevello R, Maldonado P, Brulé A, Araujo M, Schetinger M, Morsch V. Measurement of oxidative stress and antioxidant status in acute lymphoblastic leukemia patients. *Clin Biochem.* 2008; 41:511-518
22. Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem.*1971; 44:276–287.
23. Agarwal A, Cocuzza M, Abdelrazik H, Sharma R. Oxidative stress measurement with male or female factor infertility. *Handbook Chemilum Meth Oxid Stress Assessm.* 2008: 195-218
24. Agarwal A, Saleh R, Bedaiwy M. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fert Ster.* 2004;79(4):829-843.

ANEXO 1
FORMATO ESCRITO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PACIENTES SELECCIONADOS COMO
SUJETOS DE ESTUDIO

Todos los pacientes deben llenar el siguiente formato, previo a la realización de los procedimientos. Esta es una forma de aceptación legal para participar en la investigación, que usted puede libremente firmar si está de acuerdo en los siguientes aspectos:

Yo _____ con cédula de ciudadanía No. _____ con dirección _____ y teléfono _____

Para los efectos legales que corresponden, declaro que he recibido información amplia y suficiente sobre el estudio, titulado "**PRESENCIA DE MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN MUJERES INFERTILES**" en el cual se pretende evaluar la posible relación entre marcadores de estrés oxidativo y endometriosis. Se me ha explicado que realizarán evaluaciones clínicas y bioquímica, consistentes en el diagnóstico de endometriosis y la toma de muestras que pueden ser sangre, líquido peritoneal y/o tejido endometrial; igualmente que este procedimiento no ocasiona lesión alguna ni dolor; se me ha informado sobre los beneficios que obtendré en estas actividades, reflejados en la obtención de una mejor información para los investigadores que permita aplicar acciones en mejora de la enfermedad y de mi calidad de vida. Soy consciente que los resultados obtenidos favorecerán a otros seres humanos, ya que se me ha explicado que estos ayudarán a entender el proceso en la endometriosis. Igualmente conozco que los costos adicionales que demanda la investigación corren a cargo del investigador. Conozco los compromisos que adquiero con el proyecto y que en todo momento seré libre de continuar ó de retirarme, con la única condición de informar oportunamente mi deseo, al investigador (es).

Yo _____ con cédula de ciudadanía No. _____ con dirección _____ y teléfono _____ asumo el papel de testigo presencial del presente consentimiento informado en la ciudad de Cartagena de Indias, el día _____ del mes de _____ año _____ (Testigo No. 1)

Firma Testigo No. 1: _____

Yo _____ con cédula de ciudadanía No. _____ con dirección _____ y teléfono _____ asumo el papel de testigo presencial del presente consentimiento informado en la ciudad de Cartagena de Indias, el día _____ del mes de _____ año _____ (Testigo No. 2)

Firma Testigo No. 2: _____

Acepto voluntariamente participar sin más beneficios que los pactados previamente

Responsable: Maricela Viola Rhenals - Investigador Principal
Universidad de Cartagena, Campus de Zaragocilla, Sección Bioquímica, Piso 2.
Teléfono: 6698176 ext 130, 3017163991

Firma: _____
Cédula: _____



ANEXO 2

PROYECTO PRESENCIA DE MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN MUESTRAS DE MUJERES INFERTILES



Fecha: _____

Código paciente: _____

DATOS PERSONALES DEL PACIENTE

Nombres y Apellidos:

Documento de Identificación: _____

Edad: _____

Estado civil: _____

Dirección: _____

Teléfono fijo: _____

Teléfono celular: _____

Correo electrónico: _____

DATOS GINECO-OBSTETRICOS

Edad menarquía: _____ Inicio vida marital: _____

Gestaciones: Si _____ o No _____ Cuantos hijos? _____

Abortos: Si _____ o No _____ Cuantos? _____

Fecha de la última menstruación: _____

Días del ciclo menstrual: _____ Días con la menstruación: _____

Coágulos durante la menstruación: Si _____ o No _____

Califique su menstruación como: Escasa _____ Normal _____ Abundante _____

Atraso en la menstruación de más de 40 días: Si _____ No _____ Algunas veces _____

Flujo vaginal persistente: _____

Dolor menstrual: _____ Intensidad del dolor: (0 a 10): _____

Dolor coital: _____ Intensidad del dolor: (0 a 10): _____

Toma medicamentos para el dolor menstrual: Si _____ o No _____ Cuales: _____

Usa medicamentos endovenosos para el dolor menstrual: Si ___ o No___ Cuales: _____

ANTECEDENTES FAMILIARES

Familiares con endometriosis: Si_____ o No_____ Quien: _____

Familiares con infertilidad: Si_____ o No_____ Quien: _____

Familiares con cáncer ginecológico: Si_____ o No_____ Quien: _____

ANTECEDENTES

Dislipidemias: Si_____ o No_____ Cual: _____

Enfermedades cardiovasculares: Si_____ o No_____ Cual: _____

Enfermedad Reumatoide: Si_____ o No_____

Lupus: Si_____ o No_____

Firma del paciente

Firma del encuestador

Tabla 1: Resumen de Características Sociodemográficas de los sujetos infértiles del estudio. Los valores de p indican que no existe significancia estadística en las variables estudiadas de ambos grupos.

VARIABLES	GRUPOS		
	Grupo A	Grupo B	Valor de P
Edad (años±DE)	32(4)	32(5)	0,5684
Menarquía (días±DE)	13(1)	13(2)	0,8549
Inicio vida marital (años±DE)	21(4)	20(3)	0,5211
Gestaciones (%)	0	6,25	0,405
Abortos (%)	27,27	12	0,245
Ciclo	29(1)	30(7)	0,5866
Días ciclo	4(2)	4(1)	0,9389
Coágulos	50	56,26	0,48
Cantidad menstruación			0,733
Escasa	18,18	6,25	
Normal	50	56,25	
Abundante	31,82	37,5	
Atraso de más de 40 días	13,64	18,75	0,502
Flujo vaginal	36,36	27,27	0,449
Dolor	77,27	81,25	0,547
Calificación del dolor	5(3)	6(3)	0,6323
Medicamentos	63,63	43,75	0,188
Endovenosos	4,54	9,09	0,379
Familiares con endometriosis	4,54	6,25	0,671
Familiares con infertilidad	22,72	6,25	0,18
Familiares con cancer ginecologico	13,64	6,25	0,433

Tabla 2: Resumen de Características Sociodemográficas de los sujetos nulíparas del estudio. Los valores de p indican que no existen diferencias significativas en las variables estudiadas entre los grupos.

VARIABLES	GRUPOS		
	Grupo A	Grupo B	Valor de P
Edad (años±DE)	32(4)	33(4)	0,5838
Menarquía (días±DE)	13(1)	12(1)	0,4936
Vida marital (años±DE)	21(5)	20(4)	0,6895
Ciclo	29(2)	32(9)	0,2371
Días ciclo	4(2)	4(1)	0,8918
Coágulos	50	37,5	0,404
Cantidad menstruación			1
Escasa	18,75	7,7	
Normal	50	53,8	
Abundante	37,5	38,5	
Atraso de más de 40 días	18,8	23,1	0,565
Flujo vaginal	31,1	30,8	0,647
Dolor	75	84,6	0,435
Calificación del dolor	5(4)	6(2)	0,5943
Medicamentos	68,8	53,8	0,33
Endovenosos	0	15,4	0,192
Familiares con endometriosis	6,3	7,7	0,704
Familiares con infertilidad	18,8	7,7	0,383
Familiares con cáncer ginecológico	18,8	7,7	0,383
Dislipidemias	12,5	7,7	0,58

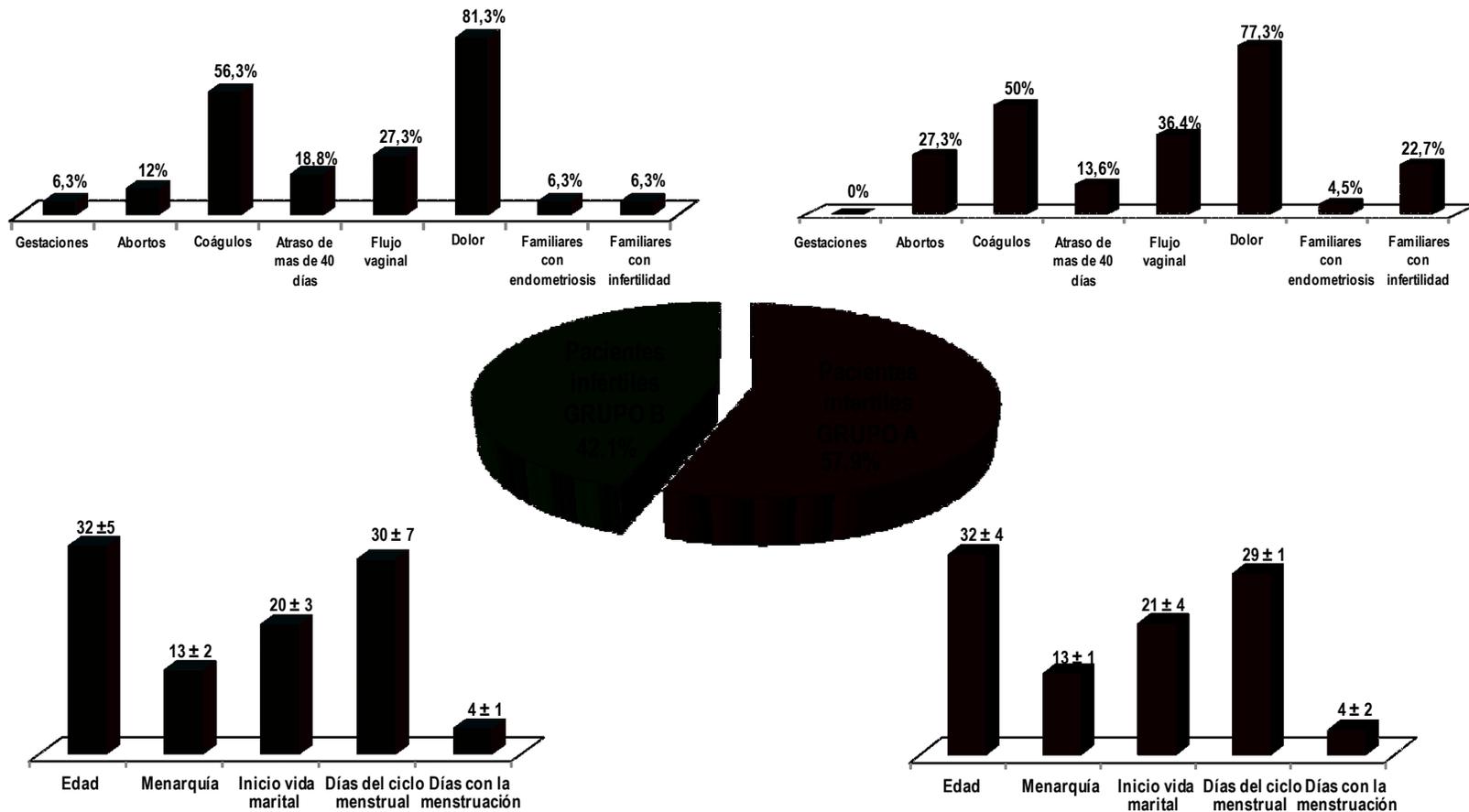


Figura 1: Características de las pacientes en estudio

Características sociodemográficas de pacientes infértiles sin endometriosis (color verde) y pacientes infértiles con endometriosis (color rojo). Datos tomados de encuesta a pacientes antes del procedimiento laparoscópico. No existe significancia estadística entre las variables sociodemográficas (valores de $P > 0,05$), indicando que los dos grupos son representativamente homogéneos. Los test utilizados fueron U- Mann Whitney y ji- X2

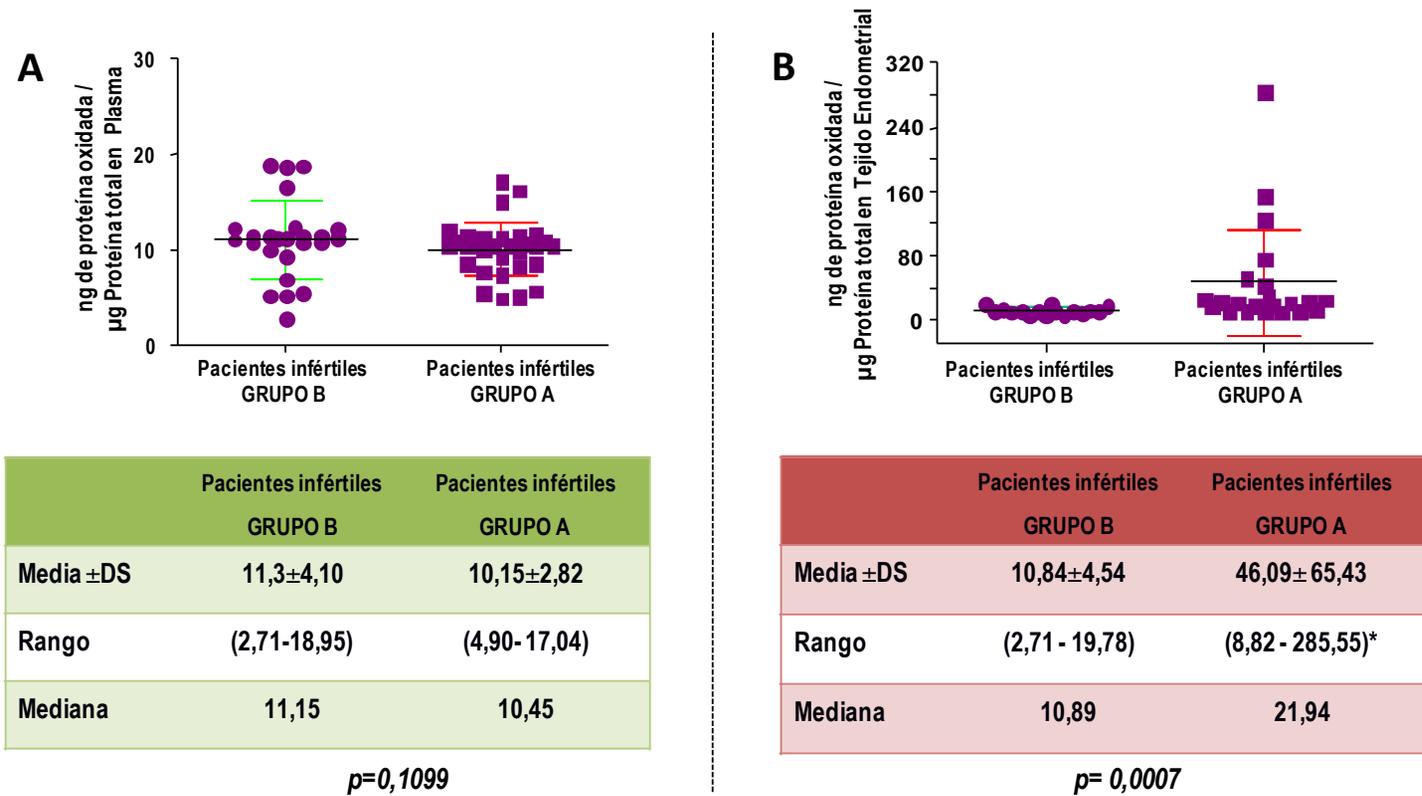


Figura 2: Niveles de Oxidación de Proteínas de las pacientes en estudio

Cuantificación de los niveles de proteínas oxidación empleando el ensayo de 2,4-dinitrofenilhidrazina en muestras de plasma (A) y tejido endometrial (B) de pacientes infértiles de los dos grupos en estudio, reportados como ng de proteína oxidada por µg de proteína total en plasma y/o tejido endometrial. Los datos son reportados como media ± desviación estándar. En la oxidación proteica en muestras de plasma, no se observan diferencias entre los dos grupos, no siendo así en las muestras de tejido endometrial en donde hay diferencias significativas en muestras del grupo B vs muestras de grupo A estando en éstas últimas más elevado incluso en diez órdenes de magnitud mas con relación a muestras de plasma. Se observa además una gran variabilidad en los niveles de oxidación individuales. Los datos son el resultado de análisis por triplicado a tres réplicas. El test utilizado fue U- Mann Whitney.

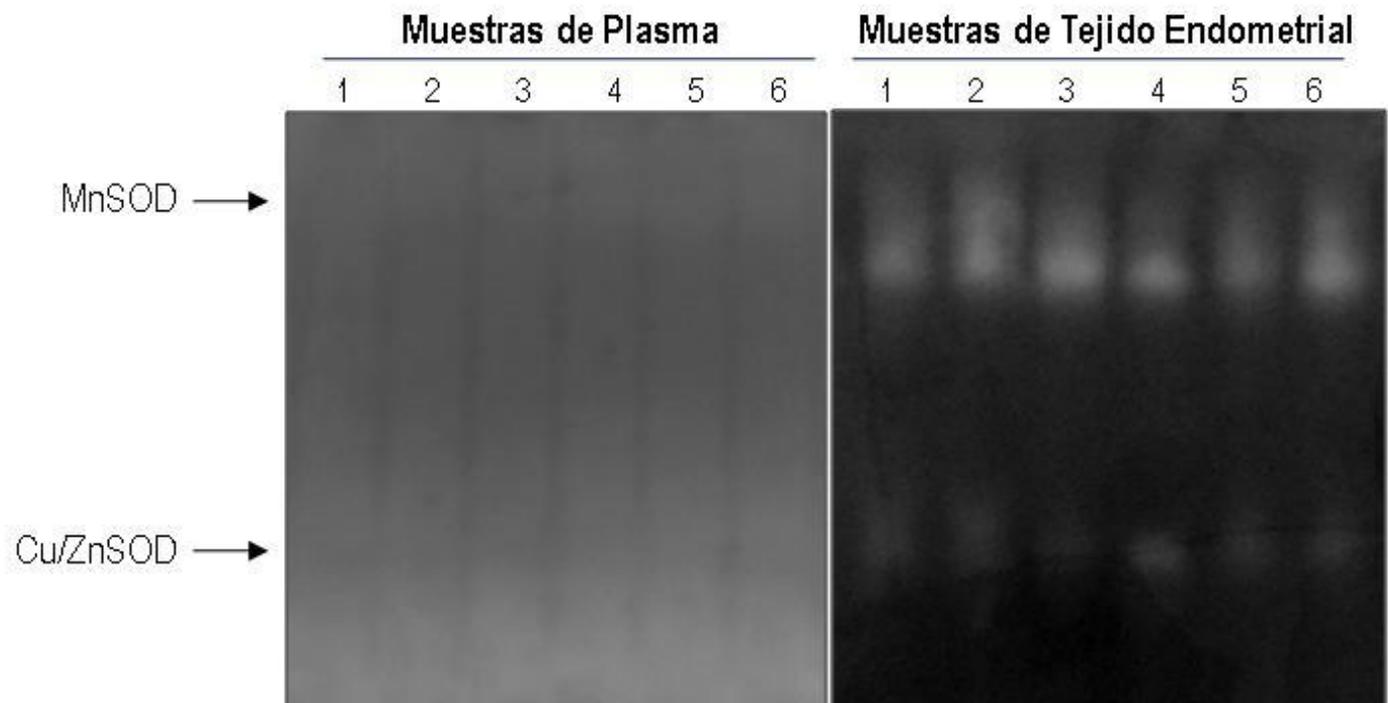


Figura 3: Actividad Superóxido dismutasa en muestras de Plasma y Tejido endometrial

Geles 12% nativos para actividad SOD en muestras de plasma y tejido endometrial. En esta figura se evidencia actividad SOD solo en las muestras de tejido endometrial .

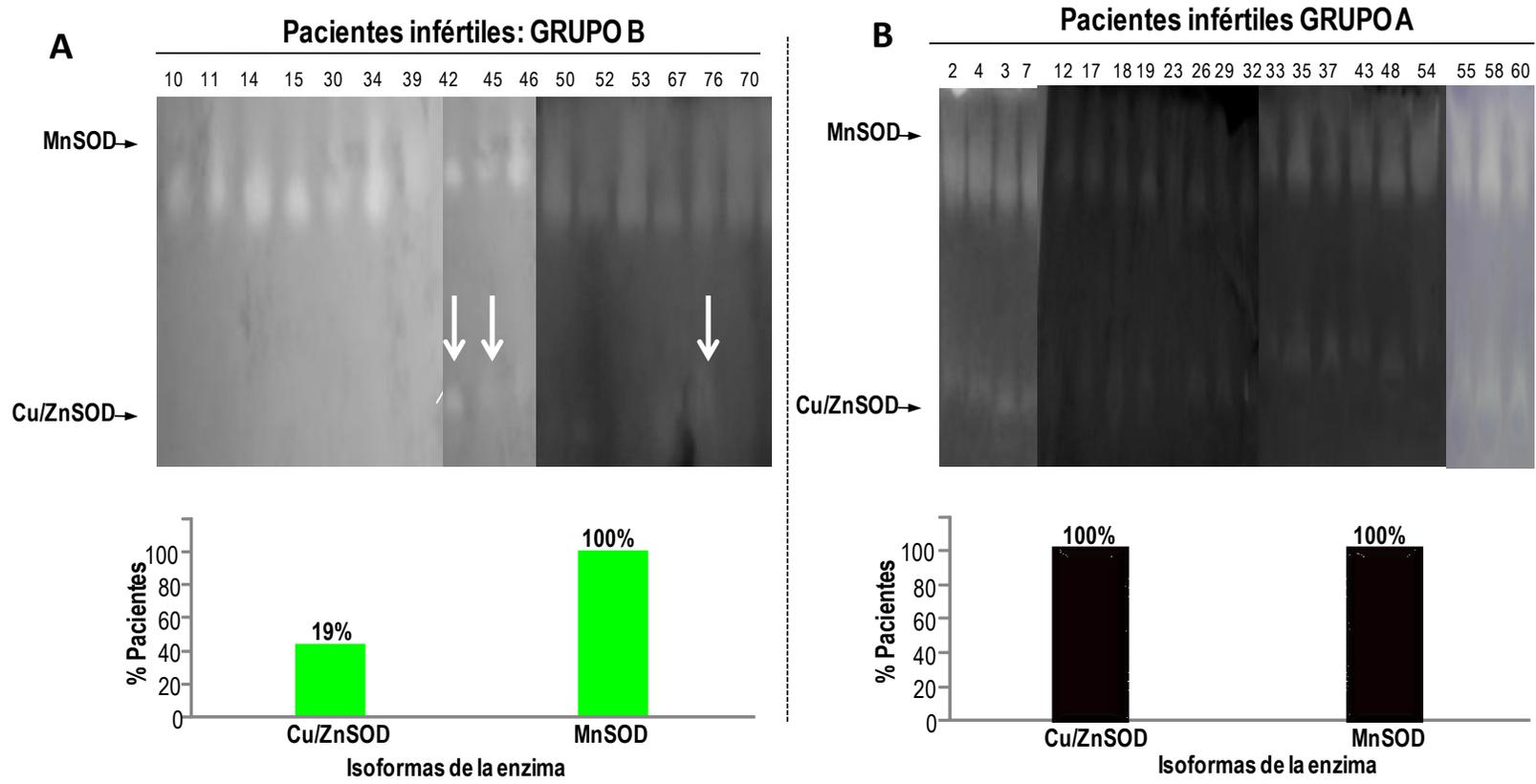


Figura 4: Actividad Superóxido Dismutasa de pacientes infértiles con y sin endometriosis

Actividad en gel nativo de la enzima superóxido dismutasa de las pacientes infértiles. (A) Gel de actividad SOD en muestras de tejido endometrial de pacientes infértiles grupo B, se observa que solo el 43,75% de las pacientes muestran actividad para la isoforma Cu/Zn SOD. (B) Gel de actividad SOD en muestras de tejido endometrial de pacientes infértiles del grupo A, se observa que todas las pacientes infértiles del grupo A, muestran actividad para las dos isoformas de SOD. La actividad diferencial de SOD en ambos grupos presentó diferencias estadísticamente significativas ($P=0,0031$). El test utilizado fue ji- X2.

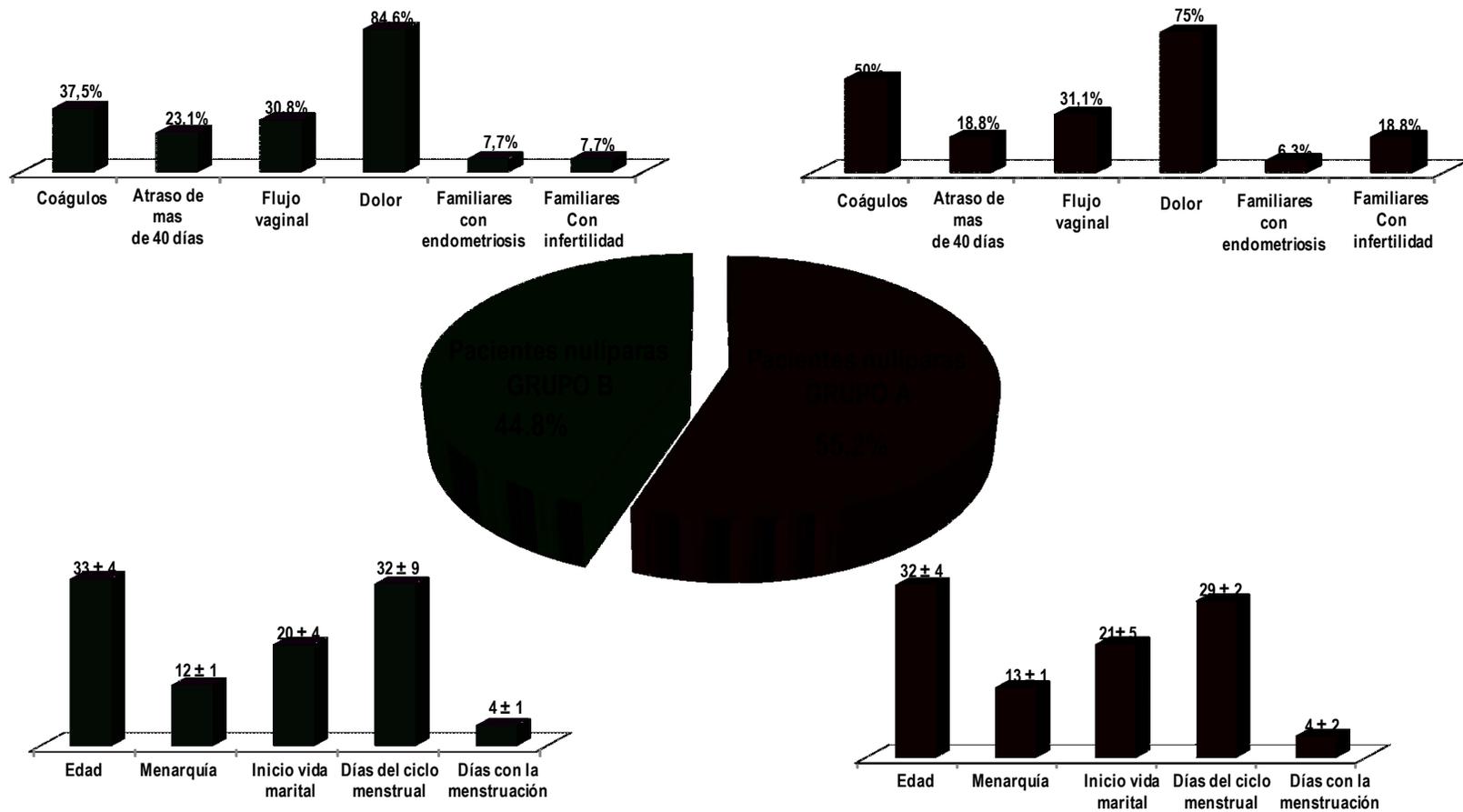
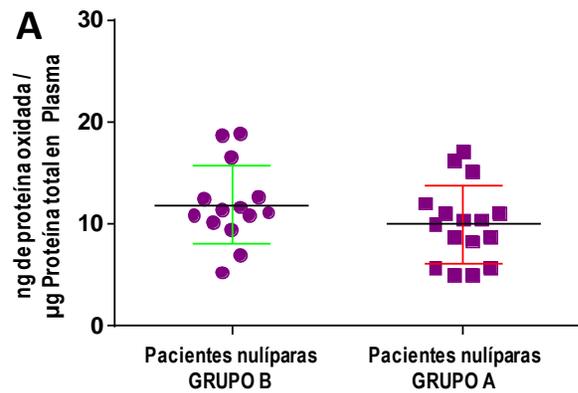


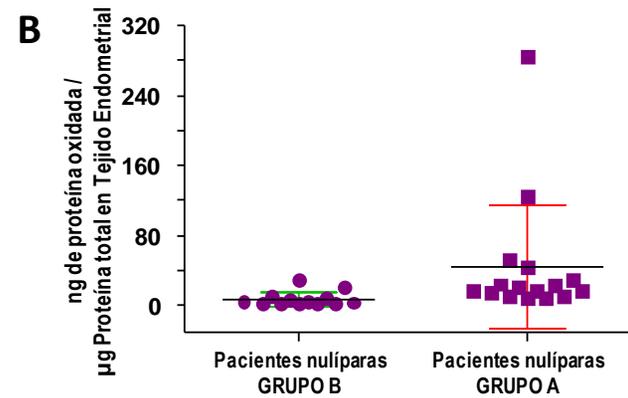
Figura 5: Características de las pacientes nulíparas

Características sociodemográficas de pacientes nulíparas grupo B (color verde) y pacientes infértiles del grupo A (color rojo). Datos tomados de encuesta a pacientes antes del procedimiento laparoscópico. Existen significancia estadística entre las variables sociodemográficas (valores de $P > 0,05$), lo que indica que los dos grupos son representativamente homogéneos. Los test utilizados fueron U- Mann Whitney y ji- X2.



	Pacientes nulíparas GRUPO B	Pacientes nulíparas GRUPO A
Media ±DS	11,87 ± 3,89	9,98 ± 3,79
Rango	(5,22 – 18,79)	(4,90- 17,04)
Mediana	11,24	10,12

$p=0,1190$



	Pacientes nulíparas GRUPO B	Pacientes nulíparas GRUPO A
Media ±DS	6,82 ± 8,41	43,85 ± 70,13
Rango	(1,06 – 28,66)	(8,78 – 284,29)*
Mediana	3,00	19,07

$p=0,0005$

Figura 6: Niveles de Oxidación de Proteínas de las pacientes nulíparas

Cuantificación de los niveles de proteínas oxidadas empleando el ensayo de 2,4-dinitrofenilhidrazina en muestras de plasma (A) y tejido endometrial (B) de pacientes nulíparas, reportados como ng de proteína oxidada por µg de proteína total. Los datos son reportados como media ± desviación estándar. En la oxidación proteica en muestras de plasma, no se observan diferencias entre los dos grupos, no siendo así en las muestras de tejido endometrial en donde hay diferencias significativas entre los dos grupos, estando incrementada más en las del grupo A, incluso en diez ordenes de magnitud más con relación a muestras de plasma. Se observa además una gran variabilidad en los niveles de oxidación individuales. Los datos son el resultado de análisis por triplicado a tres réplicas. El test utilizado fue U- Mann Whitney.

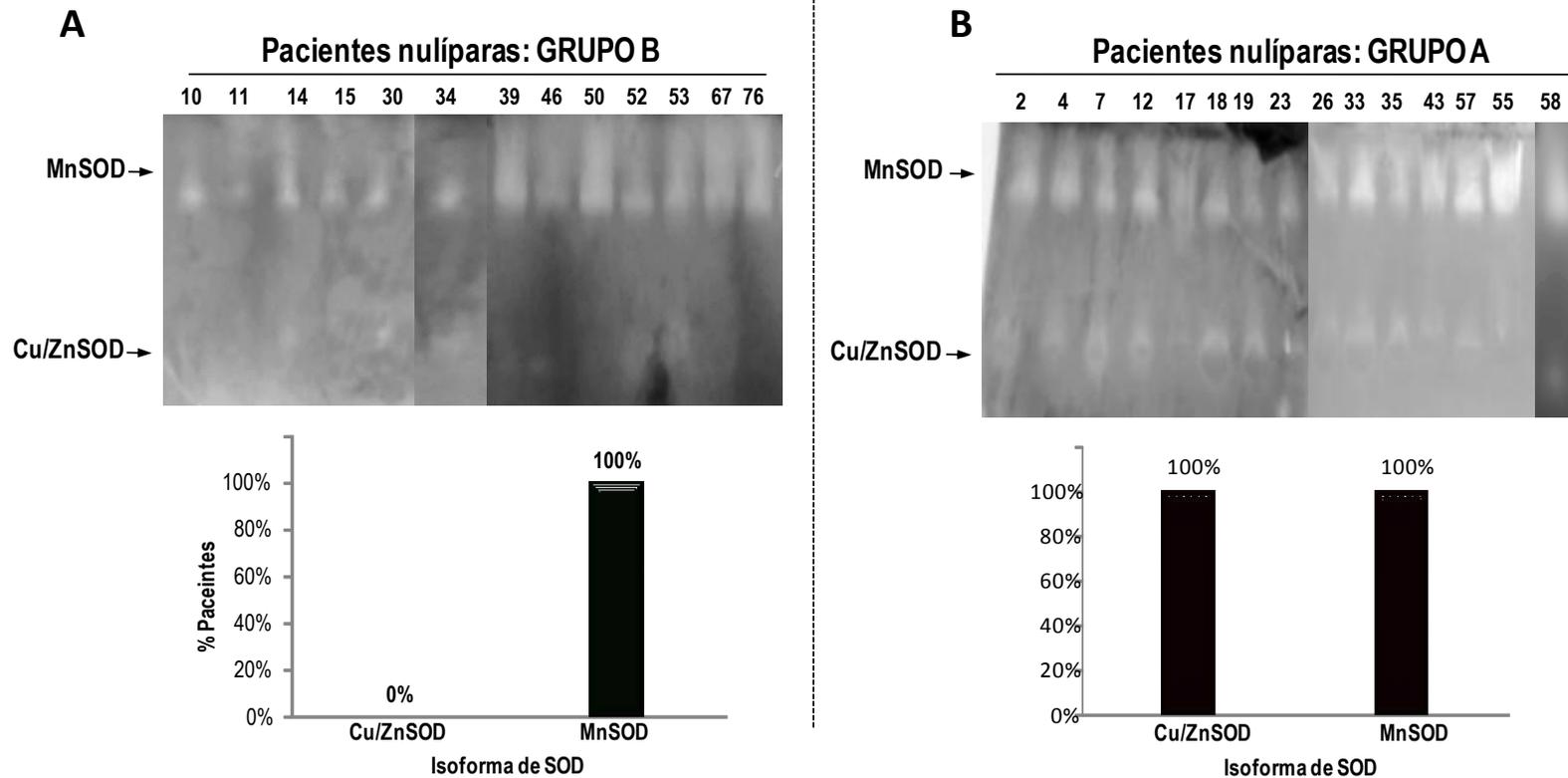


Figura 7: Actividad Superóxido Dismutasa de pacientes nulíparas sin y con endometriosis

Actividad en gel nativo de la enzima superóxido dismutasa de las pacientes nulíparas. (A) Gel de actividad SOD en muestras de tejido endometrial de pacientes nulíparas del grupo B, se observa que solo hay actividad de la isoforma MnSOD. (B) Gel de actividad SOD en muestras de tejido endometrial de pacientes nulíparas del grupo A, se observa que todas las pacientes muestran actividad para las dos isoformas de SOD. La actividad diferencial de SOD en ambos grupos presentó significancia estadística ($P=0,0031$). El test utilizado fue $j_i - X^2$.